

**ÇEŞİTLİ HABİTATLARDAN İZOLE EDİLEN ENDOSPORLU BASİLLERİN
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE AÇISINDAN TARANARAK
METABOLİTLERİN SAFLAŞTIRILMASI**

FERDAĞ ÇOLAK

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ Anabilim Dalı

HAZİRAN 2006

**SCREENING AND PURIFICATION FOR BIOLOGICAL ACTIVE
METABOLITES OF ENDOSPOR FORMING BACILLI ISOLATED FROM
DIFFERENT HABITATS**

FERDAĞ ÇOLAK

Ph.D. THESIS

Department of Biology

JUNE 2006

**ÇEŞİTLİ HABİTATLARDAN İZOLE EDİLEN ENDOSPORLU BASİLLERİN
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE AÇISINDAN TARANARAK
METABOLİTLERİN SAFLAŞTIRILMASI**

FERDAĞ ÇOLAK

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

BİYOLOJİ Anabilim Dalı

GENEL BİYOLOJİ Bilim Dalında

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: **Doç. Dr. Semra İLHAN**

Haziran 2006

ÖZET

Antibiyotikler mikroorganizmalar tarafından üretilen, yüksek seyreltmelerde diğer mikroorganizmaların büyümesine antagonistik etki yapan maddeler olarak tanımlanmaktadır. Çoklu ilaç direncine sahip bakteriler birden fazla antibiyotiğe dirençli olanlardır ve mikroorganizmaların dirençli hale geldikleri antibiyotiklerden artık etkilenmezler.

Çalışmamızda çeşitli habitatlardan 414 endospor oluşturan basil izole edilmiştir. Bu izolatların aktif metabolit açısından tarama işlemi iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada piece agar yöntemi kullanılmış ve ikinci aşamada ise klinik izolatlara karşı gösterdiği aktivite piece agar ve disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır. İkinci taramada izolatların % 23'ü en azından bir klinik izolata karşı aktivite göstermiştir.

Seçilen izolatlar VITEK sistem ile tanımlanmış ve 4'ü *Bacillus subtilis*, 4'ü *B. cereus*, 2'si *B. amyloliquefaciens*, Yağ asidi profillerine (FAME) göre tanımlanmış ve 7'si *B. cereus*, 1'i *B. amyloliquefaciens*, 2'si *Paenibacillus macerans* olarak tanımlanmıştır.

Sıcaklık, çalkalama hızı, pH, karbon kaynağı, azot kaynağı ve mineral madde tipinin seçilen izolatın gelişimi ve antibakteriyal ve antifungal metabolit üretimi üzerine etkisi response surface modeline göre incelenmiştir. 200 rpm çalkalama hızında, 35-42 °C'de ve pH 7 de en fazla hücre gelişimi ve metabolit üretimi görülmüştür. Modele göre karbon kaynağının en önemli faktör olduğu bulunmuştur.

Endosimbiyotik stain (*P. macerans*) tarafından üretilen metabolitler etil asetat ile ekstrakte edilerek ince tabaka kromatografisi ve kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Aktif maddenin etkisi minimum inhibisyon konsantrasyonu ve minimum sidal konsantrasyonu ile değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, antimikrobiyal aktivite, FAME, surface response, VITEK, İTK, KK, MİK

SUMMARY

Antibiotics have been defined as substances produced by microorganisms that, in high dilution, are antagonistic to the growth or life of other microorganisms. Multi drug resistant bacteria are those that are resistant to more than one antibiotic, meaning that the microorganisms are no longer affected by the antibiotics to which they have become resistant.

In this study a total of 414 endospore forming bacilli were isolated from different habitats. Screening for biological active metabolite was carried out in two stages. In the first screening, 221 active isolates were obtained using the piece agar method, in terms of their general inhibition effects to some test bacteria, yeast and molds. Second screening of the isolates was carried out using disc diffusion and piece agar method in terms of their general inhibition against some multidrug resistant microorganisms. 23% of the isolates shown inhibition effects against at least one multi drug resistant microorganisms.

Ten endospore forming bacillus strains selected were identified as 4 *Bacillus subtilis*, 4 *B. cereus* and 2 *B. amyloliquefaciens* by VITEC system and as 7 *B. cereus*, 1 *B. amyloliquefaciens* and 2 *Paenibacillus macerans* according to fatty acids profiles (FAME).

A surface response model was used to study the effect of pH, temperature, agitation, carbon source, nitrogen source and mineral matter source on growth of *P. macerans* and its antifungal and antibacterial metabolite production. 200 rpm agitation, temperature 35-42°C and pH 7 favoured cell growth and production of metabolite. According to the model it was found that carbon source was the most important factor.

The metabolites produced by the endosymbiotic strain (*P. macerans*) were extracted with ethyl acetate. Active metabolite was isolated and purified by thin layer chromatography and column chromatography. The effect of active substances on test microorganisms was evaluated by minimum inhibition concentration and minimum cidal concentration.

Key words: *Bacillus*, antimicrobial activity, FAME, surface response, VITEK, TLC, CC, MIC

TEŞEKKÜR

Akademik yaşımda çok önemli bir yere sahip olan bu doktora çalışmam sırasında bilimsel yönüyle katkılarından yararlandığım ve sürekli moral desteğini gördüğüm sayın hocam Doç. Dr. Semra İLHAN'a teşekkür eder sonsuz saygı ve şükranlarımı arz ederim.

Çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Merih KIVANÇ ve Prof. Dr. Kıymet GÜVEN'e, ESOGÜ Kimya Bölümü'nden Doç. Dr. İsmail KIRAN'a, İstatistik Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr. Zeki YILDIZ'a ve Anadolu Üniversitesi BİBAM da görev yapan Yrd. Doç. Dr. F. Zerrin ERDEMGİL'e teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım sırasında engin anlayış ve desteğini gördüğüm hayat arkadaşım Dr. Alper Tolga ÇOLAK'a, canım oğlum M. Atahan ÇOLAK'a ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan aileme teşekkür ederim.

Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Yalçın ŞAHİN'e, Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU'na ve tüm Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine ve çalışma arkadaşlarıma, deneylerim sırasında ilgi ve yardımını esirgemeyen arkadaşım Araş. Gör. Dr. Cansu FİLİK İŞÇEN'e teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım için gerekli maddi desteği sağlayan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na ve FIBAM'a teşekkür ederim.

Canım eşime ve biricik oğluma

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. Genel Bilgiler	5
2.1. Antibiyotikler	5
2.1.1 Antibiyotiklerin Kimyasal Yapıları	6
2.1.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	7
2.1.3 Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları	8
2.1.4 Antibiyotiklerin Biyosentezi	9
2.1.5. Antibiyotiklerin Kullanıldığı Alanlar	10
2.1.6. Antibiyotiklerin Ekonomisi	10
2.1.7 Antimikrobiyal İlaçlara Direnç	11
2.1.8 Antimikrobiyal İlaçlara Direncin Genetik Temelleri	12
2.1.9 Hastane Enfeksiyonlarına Yol Açan Bakteriler	13
2.1.10 Antibiyotik Duyarlılık Testleri	13
2.1.11 Antimikrobiyal Madde Üreten Mikroorganizmalar	15
2.2. <i>Bacillus</i> Cinsi	15
2.2.1 Koloni Morfolojisi	16
2.2.2 Hücre morfolojisi	17
2.2.3 Taksonomisi	18
2.2.4 Hücre Çeperi ve Zarı	20
2.2.5 Kapsül Yapısı	20
2.2.6 Kamçı	21
2.2.7 Spor Yapısı ve Oluşumu	21
2.2.8 Ekoloji ve Habitatlar	22

2.2.9 <i>Bacillus</i> 'ların Önemi ve Endüstriyel Kullanımı	24
2.3.1. Biyokimyasal Özelliklere Dayalı Tanı (VITEK).....	27
2.3.2. Hücre zarı yağ asitlerine Dayalı Tanı (FAME)	28
2.4. Deney tasarımı	29
2.4.1 Tam Faktöriyel Deney	29
2.4.2 Deney Tasarımının Adımları	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1 Materyaller.....	33
3.1.1 Endospor Oluşturan Basillerin Elde Edildiği Kaynaklar.....	33
3.1.2 Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	33
3.1.3 Besiyerleri.....	35
3.1.4 Çözeltiler.....	39
3.1.5 Boyalar.....	42
3.2 Yöntem.....	43
3.2.1. Toplanan Örneklerin Hazırlığı.....	43
3.2.1.1. Arthropod Örneklerinin Hazırlanması	43
3.2.1.2 Toprak ve Gübre Örneklerinin Hazırlanması	43
3.2.1.3 Bitki Rizosfer Örneklerinin Hazırlanması	43
3.2.1.4 Bitki Kök Dokusu Örneklerinin Hazırlanması	43
3.2.1.5 Bitki Tohum Örneklerinin Hazırlanması	44
3.2.2 Endospor Oluşturan <i>Bacillus</i> 'ların İzolasyonu	44
3.2.2.1 Gram Boyama	45
6.2.2.2 Endospor boyama	45
3.2.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	45
3.2.3.1 Agar Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi ..	45
3.2.4. Endospor Oluşturan <i>Bacillus</i> 'lardan Metabolit Üretimi.....	47
3.2.5 Endospor Oluşturan <i>Bacillus</i> 'ların İdentifikasyonu	47
3.2.5.1 Biyokimyasal Özelliklere Dayalı İdentifikasyon.....	47
3.2.5.2. Yağ Asidi Profilleri Esas Alınarak İdentifikasyon	48
3.2.6 Fermentasyon.....	51
3.2.7 Deney Tasarımı (Responce Surface Modeli) ile Optimizasyon	51
3.2.7.1 Fiziksel Faktörlere Dayalı Deney tasarımı	51

3.2.7.2 Kimyasal Faktörlere Dayalı Deney tasarımı.....	53
3.2.8 Antibakteriyal Etkili Molekülün İzolasyonu	54
3.2.8.1 İnce Tabaka Kromatografisi (İTK).....	54
3.2.8.2 Biyootografi	56
3.2.8.3 Kolon Kromatografisi	56
3.2.9 Erime Noktası ve Çözünürlük Testi.....	56
3.2.10 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK).....	57
3.2.11 Minimum Sidal Konsantrasyonu (MSK).....	57
4. BULGULAR.....	58
4.1 Endospor Oluşturan Basillerin İzolasyonu	58
4.2. Endospor Oluşturan Basillerin Antimikrobiyal Aktivitesi	69
4.2 İzolatların İdentifikasyonu	80
4.2.1 Biyokimyasal Özelliklere Dayalı İdentifikasyon.....	81
4.2.2 Yağ Asidi Profillerine Dayalı İdentifikasyon	81
4.4 Fermentasyonla Antimikrobiyal Etkili Molekülün Üretimi	86
4.5. Fiziksel Faktörlere Dayalı Deney Tasarım (Responce Surface) Modeli Bulguları	87
4.5.1.1. Fiziksel faktörlerin hücre gelişimi (OD) üzerine etkisi	87
4.5.1.3. Fiziksel faktörlerin metabolit üretimi (<i>S. aureus</i>) üzerine etkisi	93
4.5.2. Kimyasal Faktörlere Dayalı Deney Tasarımı (Responce Surface modeli) Bulguları	100
4.5.2.1. Deney tasarımının hücre gelişimi (OD) üzerine etkisi	101
4.5.2.3. Kimyasal faktörlerin antibakteriyal aktivite üzerine etkisi.....	105
4.3 Kolon ile saflaştırma ve Biyootografi.....	112
4.4. MİK ve MSC Bulguları	112
4.5. Erime noktası ve çözünürlük testi.....	113
5. TARTIŞMA.....	114
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	127
ÖZGEÇMİŞ	153

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Prokaryotlarda hücre zarı yapısı	28
Şekil 3.1 Besiyerine izolatların çizgi yöntemi ile ekilmesi	48
Şekil 3.2 Besiyerinden izolatların tüp içerisine aktarılması	49
Şekil 3.3. Saponifikasyon işlem basamağı.....	49
Şekil 3.4. Metilasyon işlem basamağı	49
Şekil 3.5.Yağ asitinin yağ asidi metil esterine dönüşüm reaksiyonu.....	50
Şekil 3.6 Ekstraksiyon işlem basamağı.....	50
Şekil 3.7 Yıkama işlem basamağı.....	50
Şekil 3.8 İnce tabaka Kromatografisinin (İTK) nın yapılışı.....	55
Şekil 4.1. <i>P. macerans</i> 'a ait büyüme eğrisi, etken metabolit üretimi, spor oluşumu ve pH değişimi.....	86
Şekil 4.2. Modele göre başlangıç pH ve sıcaklığın hücre gelişimi (OD) üzerindeki etkisi	90
Şekil 4.3 Modele göre başlangıç pH ve çalkalama hızının (rpm) hücre gelişimi (OD) üzerindeki etkisi	91
Şekil 4.4. Modele göre çalkalama hızı (rpm) ve sıcaklığın hücre gelişimi (OD) üzerindeki etkisi	92
Şekil 4.5 Modele göre pH ve sıcaklığın (<i>S. aureus</i>) üzerine etkisi.....	94
Şekil 4.6 Modele göre sıcaklık ve pH'ın (<i>C. glabrata</i>) üzerine etkisi.....	95
Şekil 4.7 Modele göre pH ve çalkalama hızı (rpm) <i>S. aureus</i> üzerine etkisi.....	96
Şekil 4.8 Modele göre çalkalama hızı (rpm) ve pH <i>C. glabrata</i> üzerine etkisi	97
Şekil 4.9 Modele göre sıcaklık ve rpm <i>S.aureus</i> üzerine etkisi	98
Şekil 4.10 Modele göre rpm ve sıcaklık <i>C. glabrata</i> üzerine etkisi	99
Şekil 4.11 Modele göre karbon kaynağı ve azot kaynağının hücre gelişimi üzerine etkisi	102
Şekil 4.12 Modele göre karbon kaynağı ve mineral madde'nin hücre gelişimi üzerine etkisi.....	103
Şekil 4.13 Modele göre azot kaynağı ve mineral madde'nin hücre gelişimi üzerine etkisi	104
Şekil 4.14. Modele göre karbon kaynağı ve azot kaynağının <i>S. aureus</i> üzerine etkisi.	106

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.15. Modele göre karbon kaynağı ve azot kaynağının antifungal aktivite üzerine etkisi.....	107
Şekil 4.16. Modele göre karbon kaynağının ve mineral maddenin <i>S. aureus</i> üzerine etkisi.....	108
Şekil 4.17. Modele göre karbon kaynağı ve mineral maddenin <i>C. glabrata</i> 'ya etkisi .	109
Şekil 4.18. Modele göre azot kaynağı ve mineral maddenin <i>S. aureus</i> üzerine etkisi .	110
Şekil 4.19. Modele göre azot kaynağı ve mineral maddenin antifungal aktivite üzerine etkisi.....	111

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması	7
Çizelge 2.1 devamı	8
Çizelge 2.2 Bazı antibakteriyal ilaçların etki mekanizmaları	9
Çizelge 2.3 Bacillusların ürettiği bazı antibiyotikler	26
Çizelge 3.1 Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan test organizmaları	33
Çizelge 3.2 Responce surface modele göre kullanılan fiziksel faktörlerin sıra ve düzeyleri.....	52
Çizelge.3.3 Responce surface modele göre kullanılan kimyasal faktörlerin sıra ve düzeyleri.....	54
Çizelge 4.1. Bitkisel habitatlar ve izolasyonda kullanılan besiyeri tiplerine göre izolat kodları	59
Çizelge 4.2 Hayvansal habitatlar ve izolasyonda kullanılan besiyeri tiplerine göre izolat kodları	62
Çizelge 4.3. Diğer habitatlar ve izolasyonda kullanılan besiyeri tiplerine göre izolat kodları	67
Çizelge 4.4 Bitki örneklerinden elde edilen izolatların piece agar yöntemiyle test organizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları.....	69
Çizelge 4.5. Hayvan örneklerinden elde edilen izolatların piece agar yöntemiyle test organizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları.....	71
Çizelge 4.6 Diğer örneklerden elde edilen izolatlarının piece agar yöntemiyle test organizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları.....	74
Çizelge 4.7 Test organizmalarına etki gösterdiği belirlenen 221 endospor oluşturan basillerin antimikrobiyal etki dağılımları	76
Çizelge 4.8 Standart Bacillus türlerinin piece agar yöntemine göre test mikroorganizmalarına karşı gösterdikleri aktivite.....	76
Çizelge 4.9. İzolatların test organizmalarına karşı piece agar yöntemine göre aktivite sonuçları.....	77
Çizelge 4.10. Aktivite gösteren 53 izolatın dirençli suşlara karşı piece agar yöntemine göre antimikrobiyal etki dağılımları	78

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

	<u>Sayfa</u>
Çizelge: 4.11 İzolatların difüzyon yöntemi kullanarak klinik test organizmalarına karşı görülen aktivite sonuçları.....	79
Çizelge 4.12 İzolatların dirençli suşlara karşı disk difüzyon yöntemine göre antimikrobiyal etki dağılımları	80
Çizelge 4.13 Aktivite gösteren 10 izolatın biyokimyasal özellikleri ve VITEK identifikasyonu.....	82
Çizelge.4.14. Aktivite gösteren 10 izolatın yağ asit profilleri.....	83
Çizelge 4.15 VITEK ve FAME sonuçlarının karşılaştırılması.....	84
Çizelge 4.16 Seçilen 10 izolatın 3 klinik izolata karşı aktiviteleri	85
Çizelge 4.17 <i>P. macerans</i> 'ın disk difüzyon yöntemine göre çeşitli test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi	85
Çizelge 4.18 Fiziksel faktörlere dayalı deney tasarımı.....	88
Çizelge 4.19. Üç faktörün hücre gelişimi (OD), <i>S. aureus</i> ve <i>C. glabrata</i> üzerindeki etkilerine ilişkin regresyon katsayıları) ve anlamlımlık sınaması sonuçları.....	89
Çizelge: 4.20 Hücre gelişimi için modele ilişkin varyans analizi tablosu	89
Çizelge 4.21. <i>S. aureus</i> için modele ilişkin varyans analizi tablosu.....	93
Çizelge 4.22 <i>C. glabrata</i> 'ya ilişkin varyans analiz tablosu	93
Çizelge 4.23 Besin ortamı değişkenleri ile deney tasarımı modeli.....	100
Çizelge 4.24 Kimyasal faktörlerin hücre gelişimi (OD), antibakteriyal ve antifungal aktivite üzerine etkilerine ilişkin regresyon katsayıları ve anlamlımlık sınaması	101
Çizelge :4.25 Hücre gelişimi için modele ilişkin varyans analizi tablosu	101
Çizelge :4.26 Antibakteriyal aktivite (<i>S. aureus</i>) için modele ilişkin varyans analizi tablosu.....	105
Çizelge :4.27 Antifungal aktivite (<i>C. glabrata</i>) için modele ilişkin varyans analizi tablosu.....	105
Çizelge 4.28 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)	112
Çizelge 4.29. Çözünürlük testi.....	113

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C:	Santigrad derece
ml:	Mililitre
g:	Gram
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyon
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
MSK	Minimum Sidal Konsantrasyon
KK	Kolon Kromatografisi

1. GİRİŞ

Antibiyotikler bakteriler tarafından üretilen sekonder metabolitler olup organizma herhangi bir stres durumuyla karşılaştığı zaman faaliyete geçen özelleşmiş metabolik yollar ile üretilirler. Diğer bir deyişle antibiyotik; bir mikroorganizma tarafından üretilen, düşük konsantrasyonlarda bile diğer mikroorganizmaların büyümesini inhibe etme veya öldürebilme yeteneğinde olan selektif toksisite gösteren kimyasal bir maddedir. Bu ürünlerin ara metabolizma ürünlerinden farkı, organizmanın büyümesi ve üremesi için mutlak gerekli olmamalarıdır. Buna rağmen organizma için önemli bir takım işlevler üstlenirler. Atıkların uzaklaştırılması, detoksifikasyon, savunma ve hücreler arası haberleşme bu işlevler arasındadır. Ürettikleri organizma için üstlendikleri bu çeşitli görevlerin dışında, sekonder metabolitler antibiyotik, kemoterapötik, pestisit, immünosüpresif, antilipolitik ajan gibi çok çeşitli farmasötik fonksiyonlara da sahiptir ve bu etkileri nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu işlevlere sahip bileşikler kimyasal yapıları bakımından da çok büyük çeşitlilik gösterirler (Eltem, 1999; Büber, 2004).

Antibiyotikler, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici “bakteriyostatik” veya “fungostatik” olabildikleri gibi; mikroorganizmanın ölümüne sebep olan bakterisit veya fungusit de olabilirler (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Antibiyotik devri Alexander Fleming tarafından bulunan penisilin ile başlamıştır. Bu tarihten itibaren bir çok antibiyotik keşfedilmiştir. Antibiyotiklerin etkinlik derecesini artırmak ve yeni antibiyotikleri insanlığa kazandırmak için bir çok çalışmalar günümüzde de artarak devam etmektedir.

Enfeksiyon etkenlerinin keşfi, antiefektif tedavinin geliştirilmesi ve bulaşıcı hastalıkların kontrol altına alınması kuşkusuz sağlık alanındaki en önemli gelişmelerdendir. Her ne kadar antibiyotiklerin keşfi mikrobiyal hastalıkların kontrolünde büyük bir çığır açmışsa da; çok önceleri anti-enfektif etkisi olan bazı maddeler tıbbi tedavilerde kullanıla gelmiştir.

Antibiyotikler ilaç tarihinde en önemli teropatik keşif olarak adlandırılır. Onların tarihsel gelişimleri yakından ilgilenildiğinde insanın yaşamının her döneminde bugünkü kadar var olduğu görülür. Edinilen bilgilere göre antibiyotikler onların keşfinden

öncede kullanılıyordu. Eski yazılardan, kumaş parçaları üzerine doğal maddelerden ve diğer organik maddelerden elde edilen bileşiklerin iyileştirmek için yaranın üzerine uyguladıklarını öğreniyoruz. Antropologlar kazı sırasında çıkardıkları bin yıllık eski Nubian mumyalarında tetrasiklinin izine rastlamışlardır. Nubian halkı 14. yüzyılda yaşamış ve bazı bilim adamlarının iddalarına göre tetrasiklin gibi antibiyotiklerin kullanımı ve varlığı ile kısmen ilgilerinin olduğu sanılmaktadır (Levy, 1984).

Nitekim Çinliler 2500 yıl önce küflü soya fasulyesi kesliğini; Hipokrat'ta dahil eski Yunanlılar ise şarap ve bazı organik tuzları yara enfeksiyonlarına karşı kullanmışlardır. 1877 yılında L. Pasteur ve J. F. Joubert iki farklı organizmanın aynı kültür ortamında eşit oranda gelişemedikleri ve bir organizmanın diğerini yok ettiği gözlemlerini açıklayıncaya kadar da bir mikroorganizmanın diğerinin gelişmesini engelleyebileceği, kimsenin dikkatini çekmemişti. Bu ilk buluşların etkisi o kadar büyük oldu ki, 1880-1910 yılları arasında, çok sayıda patojen bakteri keşfedildi. Ancak, bütün çabalara rağmen, 19. yüzyılda antimikrobiyal tedavi konusunda önemli ilerlemeler kaydedilemedi. İlk olarak 1928'li yıllarda Sir Alexander Fleming tarafından bakteri için toksisitesi saptanan penisilinin, 1941 yılında H. W. Florey., E. B. Chain ve arkadaşları tarafından izole edilerek selektif toksisitesinin ortaya konması ve penisilinin tedavide kullanılmaya başlamasıyla antimikrobiyal tedavide altın çağ açılmış oldu (Cross, 1982).

Enfeksiyonlara karşı etkili bir silah olarak kullanılan antibiyotikler günümüz toplumunda, özellikle de toplumumuzda geriye tepen bir silah durumuna gelmiştir. Uzun sürelerden beri kullanılan antibiyotikler salgın ve enfeksiyöz hastalıklardan ölüm oranını birden azaltmış olmasına rağmen, özellikle az gelişmiş toplumlarda antibiyotik ve kemoteröpatiklere karşı giderek artan bir direnç kazanımı görülmüş ve enfeksiyon hastalarıyla mücadele de gittikçe zorlaşmıştır. Bunun yanında penisilin başta olmak üzere bir çok antibiyotiğin toksik, alerjik ve anafilaktik etkileri aniden görüldüğü gibi, ayrıca doku ve organlarda gözden kaçan toksik etkileri de, insan sağlığı bakımından büyük zararlar doğurmaktadır. Ayrıca 16,5 milyar dolarlık bir piyasaya sahip olan antibiyotiklerin bu yanlış ve düzensiz kullanımlarının meydana getirdiği ekonomik yük hiç de küçümsenemeyecek miktarda görülmektedir. Ayrıca tıbbın dışında hayvancılık, ziraat ve çeşitli araştırma alanlarında antibiyotiklerin kullanım sahası bulması, bunların

önemini daha da arttırmaktadır. Bilinçsizce antibiyotik kullanımı bakterilerin bu ilaçlara karşı direnç geliştirmesine neden olmuştur. Bunun sonucu kullanılmakta olan mevcut ilaçların geliştirilmesi gereği ortaya çıkmıştır. Son on yılda, eski antibakteriyel ve antifungal ilaçlara karşı, iki antibiyotiğe dirençli bir çok mikroorganizma, klinik olarak izole edilmiş ve tek yönlü etkili antibiyotiklerle mücadelenin kolay olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, sürekli olarak, etki alanı geniş ve güçlü antibiyotikler üreten yeni mikroorganizma tiplerinin araştırılması önem kazanmıştır. Ancak mikroorganizmalardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin çoğu hayvan deneylerini geçememekte, sadece birkaç tanesi tıbbi olarak faydalı bulunarak ticari olarak üretilmektedir. Özellikle son yıllarda uluslararası ilaç endüstrisinin araştırma geliştirme çalışmaları her yıl arttığı halde, yeni keşfedilen ve patenti alınan ilaç sayısında ciddi bir düşüş olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, bir çok *Bacillus* türünün sahip olduğu biyokontrol aktivitesi, ilaç endüstrisi için önem taşımaktadır. Yeni antibiyotiklerin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan işlem 'screening' denilen eleme yöntemidir. Antibiyotik üretmesi mümkün olan organizmaların çok fazla sayısı doğal çevrelerden izole edilerek her biri, eğer varsa antagonizmlerini görmek için çeşitli organizmalara karşı test edilirler. Antibiyotikler günümüzde, bütün dünyada en fazla kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır. Bu yaygın kullanımın büyük bir kısmı ise irrasyonel olmaktadır. Antibiyotiklerin yaygın ve irrasyonel kullanımı ekonomik yük ve yan etkilerin sık görülmesi gibi önemli sorunları da beraberinde getirirken; dirençli bakterilerin gelişmesine neden olarak da, toplum sağlığına olumsuz etkileri bulunmaktadır (Eltem, 1999; Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Son 40 yılda yeni antibiyotiklerin keşfi için en az 15 milyon organizma izole edilmiş ve yaklaşık on bin farklı antibiyotik tanımlanmış; her yıl bunların bir çoğu karakterize edilerek 200-300 tanesinin yeni olduğu saptanmıştır. Fakat bu çalışmalar çoğunlukla, en önemli antibiyotik üreticileri olarak bilinen funguslar, aktinomisetler ve *Bacillus* cinsi üyelerinde yoğunlaştırılmıştır (Reichenbach and Höfle, 1989; Lancini and Lorenzotii, 1993; Lancini et al., 1995).

Mikroorganizmaların ürettikleri biyolojik aktif metabolitler için karasal habitatlardan ve deniz çevrelerinden son 20 yılda artan bir şekilde izolasyon yapılmıştır. (Faulkner, 2000). Bunlara ilaveten artropodlarla simbiyotik yaşayarak, aktif metabolit

üreten mikroorganizmalar üzerine de birkaç çalışma vardır (Fredenhagen et al., 1989; Lee, et al., 1996).

Bu çalışmada çeşitli hayvanların bağırsaklarından, çeşitli topraklardan, rizosferden, çeşitli hayvanların gübrelereinden alınan örneklerden endospor oluşturan basiller izole edilmiştir. Değişik ortam koşullarına sahip habitatlarda bulunan mikroorganizmaların potansiyel metabolit kaynakları olduğu şüphesizdir. Bu tip habitatlardan izole edilen mikroorganizmalar buldukları ortamlara uyum için farklı mekanizmalar geliştirmiş, seçilmiş organizmalardır. Dolayısıyla oluşturdukları metabolitlerin de farklı olma olasılığı yüksektir. Bu nedenle çok sayıda ve çeşitli habitatlardan izolasyon yapılarak biyolojik aktiviteye sahip yeni metabolitlerin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotikler

Vuilemin, 1889 yılında ilk defa, antibiosis sözcüğünü bir organizmanın kendi hayatını devam ettirebilmek için diğer bir mikroorganizmayı parçalaması durumunu ifade etmek için kullanmıştır. Papacostas ve Gate bu kelimenin manasını şöyle sınırlandırmışlardır. Eğer bir organizmanın diğer bir organizma üzerinde *invitro* zararlı etkisi söz konusu ise buna antibiosis; eğer bir organizmanın diğeri üzerindeki benzer etkisi *invivo* ise bunu da antogonizm olarak adlandırılmışlardır. Antibiyotik sözcüğü için yeni bir anlam, 1942'de, Waksman tarafından mikroorganizmaların büyümelerini inhibe edici özelliğe sahip mikrobiyal orjinli kimyasal bir maddeyi tanımlamak için kullanılmıştır (Waksman, 1967).

Antibiyotikler, düşük konsantrasyonlarda mikroorganizmalar üzerine etkili olan, düşük moleküler ağırlıkta, mikrobiyal metabolitler olarak adlandırılır (Waksman, 1967; Öner, 1989; Lancini and Lorenzetti, 1993; Lancini et al., 1995). Düşük moleküler ağırlıktaki bileşikler, en çok birkaç bin dalton kütle içeren kimyasal yapıyı oluşturan bir moleküldür. Antibakteriyal etkili özellikleri olsa bile, lizozim gibi enzimler ve kolisin gibi diğer kompleks protein molekülleri antibiyotikler içine dahil değildir. Ayrıca kültür ortamlarında yüksek konsantrasyonlarda bulduklarında, öldürücü etkiye sahip olan lisin, lösün gibi aminoasitler ve anaerobik fermantasyon ürünleri olan etanol veya butanol gibi ürünler antibiyotik olarak adlandırılmazlar. Kesin olarak sadece mikroorganizmaların doğal ürünleri antibiyotik olarak adlandırılırlar, pratikte bu doğal ürünlerin kimyasal modifikasyonu ile oluşan semisentetik antibiyotikler olarak adlandırılan ürünleri de içerirler (Brock and Madigan, 1991; Lancini and Lorenzetti, 1993; Lancini et al., 1995). Kemoterapotikler ise antibiyotiklerle aynı özelliklere sahip oldukları halde; doğal olmayıp, kimyasal ve sentetik olarak elde edilen maddeler olarak adlandırılır (Yüce 1988; Öner, 1989).

Antibakteriyal ve antifungal ajanlar arasındaki en temel fark prokaryot olan bakteriler ile ökaryot olan fungus veya mayalar arasındaki farklılıkla açıklanabilir. İnsanlar ve diğer memeliler de funguslar gibi ökaryot olduğundan benzer biyolojiye sahip olan insan hücrelerine zarar vermeden fungus veya mayaları inhibe edecek bir

mekanizma geliştirmenin gücülüğü nedeniyle, antifungal etkili ilaçlar antibiyotiklere göre çok daha az sayıdadır.

Memeliler ve funguslar (ayrıca mayalar); t-RNA-AA-aıl transferazları, steroid sentetaz sistemleri (memelilerdeki kolesterolün yerini fungus ve mayalarda ergosterol alır) ve hücre çeperinin karbonhidrat yapısı bakımından farklılıklar gösterirler. Antifungal ilaç geliştirmede tüm bu noktaların göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Başer vd., 2002). Antikandidal ilaç geliştirmenin diğer bir zorluğu da *Candida albicans* gibi bir çok fungusun, sağlıklı insanlarda hastalık oluşturmazken; antibiyotik kullanımı sonucunda normal florada değişiklik veya hastalık sonucunda konak immün cevabında yetersizlik neticesinde hastalıklara sebep olmalarıdır. Özellikle de geniş spektrumlu antibiyotikler ve intravasküler araçların kullanımı ile immün sistemi baskılanmış (immünosupresif) hastaların sayısındaki artışlar nedeniyle, kandida enfeksiyonlarının sıklığı artmaktadır (Koç, 2002). Kandidalar boğaz, üst solunum yolları, gastrointestinal kanal ve vajenin normal florasının üyesidirler (Kılıçturgay vd., 1994). Dolayısıyla halen kullanımda olan sentetik traptik ajanların toksisiteleri, yan etkileri ve rezistansa sebep olmaları nedeniyle yeni, daha güvenilir ve etkin yeni antifungal ilaçlara gerek duyulmaktadır (Uzun, 2002).

Sekonder metabolitlerin çoğu potansiyel farmakolojik aktivite, antitümör, antifungal, antiviral ve antibakteriyal özelliğe sahiptir (Kelman, 2001).

Dünyanın her tarafında sistematik olarak yeni antibiyotik üreten organizmalar aranmaya başlanmıştır. Bu tür araştırma etkinliklerinin sonuçları olarak halen iyi bilinen antibiyotikler ortaya çıkmıştır. Bu tarama etkinlikleri; antibiyotik üreten mikrobiyal strainlerin toprak veya doğal bir kaynaktan izolasyonunu, strainlerin fermentasyonunu ve aktif bileşiklerinin tanımlanmalarını kapsamaktadır (Lancini, 1995).

2.1.1 Antibiyotiklerin Kimyasal Yapıları

şimdiye kadar yaklaşık 10.000 antibiyotik izole edilerek tarif edilmiş ve büyük bir kısmının kimyasal yapısı aydınlatılmıştır. şu bir gerçektir ki antibiyotikler çok heterojen bir gruptur. Onların molekül ağırlığı 150-5000 dalton arasında değişir. Molekülleri sadece karbon ve hidrojen veya çok yaygın olarak karbon, hidrojen, oksijen ve azot,

hatta diğ er bir kısmı kükürt, fosfor veya halojen atomlarını içerir ve hemen hemen bütün organik kimyasal fonksiyonel gruplar (hidroksil, karbonil, nitrojen fonksiyonel grup vb.) ve bütün organik yapılar (alifatik zincirler, alisiklik zincirler, aromatik halkalı, heterosiklikler, karbonhidratlar, polipeptitler vb.) bulunur. Genelde antibiyotikler, bakteri büyümesini inhibe eden polar gruplara sahiptirler (Lancini et al., 1995)

2.1.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler etki spektrumlarına, etki mekanizmalarına, üretici organizmaya, biyosentez yoluna veya kimyasal yapısına göre sınıflandırılır. Çizelge 2.1’de antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmış şekli verilmiştir.

Çizelge 2.1 Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması (Berdy, 1974).

Aile	Kimyasal Gruplar
Karbonhidrat antibiyotikler	Saf sakkaritler Aminoglikozitler Diğ er C ve N glikozitler Değ iş ik ş eker tü revleri
Makrosiklik laktam antibiyotikler	Makrolit antibiyotikler Polien antibiyotikler Diğ er makrosiklik lakton antibiyotikler Makrolaktam antibiyotikler
Kuinonlar ve benzer antibiyotikler	Linear kondanse polisiklik bileş ikler Naftakuinon tü revleri Benzokuinon tü revleri Ç eş itli kuinon benzeri bileş ikler
Aminoasit, peptit antibiyotikler	Aminoasit tü revleri Homopeptitler Heteromer peptitler Peptolitler Yüksek molekül ağı rlıklı lı peptitler
Azot iç eren heterosiklik antibiyotikler	Kondanse olmamış heterosiklikler Kondanse heterosiklikler Antibiyotik etkili alkaloidler
Oksijen iç eren heterosiklik antibiyotikler	Furan tü revleri Piran tü revleri Benzopiran tü revleri Kü ç ük laktonlar Polieter antibiyotikler

Çizelge 2.1 devamı

Alisiklik antibiyotikler	Siklolakton türevleri Küçük terpenler Oligoterpen antibiyotikler
Aromatik antibiyotikler	Benzen bileşikleri Kondanse aromatik bileşikler Nan benzoid aromatik bileşikler Aromatik bileşiklerin farklı türevleri
Alifatik Antibiyotikler	Alkan türevleri Alifatik karboksilik asit türevleri S veya P içeren alifatik bileşikler

2.1.3 Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Bir antimikrobiyal ilaçta olması gereken en önemli özellik ‘seçici toksik’ etkisidir . Bu etki mikroorganizma ile insan yapı ve metabolizmaları arasındaki farklılıklarla sağlanır. Antibakteriyal ilaçların etki mekanizmaları temel olarak bu bölgelere yöneliktir ve dört türlü etki mekanizması olduğu kabul edilir.

1. Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu
2. Hücre membran işlevinin inhibisyonu
3. Protein sentezinin inhibisyonu
4. Nükleik asit sentezinin inhibisyonu

Bazı antibakteriyal ilaçların etki mekanizmaları Çizelge 2.2 de verilmektedir.

Bacillus türlerinin oluşturduğu antimikrobiyal maddelerin yapıları farklı olduğu gibi etki mekanizmaları da birbirinden farklı olabilir. Öyle ki, hücre duvarı sentezini bozan ya da hücre membranına zarar veren etkileri olan antimikrobiyal maddelerin yanı sıra protein sentezini engelleyen antimikrobiyal maddelerde sentezlemektedirler (Patel et al, 1995)

Çizelge 2.2 Bazı antibakteriyal ilaçların etki mekanizmaları (Ustaçelebi, 1999).

Etki mekanizması	İlaçlar
Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu	
Peptidoglukan sentezinde transpeptidasyonun inhibisyonu	Penisilinler, sefalosporinler, imipenem,
Peptidoglukan sentezinde diğer basamakların inhibisyonu	Vankomisin, basitrasin
Protein sentezinin inhibisyonu	
50S ribozomal alt üniteye etki edenler	Kloramfenikol, eritromisin,
30S ribozomal alt üniteye etki edenler	Aminoglikozid, tetrasiklin
Nükleik asit sentezinin inhibisyonu	
Nükleotid sentezinin inhibisyonu	Sulfonamidler, trimetoprim
DNA sentezinin inhibisyonu	Kinolonlar
mRNA sentezinin inhibisyonu	Rifampin
Hücre membran işlevini değiştirenler	Polimiksin
Etki mekanizması bilinmeyenler	İzoniazid, metronidazol

2.1.4 Antibiyotiklerin Biyosentezi

Biyolojik aktiviteye sahip oligo ve polipeptid yapısındaki sekonder metabolitlerden bir kısmı ribozomal protein sentez sistemi tarafından üretilir. Bu sistem diğer bütün protein sentezinde kullanılan ribozomal mekanizma yardımıyla, bütün diğer proteinlerde bulunan standart aminoasitlerden oluşan yapıları üretir. Ribozomlarda protein sentezi birkaç aşamada gerçekleşir. Özetle bu aşamalar: genetik olarak kodlanan standart L-aminoasitler ve bunlara ait tRNA ve aminoasit-tRNA sentetazlardan oluşan ve gerekli enerjinin ATP hidrolizinden sağlandığı **aktivasyon aşaması**; mRNA'daki başlatıcı kodonun kalıp olarak kullanıldığı, N-formilmetionil tRNA ve çeşitli başlatıcı faktörlerin rol aldığı, enerjinin GTP hidrolizinden sağlandığı **başlama aşaması**, yine mRNA'nın kalıp olarak kullanıldığı, kodonlar tarafından belirlenen aminoasit tRNA'ların ve çeşitli uzama faktörlerinin rol aldığı, gerekli enerjinin GTP hidrolizinden sağlandığı **zincir uzama aşaması**; mRNA'daki zincir sonlanma kodonu ile belirlenen, polipeptid serbest bırakıcı faktörlerin kalıp olarak kullanıldığı, ATP hidrolizinin eşlik ettiği **sonlanma ve ribozomlardan bırakılma aşamalarıdır**. Bu aşamalardan sonra oluşan polipeptid özgül üç boyutlu yapısını alacak şekilde katlanır ve çeşitli enzim ve kofaktörlerin rol aldığı sentez sonrası modifikasyonlar yardımıyla olgun protein molekülü oluşur.

Ribozom dışı sistemde ise, peptidler yüksek molekül ağırlıklı multienzimler (ribozom dışı peptid sentetazlar) aracılığıyla yağ asiti sentezine benzer bir mekanizma ile sentezlenirler. Ribozom dışı sentez mekanizmasında da aktivasyon, başlama, zincir uzaması ve sonlanma aşamaları bulunmasına ve gerekli enerji ATP hidrolizinden sağlanmasına rağmen, kalıp görevini mRNA yerine peptid sentetazlar üstlenir ve oluşan ürünlerde standart L-aminoasitlere ek olarak D-aminoasitler, çok çeşitli sıra dışı ve modifiye aminoasitler ve yağ asitleride bulunur (Büber, 2004).

2.1.5. Antibiyotiklerin Kullanıldığı Alanlar

Genellikle antibiyotikler, kimyasal tedavide kullanılmak üzere, antimikrobiyal etkili madde olarak üretilirler. Ayrıca antibiyotikler çiftlik hayvanları ve tavukçuluk ve bitkilerdeki hastalıkların tedavisinde, çiftlik hayvanları ve tavukçulukta ağırlık artışının geliştirilmesinde, besinlerin muhafazasında, biyokimyasal ve kültür ortamlarında seçici ajan olarak kullanılmaktadır.

Bugün çok sayıda antibiyotik, tehlikeli etkileri olan bakteriyal, fungal, viral enfeksiyonlara, böceklerin ve diğer parazitlerin neden olduğu hastalıklara karşı; hatta, rekabetçi otlara karşı kültür bitkilerini korumak için tarımda kullanılmaktadır (Denizci, 1996)

2.1.6. Antibiyotiklerin Ekonomisi

Günümüzde antibiyotikler ticari olarak üretilen en önemli ürünler grubu içindedirler ve ilaç piyasasının yaklaşık %15'ini kapsamaktadır. Bir çok endüstriyel fermentasyonlarda onların ürünleri gerçekte düşük olmasına rağmen, tedavi etkilerinin yüksek olması ve yüksek ekonomik değere sahip olmaları nedenleriyle ticari olarak fermentasyon yolu ile üretilirler. Bir çok antibiyotik kimyasal olarak sentezlenir, fakat kimyasal açıdan kompleks oluşturmaları ve kimyasal sentezlerinin pahalıya mal olması bu sentezin mikrobiyal fermentasyonun yerine geçmesini önler. Ekonomik olarak 100.000 ton/yıl antibiyotik üretilmekte ve bunların satış değeri yaklaşık 5 milyar dolar tutmaktadır.

Türkiye'de fermentasyon yolu ile antibiyotik üretimi özel sektör tarafından geliştirilmekte olup gentamisin üretimi 2 ton/yıl ve tetrasiklin üretimi 80 ton/yıl

aşmıştır. Ülkemizde fermentasyonla antibiyotik üretiminde başta gelen bir kuruluş olan ve ANSA A.Ş. uzun yıllar tetrasiklin ve türevlerini ve 1980’li yılların başında da, gentamisin üretimini gerçekleştirmiştir. Aynı tesiste Deva Holding A.Ş. 1994 yılından itibaren potasyum klavulanat üretimine başlamıştır. Diğer bir kuruluşumuz olan Eczacıbaşı Holding gentamisin üretimini 1990’lı yılların başına kadar sürdürmüş olup tekrar faaliyete geçmiştir (Tübitak, 1985; Tüba-Tübitak-TTGV, 1995).

2.1.7 Antimikrobiyal İlaçlara Direnç

Direnç, bir mikroorganizmanın antimikrobiyal etkenin öldürücü veya üremeyi engelleyici etkisinden korunabilme kapasitesidir. Bakteri türlerinde antibiyotik direncinin günümüzdeki anlamıyla kemoterapi başlamadan önce de bulunduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, direnç gelişimi ve yayılımı genellikle yaygın ve gereksiz antibiyotik kullanımına bağlanmasına rağmen, büyük bir olasılıkla toprak ve suda bulunan mikroorganizmalar tarafından doğal antibiyotiklerin sentezlenmesi kadar eskidir. Tarihteki ilk direnç mekanizması, bir *Escherichia coli* suşundaki penisilini parçalayan bir enzim varlığını gösteren Abraham ve Chain tarafından bildirilmiştir. 1944 yılında, Kirby, *Staphylococcus aureus* suşlarından benzer özelliklerde bir başka enzim elde etmiştir. Bu bilgilerden de anlaşılacağı gibi penisilinin yaygın olarak kullanılmaya başlamadan önce, hem gram negatif hem de gram pozitif mikroorganizmalarda bu ajana karşı direnç saptanmıştır. Bunun yanı sıra, yine 1940’lı yıllarda Gardner ve arkadaşları, antibiyotiklerin hiç kullanılmadığı bazı adalarda da toprak ve dışkı örneklerinde tetrasiklin ve streptomisine dirençli bakteriler bulunduğunu belirlemişlerdir. Bütün bunlar antibiyotik direncinin sadece yaygın antibiyotik kullanımının bir sonucu değil, bakterinin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma sürecinin bir parçası olduğunu göstermektedir (Ustaçelebi, 1999).

Bunları izleyen yıllarda ise, antibiyotik kullanımının etkileri görülmeye başlanmıştır. 1959 yılında, Japonya da *Shigella dysenteriae* suşlarında çoklu antibiyotik direnci saptanmış ve direnç özelliği konjugasyon ile *E. coli* suşlarına aktarılabilmektedir. Direnç sorunundaki artışa paralel olarak, ilaç endüstrisi ilerlediği için tüm antimikrobiyal maddelere dirençli mikroorganizmalar meydana gelmeden, genişletilmiş

spektrumlu sefalosporinler ve florokinonlar geliştirilmiş ve infeksiyon sağtımında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak günümüzde bu antibiyotiklere karşı direnç geliştiği de görülmektedir. Örneğin *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia* ve *Enterobacter faecium* gibi bakteri türlerinin günümüzde kullanılan tüm antibiyotiklere dirençli olduğu görülmektedir. Antimikrobiyaller ile mikroorganizmalar arasındaki savaşın kaybedilmemesi için, dirençli bakterilerin yayılımının önlenmesi ve yeni direnç mekanizmaları veya antimikrobiyaller için yeni hedefleri belirleyecek araştırmalara hız verilmesi gerekmektedir.

Antimikrobiyal ilaçlara direnç mekanizmaları aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleşir.

1. İlacın hedefine ulaşamaması:
2. İlacı inaktive eden enzimlerin üretimi
3. İlacın bakteri hücreindeki hedefinin değiştirilmesi
4. İlacın hedefinin dışında yeni bir metabolik yolun kullanılması (Ustaçelebi, 1999)

2.1.8 Antimikrobiyal İlaçlara Direncin Genetik Temelleri

Antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması ve yayılımı ile ilgili bir çok faktör arasında üçü ön planda gelmektedir.

1. Sık rastlanan direnç genlerinde, direnç spektrumlarını genişletecek mutasyonların oluşması
2. Mikroorganizmalar arasındaki genetik bilgi aktarımı ve böylece direnç genlerinin yeni konaklara geçmesi
3. Hastaneler gibi dirençli mikroorganizmaların çoğalabileceği ortamlarda antibiyotik veya dezenfektanların seçici baskısı

İlk iki faktör mikroorganizmaların çevreye uyum sağlama yeteneklerini, sonuncusu ise çevre şartlarının yeni fenotiplerin gelişimini nasıl etkileyebildiğini göstermektedir (Ustaçelebi, 1999).

2.1.9 Hastane Enfeksiyonlarına Yol Açan Bakteriler

Hastane enfeksiyonları, hastanın hastaneye yatış nedeninin dışında gelişen en erken 48-72 saat sonra ortaya çıkan enfeksiyonlardır. Onar yıllık aralarla, hastane enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmalarda değişiklikler gözlenmiştir. 1940'lı yıllara kadar hastane enfeksiyonlarının en başta gelen nedeni *Streptococcus*'lardır. Antibiyotiklerin kullanım alanına girmesiyle hastane enfeksiyonu etkeni olarak *Staphylococcus*'lar ön plana çıkmıştır. 1960-1970'li yıllarda penisilinlere dirençli stafilocoklara etkili antibiyotiklerin kullanımının artmasıyla, *Enterobacteriaceae* familyasındaki *E. coli*, *Kebsiella* sp. *Proteus* sp, *Enterobacter* sp, *Citrobacter* cinsleri ve *Pseudomonas aeroginosa* gibi gram negatif basiller ön plana çıkmıştır. Ancak 1980'li yılların başlarından itibaren tekrar gram pozitif kokların, hastane enfeksiyonu olarak önemlerinin arttığını görüyoruz. Yaygınlıklarının artışında metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarının yanı sıra koagülaz negatif stafilocoklar ve enterobakterlerin büyük pay sahibi olduğu saptanmıştır (Ustaçelebi, 1999).

2.1.10 Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık deneyini uygulayan A. Fleming olup bu yöntemde bir petri kutusunda agarlı bir besiyerini, tam ortadan değil kenara çok yakın bir yerden, dik olarak kesmiş ve bir şerit halinde dışarı almıştır. Açılan bu boşluğa küf özütü (penisilin gibi) içeren besiyerini yerleştirmiş daha sonra bu boşluğa dik bir açıda paralel olarak değişik bakteri kültürleri (*Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptococcus* vb.) yayma yöntemi ile inoküle etmiştir. İnokulasyondan sonra kültürlerin üreme ve inhibisyon zonlarını gözleyerek duyarlılıklarını değerlendirmiştir (Beşe, 1989).

İkinci dünya savaşı sırasında birçok değişik antibiyotik bulunmuş ve değişik mikroorganizmalara karşı duyarlılık modelleri saptanmıştır; yeni antibiyotikler medikal uygulamada olağanüstü ilaçlar olarak kabul edilmiştir. Ancak dirençli bakteriyal suşların ortaya çıkmasıyla yeni önlemlere gerek duyulmuş ve bakterilerin *in vitro* kemoterapötik maddelere karşı olan dirençlerini tayin için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Beşe, 1989).

Foster ve Woodruff, duyarlılık testlerinin uygulamasında, ilk kez antibiyotik emdirilmiş filtre kağıtlarının kullanılmasını önermişlerdir. Araştırmacılar, duyarlılığı

test edilecek organizma ile önceden inokule edilen petri kutusundaki besiyeri üzerine antibiyotik emdirilmiş bir şeridi yerleştirerek duyarlılık testini yapmışlardır. Vincent, antibiyotik çözeltisini kağıt disklerde kurutulduktan sonra kullanılabileceğini ve böylece taze stok çözeltilere her zaman gereksinim duyulmayacağını göstermişlerdir. Bondi (1947), ilk kez farklı disklerde kullanılacak antibiyotiklerin değişik konsantrasyonlardaki uygulama standartlarını saptamışlar ve böylece infeksiyöz hastalıkların tedavisinde uygulanacak klinik uygulamaların ilk kurallarını geliştirmişlerdir. İlk disk duyarlılık testi ile kantitatif sonuçların elde edilememesi, bir eksiklik olarak kabul edilmiştir. 1953 yılında Schneierson, 2 tüplü yarı kantitatif bir sıvı besiyeri testi geliştirmiştir. Bu testte tüplerden biri nispeten yüksek konsantrasyonda antibiyotik içerirken, diğer bir tüp düşük konsantrasyonda antibiyotik içerir. Yüksek derece dirençli (dayanıklı veya dirençli) bir mikroorganizma her iki tüpte ürer. “Orta derecede duyarlı olan mikroorganizma ise, sadece düşük antibiyotik konsantrasyonlu sıvı besiyeri içeren tüpte ürer. Yüksek derecede duyarlı olan bir mikroorganizma, antibiyotiğin düşük konsantrasyonu ile bile inhibe edilerek iki tüpte de üreyemez. Bu test daha sonra düşük ve yüksek konsantrasyonlu “iki disk” testi halinde değiştirilmiştir; dirençli mikroorganizmalar her iki diskin kenarlarına dek ürer, “duyarlı” mikroorganizmalar, disklerin çevresinde üreyemez ve her iki diskin etrafında üreme inhibisyon bölgeleri gözlenir. Orta derecede “intermediate” duyarlılıktaki mikroorganizmalar ise antibiyotiğin daha yüksek konsantrasyonunu içeren disk ile inhibe edilirler. 1960’lı yıllara dek mikroorganizmaların ilaç duyarlılık, özellikle de antibiyotik duyarlılık testleri için bir çok yöntem (difüzyon ve titrasyon yöntemleri) veya bu yöntemlerin değişik bir çok modifikasyonu bildirilmiştir. Her yöntemin bazı avantajları ve kullanım sınırlılığı gibi dezavantajları vardır. Sonuçların en yüksek derecede verimlilikle yorumlanabilmesi için yöntemin tüm özelliklerinin iyi kavranılması ve yöntemin sürekli yenilenebilir sonuçlar vermesi gereği göz önünde tutulduğunda, bir standardizasyonun saptanmasına gerek duyulmuştur. İlk kez 1970’li yıllarda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) önderliğinde, Anderson ve Bauber-Kirby’nin yöntemlerindeki standart aşamalar dikkate alınmak sureti ile, Uluslararası İşbirliği Çalışma Kurulunca bir standardizasyona gidilmiştir (Beşe, 1989; Yıldız, 2003).

2.1.11 Antimikrobiyal Madde Üreten Mikroorganizmalar

Şimdiye kadar bilinen 12.000 antimikrobiyalın %55'i Actinomycetes'lerin *Streptomyces* cinsinden, %11 diğer Actinomycetes'lerden, %12 bakterilerden ve %22 funguslardan elde edilmektedir. 1990'larda mikroorganizmalardan yılda 200-300 yeni biyoaktif ürün elde edilirken, 1997'de bu rakamın 500 olduğu bildirilmektedir. Buna rağmen, sürekli olarak yeni antibiyotiklerin keşfedilmesi beklenmekte ve bu sebeple de *Streptomyces*, *Bacillus* ve *Penicillium* gibi birkaç cinse ait türler antimikrobiyal madde üretme yetekleri bakımından sürekli incelenmektedir (Demain, 1999)

Araştırmacılar, 1980'li yıllarla birlikte, ekstrem çevrelerden optimum gelişme gösteren mikroorganizmalara ilgi göstermeye başlamıştır. Günümüzde genetik mühendisliği teknikleri ile yeni antimikrobiyallerin üretilmesinin mümkün olabileceği düşünülse de şu anda bunun için kullanılan başlıca yol "eleme yöntemi" dir. Bu yöntemde mikrobiyolog, farmakolog, biyokimyager, moleküler biyolog, doktor, veteriner gibi bilim adamları birlikte çalışmaktadırlar. Eleme sonucunda ilk olarak, antimikrobiyal madde ürettiği belirlenen izolatların ürettiği antibiyotiklerin yeni olup olmadığı kontrol edilerek, mikroorganizmanın yeni bir antibiyotiği ürettiği belirlendikten sonra bu antibiyotik büyük miktarlarda üretilip saflaştırılarak hayvanlar üzerinde test edilmektedir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

2.2. *Bacillus* Cinsi

Endospor oluşturan *Bacillaceae* familyası gram negatif anaerop bakterilerden (*Desulfotomaculum* cinsi) gram pozitif aerop koklara (*Sporosarcina* cinsi) kadar değişebilen bir yelpaze içinde farklı özellikleri gösteren, çeşitli bakteri cinsleri içermektedir. *Bacillus* ve *Clostridium* bu familyanın temel cinslerini oluşturmaktadır.

Bacillus cinsi gram pozitif olup vejetatif formları düz, kenarları birbirine paralel, ucu yuvarlak veya küt biten basillerdir. Tek tek veya uzun zincirler şeklinde görülürler. Aerobik veya fakültatif aneorobik olup oksijen terminal elektron akseptörüdür.

Koloni morfolojisi ve boyutları çok çeşitlidir; bazı ortamlarda pigment üretilebilir. Fizyolojik özelliklerinde geniş bir farklılık gösterir. Mezofilik cinsler çoğunluğu oluştururken, zorunlu termofil, psikrofil, asidofil ve alkalofiliktir. Bazı suşları tuza

toleranslı iken bazıları tuz için spesifik gereksinimlere sahiptir. Katalaz çoğu tür tarafından oluşturulur. Oksidaz pozitif veya negatiftirler (Sneath et al., 1986).

2.2.1 Koloni Morfolojisi

Bacillus türlerinin yüzey kolonilerinin ortaya çıkması çevresel faktörlerle yakından ilgilidir. Bunlar kültür ortamına ilave edilenler kadar (besiyeri içeriği, inkübasyon sıcaklığı, nem, vs.) kültürün kendi gelişmesi ile ortamda meydana gelen değişikliklerin sonuçlarını da içerir. Tutarlı olarak sadece küçük koloniler oluşturan suşlar dışında, koloni boyutları, petri kaplarına konan besiyeri miktarı ve besin faktörlerinin konsantrasyonu kadar, agar plağında oluşan kolonilerin sayısına da büyük ölçüde bağlıdır. *Bacillus* türlerinin kolonilerine ait bir tanımlama Smith ve arkadaşları (1952) tarafından verilmiştir. Çoğu *Bacillus* türlerinin suşlarına ait kolonilerini kanlı agar plağı üzerinde gösteren bir renk atlası Parry ve arkadaşları tarafından 1983'de yayınlanmıştır (Sneath et al., 1986).

Koloni morfolojisindeki aşırı varyasyonlar, *B. subtilis* ve bağlantılı türler ile sık sık gözlenebilir. Örneğin *B. pumilus* ile 25 varyantlı düzgün ve pürüzlü koloniler gözlenmiştir. *B. subtilis* türünün koloni varyantları, her ne kadar çoğunlukla yüksek oranda düzensizse de, fevkalade bir simetri derecesi gösterebilir. *B. mycoides* suşları ile bir çok özel koloni yapısı gözlenir ve 48 saat içinde plağı kaplayan bir rizoid büyüme gösterirler (Gordon et al., 1973).

Bazı *Bacillus* türleri katı besiyerinde koloniler halinde toplanma eğilimindedirler, özellikle inokülasyondan önce agar plakları yüzey nemliliğini gidermek için kurutulmazsa koloni göçü kümeleşmenin özel bir tipi olarak düşünülür. Kolonilerin hareketi 50 kat büyütmede kolaylıkla gözlenebilir. Ağırlıklı olarak saat yönünde, 15 kavisli veya spiral bir rotada göç ederler. Bunun bir sonucu olarak plaklar sıklıkla 1 veya 2 gün içerisinde büyüme gösterir. Tek bir plakta saf kültür kolonileri bazen yarı saydamlık çok yada az beyazımsı veya krem renklidirler. Bu, kolonilerdeki sporulasyonun farklı derecelerine bağlıdır (Sneath et al., 1986).

Çoğu *Bacillus* türleri pigmentsizdir. *B. megaterium*'un bazı suşları özellikle kazein agarda sarımsı bir pigment oluşturur. Sarı pigment ayrıca *B. fastidiosus* kolonilerinde, allantoin agarda uzun süreli inkübasyon sonucu bulunur. Smith ve arkadaşlarına (1952)

göre *B. firmus* (pembe), *B. licheniformis* (kahverengimsi kırmızı) *B. pumilus* (açık sarı) *B. pulvifaciens* (soluk sarıdan kırmızıya, turuncu) *B. sphaericus* (pembe) ve *B. subtilis* (pembe, sarı, turuncu, kahve)'te bazı pigmentli varyantlar gözlenmiştir. Pigmentler tüm ortamlarda üremeyebilir. *B. subtilis sub sp. aterrimus* yalnızca kullanılabilir karbonhidrat varlığında mavi-siyah bir pigment oluşturur, seri transferler sonucu özellik kaybedilebilir (Gordon et al., 1973).

Tirozin agarda, siyah pigmentler, *B. carotarum* gruba dahil *B. megaterium* suşlarınca ve *B. subtilis sub sp. niger* tarafından oluşturulur. Sonuncu organizmada bu özellik tamamen kaybedilir (Gordon et al., 1973). *B. cereus* ve *B. subtilis*'in bir çok suşunun sarımsı florasan özelliği gösteren yeşil bir pigment salgıladıkları bulunmuş ve *B. mycoides* suşları ise sarı, yayılabilir bir pigment ürettiği bulunmuştur. Karasal izolatların tersine, tuzlu bataklık topraklarının örneklerinden geliştirilen *Bacillus* kolonilerinin yüksek bir oranı sarı, turuncu, kahve veya pembe pigmentler oluşturur (Sneath et al., 1986).

Çoğu diğer bakterilerin aksine eksponansiyal fazın sonunda veya vejetatif olan hücreler zengin bir ortamdan fakir bir ortama transfer edildiğinde dinlenen hücre formuna geçebilir. Dinlenen hücreler intraselüler olarak şekillenir ve bu yüzden endospor olarak isimlendirilir. Endosporlar şekillendiğinde onların dirençlilik derecesi çoğunlukla çevresel şartlara bağlıdır. *Bacillus* suşları bütün kültürel şartlar altında endospor oluşturmazlar. Taksonomik bakış açısında bu çok önemlidir. Çoğu *Bacillus* suşları nutrient agar içindeki 10-50 mg mangan içeren ortamda endospor oluştururlar. Fakat replike platingden sonra bu özelliklerini kaybederler veya çok az oranda spor oluştururlar. Endospor oluşumuna etki eden diğer faktörler ise; ortamın pH'sı, gelişme sıcaklığı, ortamın havası, misellerin varlığı bazı karbon veya azot bileşiklerinin varlığı, azot veya karbon kaynağının konsantrasyonunu içerir (Sneath et al., 1986).

2.2.2 Hücre morfolojisi

Bacillus hücreleri teker teker veya oldukça uzun zincirler halinde ortaya çıkabilir. Çubuklar yuvarlak veya köşeli uçlara sahip olabileceği gibi oldukça küçük (0.5x1.2µm) veya nispeten büyük (2.5x10µm) olabilir. Hücreler parasporal cisimcikler veya protein kristalleri içerebilir. Endosporun şekli ve spor taşıyan hücrenin (sporangium) şekli

Bacillus türlerinin karakteristik bir özelliğidir. Endospor çoğunlukla silindirik, elipsoidal, oval veya yuvarlaktır, fakat belirli türlerin bazı suşları böbrek veya muz şekilli endosporlar üretir. Spor sporangium içinde sentral, parasentral, subterminal, terminal veya lateral pozisyonda yerleşebilir. Endospor oluşumu sırasında ana hücre şeklini değiştirmeyebilir veya şişebilir (Sneath et al., 1986).

Gordon ve arkadaşları (1973) çalıştıkları suşları, sporların şeklini ve sporangiumun şişmesini temel alan üç gruba ayırmışlardır. **Grup 1**, sporangiumun şişmesine neden olmayan elipsoidal sporlara; **Grup 2**, sporangiumu şişiren elipsoidal sporlara; **Grup 3**, sporangia'yı şişiren küresel sporlara sahip olanlar

Olgun endosporlar, lizisin bir sonucu olarak sporangiumdan serbest bırakılırlar. Bazı türlerin herhangi bir kültüründe sferik ve elipsoidal sporlar görülebilir. Spor kılıfı iyi belirlenmiş izlere sahip olabilir ve bazısında ekzosporium mevcut olabilir. Bazı suşlarca, belirli koşullar altında kapsül sentezlenebilir.

2.2.3 Taksonomisi

Bacillus türleri, aerob, sporlu basiller grubunda bulunurlar ve özellikle taze kültürleri gram pozitif boyanır. İlk önce Ehrenberg tarafından 1835 de *Vibrio subtilis* olarak tanımlanmıştır. 1872'de Cohn tarafından *Bacillus subtilis* olarak tekrar isimlendirilmiştir (Gordon, et al., 1981). Koch ilk olarak *Bacillus anthracis*'in spordan vejetatif forma, vejetatif formdan spora dönüşüm siklusunu açıklamıştır (Keynan and Sandler 1983).

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986) endospor oluşturan Bacillaceae familyası bakterilerini 6 bölümde incelenmektedir. Bu familya üyelerini diğer endospor oluşturan bakterilerden ayıran özellikler; zorunlu veya fakültatif aerob, çubuk şeklinde ve genellikle katalaz pozitif olmalarıdır. Diğer endospor oluşturan gruplar ise; mikroaerofilik ve katalaz negatif olan *Sporolactobacillus*; *Clostridium*, anaerobik ve sulfatı kullanamayanlar, *Desulfotomaculum*; anaerobik fakat sulfatı kullanan, kok morfolojisine sahip olan *Sporosarcina* ve tipik aktinomiset özelliği gösterip endospor oluşturma yeteneğine sahip olan *Thermoactinomyces*'dir.

Bacillus türleri temel olarak toprakta bulunurlar, bitki materyallerini ve diğer besinlerin üzerinde büyüyebilmelerine olanak sağlayan çeşitli biyopolimerleri parçalayan enzimlere sahiptirler. Çoğu türü spor oluşturur, sporların incelenmesinde örnekler yaklaşık olarak 80°C'de 10 dakika ısıtılarak uygun bir besiyerinde sporların gelişmesi ve germinasyonu incelenebilir. Yüksek organik içerikli topraklarda zor gelişen *Bacillus polymyxa* grup üyelerinin görülmesiyle birlikte, çoğunlukla toprakta *B. subtilis* ve *B. sphaericus* grubu üyeleri bulunur. *Polymyxa* grubunun bazı üyeleri bitki kökleri ile yakın ilişkiindedir. Bazı türler (*B. azotofixans*, *B. macerans* ve *B. polymyxa*) anaerobik şartlar altında azot fiksasyonu yapar. *B. subtilis*'in bazı suşları rizobakteriler olarak kategorize edilirler. Bu cinsin üyeleri termofilleri, psikrofilleri, alkalofilleri ve asidofilleri içeren olağanüstü metabolik çeşitlilik gösterirler. Bu cinsin metabolik çeşitliliği, genetik çeşitlilikleri ile eşleştirilir. Genomik DNA'nın G+C içeriği %33 ila 67 arasında değişmektedir (Demain and Davies, 1999).

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

Grup I, *B. polymyxa* grubu olarak bilinir, diğer *Bacillus* türleriyle çok az benzerlik gösterirler ve sporları elipsoidal ve sporangiumdan şişkindir. Fakültatif anaeropturlar, ya karışık yada butandiol fermentasyonu yaparlar, şeker ve polisakkaritler üzerinde gelişebilirler.

Grup II, temel olarak *B. subtilis*'e dayanır ve daha iyi bilinen *Bacillus*'ları içerir. Sporangiumdan şişkin olmayan elipsoidal sporlar oluştururlar. İlave bir elektron akseptörü olmadan fermentatif olarak büyüeyebilen *B. licheniformis* gibi fakültatif anaeroplara ve *B. subtilis* gibi oksijen yokluğunda nitratı, alternatif elektron akseptörü olarak kullanılıp, zayıf bir gelişme gösteren aeroplara içerir.

Grup III, temel olarak *B. brevis*'e dayanır. Zorunlu aeropturlar, oval endosporlar oluştururlar, endosporlar sporangiumdan şişkindir.

Grup IV, *B. sphaericus* ve diğer küresel endospor oluşturan türleri içerir. *Bacillus*'lar arasında hücre çeperinde lizin yada ornitine bağlı mezodiaminopimelik asite sahip olmalarıyla tektirler.

Grup V, kemolitotrofik ototrofları içeren, çeşitli tipte enerji metabolizmalarına sahip termofilleri içerir.

Grup VI, *B. acidocaldarius* ve *Alicyclobacillus* olarak yeniden tayin edilmiş olan diğer asidofilik termofilleri içerir (Demain and Davies, 1999).

2.2.4 Hücre Çeperi ve Zarı

Bacillus cinsi suşlarında baskın olan murein tipi düz bağlanmış mezo-diaminopimelik asittir (mezo-DAP). Bununla birlikte, 34 bilinen türün yalnızca 17 tip suşu peptidoglukan bileşimi bakımından çalışılmıştır. *B. sphaericus*'un 5 suşu murein tipi, Hungerer ve Tipper'in daha önceki bir çalışmasını doğrular bir şekilde L-Lys-D-Asp tipe aittir. *B. sphaericus* tip suşu dahil edilmemiştir. *B. pasteurii* ve *B. sphaericus* sporlarının peptidoglukanında mezo-DAP bulunmuştur. *Bacillus*'ların hücre çeperi, hücre yüzeyini tamamıyla örten yüzey katmanı parakristalin oluşturur. *Bacillus* türlerinde hücre çeperindeki peptidoglukana ek olarak büyük miktarlarda anyonik polimer olan teikoik asit veya teikronik asit bulunur. Bu asitlerden hangisinin ortamda bulunacağı magnezyum ve fosfat seviyesine bağlıdır. Eğer ortamda fosfat yoksa teikoik asit yerine teikronik asit sentezlenir. Hücre çeperi peptidoglukan olan çoğu türü doğrudan çapraz bağlı mezo-diaminopimelik asit tipe aittir. Ana izoprenoid quinon, 7 izopran birime sahip bir menaquinondur. Uçta metil bağlı 12'den 17 karbona sahip iso ve antiiso yağ asitleri baskındır. En sık ortaya çıkan fosfolipitler, fosfatidiletanolamin ve fosfatidilgliseroldür. Çoğu türü doğada geniş bir alanda dağılır. Pasif dağılımı ve sporların dayanıklılığından dolayı, varlıkları doğal habitatla mutlaka bağlantılı değildir (Sneath et al., 1986; Ustaçelebi, 1999).

2.2.5 Kapsül Yapısı

Birçok *Bacillus* türü levan ve dekstran karbohidrat kapsüllerini üretir. Örneğin *B. circulans* bir glukoz ve glukuronik asit ekstrasellüler polimeri oluşturur. Bu yapıların üretilmesi ve kimyasal yapıları, taksonomilerinin belirlenmesinde herhangi bir öneme

sahip değildir. *B. megaterium*, hem polipeptid hemde polisakkarit içeren bir kapsül sentezleyebilir. *B. circulans*'ın kapsülü rutenyum kırmızısı ile boyama tekniği kullanılarak incelendiğinde fibrilli olarak gözlenir (Sneath et al., 1986).

2.2.6 Kamçı

Çoğu *Bacillus* türleri peritrik flegellaya sahiptir. Kamçıya sahip olma bu cinstaki taksonomik olarak önemli değildir. *B. anthracis* normal olarak hareketsizdir fakat bir hareketli suşu tanımlanmıştır. *B. cereus* hareketlidir fakat hareketsiz suşları ile bazen karşılaşılabilir (Sneath et al., 1986).

2.2.7 Spor Yapısı ve Oluşumu

Bacillus cinsinin bir özelliği de endospor oluşturmasıdır. Endosporlar, gama ışınları, UV ışınları, sıcaklık, kuraklık, oksidasyon ajanlarına karşı yapıları gereği canlı kalırlar (Setlow, 1995).

Sporun şekli, sporangium içindeki pozisyonu taksonomik olarak önemlidir. İlaveten elektron mikroskobu ile incelendiğinde spor yüzeyinin durumu bazı türlerin özelliği olarak ortaya çıkar. Bununla birlikte *B. megaterium*'un 10 suşunda 3 yüzey örneği tanımlanmış ve belirli bir taksonomiye yerleştirme için yüzey oluşumunun yeterli bir kaynak olmadığını karar verilmiştir (Sneath et al., 1986).

Sporlar zor boyanırlar ve refraktirdirler. Sporulasyon besin kaynaklarının (C, N, P) kullanılamaz hale gelmesi ile başlar. Sporulasyon süresinde vejetatif hücre yapılarının çoğu kaybolur. Spor içinde gerekli bir çok yeni yapı, enzimler ve metabolitler oluşur. Sporulasyon oluşumunu belirleyen genler aktive olurken vejetatif hücre fonksiyonunu sağlayanlar inaktive olurlar. Sporulasyon başlangıcında bakteri kromozomu uzun eksen boyunca düz bir çizgide yerleşir ve spor içinde yer alacak bölümü hücrenin bir ucuna doğru yoğunlaşır. Daha sonra sitoplazmik membran çift tabaka oluşturacak şekilde hücre içerisine uzanarak ön spor septumunu oluşturur. Spor içinde kalacak kromozom parçasını tamamen sarar ve bakteriyi asimetric bir şekilde böler. Peptidoglikan içermeyen bu bölme spor bölmesi adı verilir. Spor, spor zarfı ve kor olmak üzere iki bölümden oluşur.

Ön sporu çevreleyen iki katlı membrandan spor zarfı gelişir. Spor hacminin yarısından fazlasını kapsayan spor zarfının içerdiği tabakalar sırasıyla şunlardır: **Germ hücre membranı** (iç membran); spor protoplazmasını (kor) çevirir, yani sporun en içte bulunan bölümüdür. Kromozom ve protoplastı içermekte olup germ hücre membranı ile çevrilmiştir. Büyük miktarda kalsiyum dipikolinat içerir. Sporun ısıya direnci suyun azlığına ve kalsiyum dipikolinat içermesine bağlıdır. **Korteks**; germ hücre membranının dışında yer alan kalın konsantrik lameller yapıdadır. Korteksin dış yüzeyi zayıf bağlarla bağlanmış peptidoglikan yapısında olup germinasyon sırasında çözülerek vejetatif hücrenin hücre çeperi sentezinde rol oynar. Germinasyon sırasında korteksin germ hücre membranına komşu olan iç yüzeyi, içerdiği güçlü çapraz bağlarla sıvı giriş çıkışına engel olarak spor protoplazmasının ozmotik kararlılığını korur; **Kılıf**; korteksin dışında yer alır ve disülfid bağlarından oluşmuş keratine benzer bir protein yapısındadır. Kılıf geçirgen olmaması sebebi ile sporları kimyasal maddelerin toksik etkilerinden korur, **Ekzospor**; gevşek bir lipoprotein yapısındadır. Bazı sporlarda bulunan ekzosporun işlevi henüz anlaşılamamıştır.

Bakteri sporlarının vejetatif forma dönüşme sürecine germinasyon (çimlenme) denir. Bu süreç aktivasyon, başlangıç ve büyüme safhası olmak üzere 3 aşamada tamamlanır.

Aktivasyon safhası; Bakteri sporları besin maddelerinden zengin ortamlarda çeşitli etkenlerle (asit, ısı, aşınma, serbest sülfid grubu içeren bileşikler) spor kabuğu tahrip olduğunda germinasyonu başlatır. **Başlangıç safhası**; germinasyona başlayan spor ortamında bulunan L-alanin, adenzin gibi aminoasitler spor otolizinlerini aktive ederler. Otolizinler peptidoglikan bağlarını bozarak kabuk yıkımını sağlar. Hidrolitik enzimlerle spora ait çeşitli yapılar parçalanır ve vejetatif form için gerekmeyen kalsiyum dipikolinat atılırken hücre içerisine su alınır. **Büyüme safhası**; Protoplastı ile kalan spor biyosentez periyoduna başlar ve bölünme işlevlerini başlatarak çoğalır (Ustaçelebi, 1999).

2.2.8 Ekoloji ve Habitatlar

Bacillus türlerinin çoğu, mesofilik sıcaklıklarda geliştirilebilir. *B. stearotermophilus* gibi zorunlu termofilik türler genellikle 60 °C'de gelişir. *B.*

coagulans gibi ılımlı termofiller ise 45-50 °C'de gelişir. *B. larvae* ve *B. popilliae* gibi daha müşkülpesent böcek patojenlerinin gelişimi için ortama tiamin ilavesi gerekir ve genellikle 25-30 °C'de gelişir. *B. pasteurii* ilave olarak % 0.5-1 oranında üre'ye gereksinim duyarken, *B. stearotermophilus* kalsiyum ve demir ilavesi gerektirir (Sneath et al., 1986).

B. subtilis ve pek çok diğer tür, azot kaynağı olarak amonyak ya da aminoasitleri, karbon kaynağı olarak glukoz ya da diğer basit şekerleri içeren basit tuz ortamında gelişebilirler. *B. subtilis* çok sayıda aminoasiti (arjinin, glutamin, glutamat, asparajin gibi) azot kaynağı olarak kullanabilir. Çoğu *Bacillus* türü kolaylıkla spor oluşturmaya rağmen, etkin sporulasyon için protokoller ve özel ortamlar gereklidir. Sporulasyon logaritmik büyümeden sonra oluşan besin eksikliği (genellikle karbon, azot, yada fosfat) ile indüklenebilir (Demain and Davies, 1999). Gramisidin S, tirosidin ve basitrasin gibi siklik peptidler ve iturin, basilomisin ve fengisin gibi lipopeptidler karakteristik sekonder metabolitler olup bu gurup tarafından sentez edilir (Gebhardt et al., 2002).

Havada kurutmaya, diğer stres koşullarına karşı endosporların dayanıklı olmalarından ve kötü koşullarda uzun süreli yaşama devam edebilmelerinden dolayı çoğu aerobik spor oluşturuçular her yerde bulunur ve çok çeşitli kaynaklardan izole edilebilirler (Sneath et al., 1986).

Belli habitatlarda çok sayıda *Bacillus* türlerinin var olduklarına dair bir çok kayıt vardır. Bununla birlikte, çoğu *Bacillus* izolatu havada kurutulmuş veya ısıtılmış örneklerden orjinlendiği ve metabolik olarak inaktif olan endosporlarından dolayı, habitat yaklaşımı yerinde olmayabilir. Başlıca *Bacillus* türlerinin, öncelikli habitatlarının, bakteriyal flora olarak düşünüldükleri yer olan toprakta olduğu kabul edilir. Kullanılabilir uygun bir substrat olduğunda, metabolik olarak aktif hale gelirler. *Bacillus* türleri bir seri biyopolimeri etkili bir şekilde parçalandığından dolayı, karbon ve azotun biyolojik döngüsünde önemli rol oynadıkları düşünülür. Aerobik spor oluşturuçular topraktan, toz ve diğer yollarla herşeyi kontamine edebilirler. Bunun gibi ikincil habitatlarda, polimerleri ve diğer kimyasal bileşikleri parçalamada önemli bir rol oynayabilirler. *Bacillus* türleri gıda bozucu organizmalar olarak özellikle önemlidir. Aerobik spor oluşturuçuların habitat ve ekolojileri üzerine çalışmalar çok sayıda araştırmacı tarafından incelenmiştir (Sneath et al., 1986).

Bacillus cinsinin aerobik endospor oluşturan türleri neredeyse tüm doğal habitatlardan ve çoğu diğer kaynaklardan izole edilebilir. Çoğunlukla karbon ve azotun biyolojik çevriminde önemli bir rol oynadıkları toprak ve bitki atıklarında bulunurlar. Tatlı su, kirli deniz suyu, derin deniz sedimentleri, gıdalar, süt, farmosötik, vb. diğer habitatlar bu organizmayı topraktan, yağışla, tozdan, enfekteli bitki materyali, vs.'den kazanabilmektedir. Bu gibi habitatlar, *Bacillus* türlerinin büyümesi için uygun şartlar sağlar veya fevkalade dayanıklılık ve kararlılık gücünden dolayı herhangi bir habitatda uzun zaman canlı kalabilen sporları koruyabilir. Böylece, her ne kadar bu genelleme dışında kalan pek çok istisnalar olsa da (örneğin. *B. acidocaldarius*, *B. marinus* gibi) *Bacillus* türünün izole edildiği bölgenin onun gerçek doğal habitatı olduğu yargısını öne sürmemiz genellikle mümkün değildir (Sneath et al., 1986).

2.2.9 *Bacillus*'ların Önemi ve Endüstriyel Kullanımı

Bacillus türlerinin ısıya, ışına ve dezenfektan maddelere dirençli sporlarının ameliyathanelere, cerrahi malzemelere, kozmetik ürünlere ve yiyeceklere bulaşması büyük sorunlara yol açmaktadır. Ameliyathane malzemelerinin sterilizasyonunun kontrolünde (*B. stearothermophilus* ve *B. subtilis*) ve basitrasın (*B. subtilis*, *B. licheniformis*) polimiksin (*B. polymyxa*) Gramisidin (*B. brevis*) gibi antibiyotiklerin üretiminde *Bacillus* türleri kullanılmaktadır. Bu antibiyotikler, fungusları (Utkhede and Sholberg, 1986), bakterileri (Zuber et al., 1993) ve böcekleri (Aranda et al., 1996) inhibe ederler.

B. cereus, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* türlerinin lesitinaz sentezledikleri koloni etrafındaki opak presipitasyon ile anlaşılır. Bazı böcek patojeni olan türlerde parasporal kristaloid cisimcikler bulunur. Bu inklüzyon cisimcikleri nutrient agar kültürlerinde malaşit yeşili veya buffalo siyahı ile boyandıktan sonra faz kontrast mikroskopla kübik, köşegen şekillerde görülürler. Bu özellik özellikle *B. thuringiensis* ve *B. cereus* ayırımında kullanılır (Ustaçelebi, 1999).

Bu cins içindeki bakterilerin çoğu patojen değildir. *B. anthracis* insan ve hayvanlarda, şarbon, enfekte gıdaların yenmesiyle etkenidir. Bu hastalık sporların, zedelenmiş deri mukozalar ve nadiren solunum yolu ile akciğerlerden organizmaya girmesi sonucu oluşur. *B. subtilis* toz, toprak, bitki ve hayvanlar ile süt ve sularda

bulunur. Saprofit olmakla birlikte doğrudan doğruya doku ve özellikle göz içerisine girmesi sonucunda göz yangılarını meydana getirir. *B. subtilis*'in besin zehirlenmesi yaptığından da şüphelenmektedir. *B. cereus* diyare, bulantı kusma olmak üzere iki türlü gıda zehirlenmesine yol açar. *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* ve *B. sphaericus*'un besin zehirlenmesine sebep olduğu belirtilmiştir. *B. stearothermophilus* ve *B. coagulans* konservelerde ekşimeye sebep olur (Buchanan, 1974; Logan, 1988; Bilgehan, 1995)

Bacillus türleri temel olarak toprakta bulunurlar, bitki materyallerini ve diğer besinlerin üzerinde büyüebilmelerine olanak sağlayan çeşitli polimerleri parçalayan enzimleri salgılayarak büyürler (Demain and Davies, 1999).

Bacillus türleri endüstriyel enzimlerin, saf biyokimyasalların, antibiyotiklerin insektisitlerin ve heterolog proteinlerin üretiminde güvenli bir şekilde kullanılan önemli bir kaynaktır. Bazı *Bacillus* 'ların proteolitik enzimleri peynir yapımında kullanılabilir.

Enzimler: Dünyada son zamanlarda endüstriyel enzimlerin kağıt, tekstil ve atık arıtımında yıllık pazarı 1 milyar dolardır. Bu pazarın 1/3'i doğal polimerleri hidroliz eden enzimleri, 2/3'ü deterjan, gıda deri endüstrisinde kullanılan proteolitik enzimler, 1/4'ü ise içecek destilasyon, nışaşa ve tekstil endüstrisinde kullanılan karbonhidrazları içerir. Bazı türler ise zayıf lesitinaz salgılayan türler olup ancak koloni uzaklaştırıldığı zaman görülebilir. *Bacillus* türlerinin çoğu bir veya birden fazla hemolizin içerirler (Demain and Davies, 1999).

***Bacillus*'ların antibiyotik üretimi:** Genel habitatları toprak olan, sporlu *Bacillus*'ların neden antimikrobiyal madde ürettikleri bilinmemekle beraber habitatlarındaki rekabete karşı antibiyotiklerin sağladığı antagonistik etki sayesinde bazı besin avantajlarına sahip oldukları sanılmaktadır. Ancak bunun yanı sıra, sporulasyon veya çimlenme ile ilişkili olan hormon veya sinyal moleküllerinin antibiyotik aktiviteye neden olabileceği de söylenmektedir. Mikroorganizmalarda sporulasyon ve ikincil metabolit üretimi arasındaki ilişki biyokimyasal ve genetik yollarla araştırılmaktadır. Bacillerde spor oluşumunun polipeptid antibiyotik üretimi ile doğrudan veya dolaylı olarak ilgisi belirlenmiştir. Sporulasyon sırasında serin proteazları oluşumunun antibiyotik üretimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bir çok araştırma peptid antibiyotikler üreten *Bacillus* suşlarında sporulasyon sırasında meydana gelen fizyolojik

değişikliklerin, antibiyotik üretimini düzenlediğini göstermektedir. Moleküler genetik çalışmalar *Bacillus*'larda bazı peptit antibiyotik biyosentez genlerinin endospor oluşumu olayını aktive eden operonda yer aldığını göstermektedir.

Bacillus cinsinin üyeleri sürekli kültürün geç logaritmik veya durgun fazın erken dönemlerinde sekonder metabolit olan antibiyotik üretirler. Aşağı yukarı 169 kayıtlı sekonder metabolit olup; örneğin *B. brevis* 23 antibiyotik üretirken *B. subtilis*'in çeşitli suşları 68 antibiyotik üretir. Diğer antibiyotik üretenler ise Çizelge 3.1'de verilmiştir. Antibiyotiklerin çoğu gram pozitif bakterilere etkili olup istisnalar da vardır. Büyük bir kısmı peptit antibiyotik olup diğer kimyasal sınıfları da içerir.

Çizelge 2.3 *Bacillus*'ların ürettiği bazı antibiyotikler (Sneath et al., 1986)

Türler	Antibiyotikler	Etki mekanizmaları
<i>B. subtilis</i>	Subtilin	Gram pozitif bakterilere
	Basilisin	Gram pozitif bakterilere
	Diffisidin	Geniş spektrumlu
	Oksidiffisidin	Geniş spektrumlu
	Basilomysin F	Antifungal
	Mikobasillin	Gram negatif bakterilere
<i>B. brevis</i>	Gramisidin S	Gram pozitif bakterilere
	Linear Gramisidin	Gram pozitif bakterilere
	Tirosidin	Gram pozitif bakterilere
<i>B. licheniformis</i>	Basitrasin	Gram pozitif bakterilere
<i>B. pumilis</i>	Pumilin	Gram pozitif bakterilere
	Tetain	Gram pozitif bakterilere
<i>B. mesentericus</i>	Esperin	Gram pozitif bakterilere
<i>B. polymyxa</i>	Polimiksin	Gram negatif bakterilere

Bacillus antibiyotikleri peptit yapısında olup çoğu durumda peptitler kısadır ve çokluenzim sistemleri ile ribozom dışı bir mekanizma ile sentezlenir. Aminoasit kalıntıları modifiye edilir. Gramisidin S, *B. brevis* türünden elde edilen antibakteriyal ve sürfektan özellikteki bir halkasal dekapeptittir. Basitrasin, *B. licheniformis*'ten üretilir ve bakteri hücre duvarı sentezini inhibe eder. Surfactin, *B. subtilis* in pek çok suşu tarafından hem antibiyotik hem de kuvvetli bir sürfektan olarak üretilir. Peptit

antibiyotikler temel olarak ribozomlarda sentezlenir ve sonra da translasyondan sonra modifiye edilir (Demain and Davies, 1999).

2.3 *Bacillus* cinsi Tanı Yöntemleri

Bakterilerin identifikasyonunda morfolojik özelliklerinden olan hücre şekli, hücre büyüklüğü, koloni morfolojisi, gram reaksiyonu, hareketlilik, endosporun şekli ve yeri, pigmentasyon özelliklerinden yararlanılır. Mikroorganizmaların fizyolojik ve metabolik özellikleri içerisinde mikroorganizma enzimleri ve transport proteinlerinin yapı ve aktiviteleri ile doğrudan ilgilidir. İdentifikasyonda, hücre çeperi yapısı, enerji kaynakları, fermentasyon ürünleri, oksijen istekleri, ikincil metabolitler, metabolik inhibitörlere ve antibiyotikler duyarlılık özelliklerinden yararlanılır. Ayrıca molekül yapılarına ait özellikler, proteinlerin karşılaştırılması, nükleik asit baz kompozisyonu, nükleik asit hibridizasyonlarından bakterilerin identifikasyonunda yararlanılır.

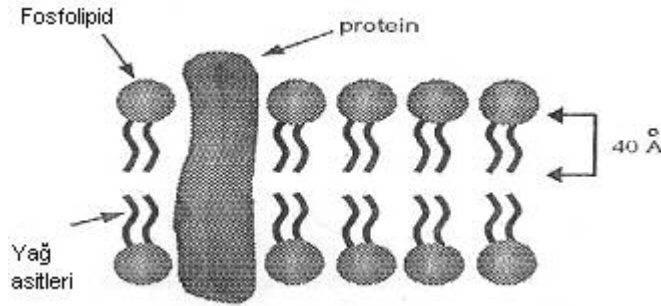
Norris ve ark. 1981 *Bacillus* cinsine ait tanısında iki morfolojik karakterden bahseder. Bunlar sporangium içindeki parasporal cisimcik ve çubuğun genişliğidir. Bunun yanında katalaz üretimi, Voges-Proskavur reaksiyonu, Voges-Proskavur pH'sı, anaerobik agarda gelişme, 50 ve 65°C'de gelişme, %7'lik NaCl'de gelişme, glikozdan asit ve gaz üretimi, nitratın nitrite redüksiyonu, nişasta hidrolizi ve kazein parçalanması ile türler tanılanmaya çalışılır (Ustaçelebi, 1999).

2.3.1. Biyokimyasal Özelliklere Dayalı Tanı (VITEK)

Çevresel yada ticari açıdan önemli yeni *Bacillus* izolatlarının tayini için güvenli metodlar geliştirmek kolay değildir. Geleneksel yöntemler morfolojik özelliklere dayanır ve iki dallı anahtarlar kullanılır, ancak bu büyük oranda yerini bilgisayara dayalı sistemlere bırakmıştır. Bunlardan bir tanesi API 50 CHB şerit diğeri VITEK'dir. VITEK aerobik şartlarda 31 klasik fenotipik testten oluşan alternatif bir sistemdir (Demain and Davies, 1999).

2.3.2. Hücre zarı yağ asitlerine Dayalı Tanı (FAME)

Bakteri identifikasyonunun diğer bir popüler yöntemi hücrelerin zar ve dış zar (gram negatif bakteriler) lipitlerinde bulunan yağ asidi çeşidi ve oranının karakterizasyonu ile yapılır.



Şekil 2.1 Prokaryotlarda hücre zarı yapısı

Prokaryotların yağ asit bileşimi çok değişkenlik göstermesi (zincir uzunluğuna göre yağ asitlerindeki farklılıklar, doymamış gurupların varlığı ve yokluğu, halkalar, dallanmış zincirler veya hidroksil gurupları gibi) nedeniyle özel bir bakterinin yağ asit profili tanı koyucu olarak yararlı olabilir.

Standardize edilmiş koşullarda gelişen bir kültürün hücre hidrolizatından ekstrakte edilen yağ asitleri uygun metil esterlerini oluşturmak üzere kimyasal olarak türevlendirilir. Daha sonra bu uçucu türevler gaz kromatografisinde tanımlanır. Bilinmeyen bakteriden elde edilen yağ asitlerinin çeşidi ve miktarını gösteren kromatogram aynı koşullarda geliştirilmiş binlerce referans bakterinin yağ asit profillerini içeren bir veri tabanı ile karşılaştırılır ve bilinmeyeninkiyle en iyi eşleşenler seçilir.

Bu teknik yağ asidi metil esteri baş harfleri ile FAME (fatty acid methyl ester) olarak adlandırılmaktadır. Klinikte ve patojenlerin ve diğer tehlike oluşturan bakterilerin identifikasyonlarının rutin olarak yapılması gereken halk sağlığı, gıda ve su kontrol laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir organizmanın yağ asit profili sıcaklık, büyüme fazı (eksponansiyele karşı durgunluk fazı) ve daha az oranda büyüme ortamının bir fonksiyonu olarak değişiklik gösterebildiği için FAME analizleri sıkı standardizasyon gerektirir. Bu yüzden en iyi sonuç için bilinmeyen organizmayı spesifik bir ortamda ve spesifik bir sıcaklıkta geliştirmek gerekir. Aynı koşullarda

geliştirilmiş olan veri tabanında yer alan organizmaların yağ asit profilleri ile karşılaştırılabilmesi için bunun yapılması şarttır (Brock and Madigan, 2005).

2.4. Deney tasarımı

Deney tasarımı, ürünün ilgilenilen kalite özelliğine etki eden, kontrol edilebilir değişkenlerin değerlerini sistematik olarak değiştirerek, ürün performansını etkileyecek değişken değerlerini belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Deney tasarımının amacı; önemli faktörlerin etkisinden önemsiz olan diğerlerinin ayrılması ve önemli parametrelerden optimum değerleri elde etmektir. Deney tasarımı tasarımcıya oldukça büyük yarar ve kolaylıklar sağlar. Aynı anda bir çok faktörün etkisinin görülmesinde, faktörler arasındaki etkilerin araştırılmasında, deneylerden elde edilen bilgilerin artırılmasında rahatlıkla kullanılabilir (Bayar, 2001).

Bir fermentasyon geliştirme programı, besiyeri kuvveti, inkübasyon sıcaklığı ve kültür pH'sı gibi faktörlere bir yanıt olarak ürün verimi ölçülerek başlatılabilir. Yaygın olarak kullanılan diğer bileşenler ile birlikte, esas karbon ve azot kaynaklarını tek tek denemek fermentasyonu geliştirme işleminin ilk aşamasında yaygın bir uygulamadır.

Optimizasyon işlemi, klasik yöntemlerle yapıldığında besin, pH, sıcaklık, değerlerinin biri değişirken diğer değerler sabit kalır. Bu yöntem zaman alıcı ve daha fazla deney yapıldığı için pahalı bir yöntemdir. Ancak deneysel tasarımla bu zorlukların üstesinden gelinmektedir (Adinarayana, 2003).

2.4.1 Tam Faktöriyel Deney

Performansa etki eden faktör sayısının 1-5 olduğu durumlarda kullanılan bir deney stratejisidir. Tam faktöriyel bir deneyde faktörlerin tek başına ve birlikte ürün performansına olan etkilerini belirlemek için gerekli deney sayısı a^k dır.

a: Faktörün düzey sayısı (a=2,3,4..)

k: İlgilenilen faktör sayısı

Deney sayısının belirlenmesinde yaklaşımlar aşağıdaki şekilde olabilir.

1. Ürün hakkında sahip olunan bilgi ve/veya tecrübeye bağlı olarak performansa etkisi muhtemel düzeyler seçilerek deneyler yapılır.

2. Düzeyler rastgele seçilir.

3. Sabit ve rastgele etkiler birlikte ele alınır.

2.4.2 Deney Tasarımının Adımları

1. Bir deney tasarımı, ürün yada süreç performansında yada ürünün bazı temel özelliklerinde beklenenden farklı bir şekilde değişkenliğin olması durumunda söz konusu problemin tanımlanması ile başlayıp, problemin çözümlenip çözümlenmediğinin ortaya çıkarılması ile son bulan aşağıda verilen bir dizi adımda gerçekleştirilir. Problemin tanımlanması için performans iyileştirilmesi yapılacak olan süreç yada ürünün problemi belirlenir.

2. Amaç yapılacak tasarım sonucunda ürün yada süreçte ulaşılmak istenen performans verimidir.

3. Performans seçiminde ise ürün yada süreçteki performans göstergesi parametre seçilir ve çalışmalarda bu temel özellik üzerine yoğunlaşılır.

4. Performans karakteristiğini etkileyen faktörlerin seçilmesi: Bağımsız değişkenler olarak ifade edilen performans karakteristiğini etkileyen faktörlerin seçilmesi deney tasarımının en önemli aşamalarından birisidir.

5. Faktörlerin düzeylerinin seçilmesi: İncelenen performans karakteristiğine etki eden faktörler belirlendikten sonra, faktör düzeyleri seçilir. Bazı faktörler için iki alternatif durum (var-yok,düşük-yüksek gibi) olmakla birlikte, bazıları için ikiden fazla alternatif (50, 68, 74 C° gibi) durum söz konusu olabilmektedir. Faktörler için seçilen düzey sayısı da, yapılacak deney tasarımını ve dolayısıyla tasarımdaki her bir deney için gerekli gözlem sayısını etkilemekte ve tasarımda sabit, rastgele ve/veya karışık etkilerin oluşmasına neden olmaktadır.

6. Deney tasarımının seçilmesi: İncelenen süreç veya ürün için en etkin (süre, maliyet ve deney sayısı açısından) deney tasarım şekli seçilir.

7. Verilerin toplanması: İlgilenilen performans karakteristiğine etkisi olan faktörler ve uygun tasarım belirlendikten sonra, analiz için verilerin toplanması gerekir. Bu amaca yönelik olarak deney tasarımına göre yapılacak deney sayısı ve her bir deney için gerekli gözlem sayısı formül ve tablolar yardımı ile belirlenir.

8. Verilerin analiz edilmesi: seçilen tasarıma dayalı olarak yapılan deneylerden toplanan verilerin analizinde farklı yaklaşımlar söz konusudur. Verilerin analizinde, ilgilenilen performans karakteristiğine beklenen yönde etkisi olan faktör ve/veya etkileşimler belirlenir. Bu amaçla, normal olasılık grafiği ve varyans analizi kullanılır.

Varyans analizinde, incelenen faktörlerin etkili olup olmamasına ilişkin hipotez test edilir. Normal olasılık grafiği ise, performans karakteristiğine etkisi olan ve olmayan faktör ve/veya etkileşimlerin ortalama etkilerine karşı gelen olasılıkları temelinde ölçekli bir grafik kağıdı üzerinde gösterilmesidir.

Varyans analizinde genellikle F testi uygulanmaktadır. F testinde; belirlenen güven aralığında, her bir faktör için serbestlik derecesi ve toplam serbestlik derecesi kullanılarak F dağılım tablosu yardımı ile kritik F değeri bulunur.

Deneyler sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi ile hesaplanan F değerleri, F tablo değeri ile karşılaştırılır. Hesaplanan F değeri tablo değerinden küçük olduğunda muamelelerin anlamlı bir etkisi olmadığına hükmedilir. F değeri tablo değerinden büyük çıktığı an muamelelerin etkili olduğuna hükmedilir. Başka bir deyişle varyans analizindeki F değeri F kritikten büyük olan faktörlerin veri üzerindeki etkisi büyüktür.

9. Sonuçların yorumlanması: İlgilenilen ürün performansına etkisi olan faktörler ve en uygun düzeyleri belirlendikten sonra, sadece kritik olan faktör ve/veya etkileşimler yer alacak şekilde bir model oluşturulur ve analizi yapılır. Böylesi bir analiz, yapılan çalışma duyarlılığı açısından gereklidir. Analizinde kurulan model temelinde deney için elde edilmiş verilere ilişkin bazı grafikler oluşturulur. Sapmalarla tahmin değerlerindeki karşılaştırıldığı analizde, verilerin bir tür kontrol grafiği formatında dağılımına, sapmalar için modelin normal dağılımını temsil edip etmediğini belirtecek şekilde histograma ve sapmalar için normal olasılık grafiğine yer verilmektedir. Seçilen kritik faktörler temelinde oluşturulan modelin doğruluğu sınıranır.

10. Doğrulama deneylerinin yapılması: Yapılan deney tasarımı sonucunda belirlenen kritik faktör ve/veya etkileşimlerin ürün performansını gerçekten istenilen yönde etkileyip etkilemediğinin testinin yapıldığı bu adımda, faktörler uygun düzeylerine getirilir ve gerektiği kadar ek deneyler yapılır. Kritik olarak belirlenen faktörler temelinde kurulan modelin sınanmasından elde edilen sonuçlara bağlı olarak böylesi bir adıma gerek kalmayabilir ancak uygulamada genellikle tavsiye edilmektedir (Demain and Davies, 1999; Bayar, 2001).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyaller

3.1.1 Endospor Oluşturan Basillerin Elde Edildiği Kaynaklar

Bu çalışmada endospor oluşturan basiller bitki, hayvan ve diğer kaynaklar olmak üzere üç genel habitattan izole edilmiştir. Bu örnekler 2004-2005 yılları boyunca toplanmış olup gerekli bilgiler, izolatlarında yer aldığı Çizelge 4.1, 4.2, 4.3’de verilmiştir. Örnekler laboratuvarımıza getirilip hemen incelenmeye alınmıştır.

3.1.2 Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar

Çeşitli habitatlardan izole edilen endospor oluşturan basillerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan test organizmaları Çizelge 3.1 de verilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan test organizmaları, çalışma boyunca kriyotüplerde -20°C’de muhafaza edilerek gerektiğinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan test organizmaları

Tür	Kod	Kaynak
Bakteriler		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	ESOGÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	ESOGÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Ege Üniversitesi kültür koleksiyonu
<i>Bacillus cereus</i>	NRRL 3711	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL B- 209	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Micrococcus luteus</i>	NRRL B-1018	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Streptococcus faecium</i>	NRRL B-3502	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NRRL B-3567	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Bacillus mycoides</i>	NRRL B-4379	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Bacillus circulans</i>	NRRL B-381	NRRL kültür koleksiyonu

Çizelge 3.1 devamı

Tür	Kod	Kaynak
<i>Bacillus alvei</i>	NRRL B-383	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Bacillus licheniformis</i>	NRRL B-1001	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Bacillus pumilis</i>	NRRL BD-142	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Bacillus polymyxa</i>	NRRL B-4317	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Bacillus thuringiensis</i>	NRRLB-23419	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Bacillus macerans</i>	NRRLB-14029	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Bacillus coagulans</i>	NRRL-NR-S609	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycin</i>	PG1-T	Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü
<i>P. maltophilia</i>		Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü
<i>P. gingeri</i>	3146	Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabacci</i>		Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü
<i>Proteus vulgaris</i>		Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Metisiline dirençli Klinik izolat	ESOGÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D.
<i>Enterococcus faecium</i>	Vankomosine dirençli klinik izolat	ESOGÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Klinik dirençli izolat	ESOGÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D.
Funguslar		
<i>Candida albicans</i>	NRRLY-12983	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Candida glabrata</i>		Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü
<i>Aspergillus flavus</i>	NRRL 1957	NRRL kültür koleksiyonu
<i>A. fumigatus</i>	NRRL 163	NRRL kültür koleksiyonu
<i>A. parasiticus</i>	NRRL 465	NRRL kültür koleksiyonu
<i>A. niger</i>	NRRL 461	NRRL kültür koleksiyonu
<i>Botrytis cinerea</i>	AU 9492	ESOGÜ Biyoloji Bölümü
<i>Geotrichum candidum</i>	Doğal izolat	ESOGÜ Biyoloji Bölümü
<i>Fusarium solani</i>	Doğal İzolat	ESOGÜ Biyoloji Bölümü
<i>F. graminearum</i>	Doğal İzolat	ESOGÜ Biyoloji Bölümü

3.1.3 Besiyerleri

Besiyeri 1. Brain Heart Infusion Agar (Oxoid CM0375)

Calf brain infüsyon katıları	12,5 g
Beef heart infüsyon katıları	5,0 g
Proteus pepton	10,0 g
Sodyum klorid	5,0 g
Dekstroz	2,0 g
Disodyum fosfat	2,5 g
Agar	10,0 g
Saf su	1000 ml

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 47 g olacak şekilde tartılarak saf suda çözülmüş ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Oxoid, 1982). Endospor oluşturan basillerin izolasyonu için kullanılmıştır.

Besiyeri 2. Nutrient Broth (Merck 1.05443)

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

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 8 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülerek otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Sneath et al., 1986). Test organizmalarının üretilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 3. Nutrient Agar (Merck 1.05450.0500)

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

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 20 g olacak şekilde tartılarak saf suda çözülmüştür. Otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Sneath et al., 1986). Endospor oluşturan basillerin izolasyonu ve muhafazasında kullanılmıştır.

Besiyeri 4. SG ortamı

Nötralize olmuş soya peptonu	20,0 g
Gliserol	20,0 g
Çeşme suyu	1000 ml

Besiyeri içerikleri tartılarak çeşme suyunda çözülmüş ve pH 7,5'e ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Gebhardt et al., 2002). Fermentasyonla izolatların üretiminde kullanılmıştır. Aşağıda verilen karbon kaynağı, azot kaynağı, mineral maddeler kullanılarak deneysel tasarım çalışmaları için yukarıda sözü edilen besiyeri modifiye edilmiştir. 3³ faktöriyele göre toplam 27 besiyeri hazırlanmıştır.

Karbon kaynağı (20 g/l)	Azot kaynağı (20 g/l)	Mineral maddeler (0.2g/l)
Glikoz	Nötralize olmuş soya peptonu	MgSO ₄ .7H ₂ O
Gliserol	Bakteriyolojik peptone	MnSO ₄ .7H ₂ O
Laktoz	Maya ekstrakt	CaCl ₂ .2H ₂ O

Besiyeri 5. Mueller Hinton Broth (Merck 1.10293)

Et ekstrakt	5,0 g
Kazein hidrolizatı	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Saf su	1000 ml

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 21 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülmüş ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Özçelik, 1998). MİK çalışmalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 6. Mueller Hinton Agar (Sigma M-9552)

Et ekstraktı	5,0 g
Kazein hidrolizatı	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	12,0 g
Saf su	1000 ml

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 38 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülmüş ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 35 dakika süre ile steril edilmiştir

(Özçelik, 1998). Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılmıştır. Agar miktarı yarıya düşürülerek biyootografi çalışmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 7. Sabouraund Dextrose Broth

Bakteriyolojik pepton	10,0 g
Bakteriyolojik dekstroz	40,0 g
Saf su	1000 ml

Besiyeri içerikleri tartılarak saf suda çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. MIC belirlenmesinde kullanılmıştır (Oxoid, 1982).

Besiyeri 8 Sabouraund %4 Dextrose Agar (Fluka 84088)

Bakteriyolojik pepton	10,0 g
Bakteriyolojik dekstroz	40,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 ml

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 65 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülmüş ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Özçelik, 1995). Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılmıştır. Agar miktarı yarıya düşürülerek biyootogram çalışmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 9. Patates Dekstroz Agar (Merck 1.10130)

Patates özü	4,0 g
D(+) glukoz	20,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 ml

Ticari olarak bulunan besiyeri içerikleri litrede 39 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülmüş ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. (Özçelik, 1995). Antimikrobiyal aktivite çalışmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 10. Malt Ekstrakt Agar

Malt ekstrakt	30,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 ml

Besiyeri içerikleri tartılarak saf suda çözülmüş ve pH 5,6'ya ayarlanmıştır. Otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Özçelik, 1998). Antimikrobiyal aktivite çalışmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 11. J-Agar

Tripton	5,0 g
Yeast ekstrakt	15,0 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	3,0 g
Agar	20,0 g
Saf su	1000 ml

Besiyeri içerikleri saf suda çözülerek iyice karıştırıldıktan sonra pH 7,3-7,5'e ayarlanmış ve 121 °C de 20 dakika süre ile steril edilmiştir. %10 glukoz çözeltisi hazırlanmış ve 115°C'de otoklavlanmıştır. Daha sonra hazırlanan J agar içerisine steril şartlarda glukoz çözeltisinden litreye 2 ml olacak şekilde ilave edilmiştir (Balow et al., 1992). Endospor oluşturan basillerin endospor oluşumunu teşvik için kullanılmıştır.

Besiyeri 12. Anaerobik Agar (Merck 1.0542.0500)

Tripticase	20,0 g
Glikoz	10,0 g
Agar	15,0 g
Sodyum trioglikat	2,00 g
Sodyum formaldehit sulfoksi	1,00 g
Saf su	1000 ml

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 51 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülmüş ve pH7,2'ye ayarlanmıştır. Otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Sneath et al., 1986). Bu ortam identifikasyonda kullanılmıştır.

Besiyeri 13. Triptik Soy Broth Agar

Triptik soy broth	30,0 g
Granül agar	15,0 g
Saf su	1000 ml

Besiyeri içerikleri tartılarak saf suda çözülmüş ve pH 5,6'ya ayarlanmıştır. Otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. İdentifikasyonda kullanılmıştır (Sasser, 1990).

Besiyeri 14. Kanlı Agar

Et ekstrakt	10,0 g
Pepton	10,0 g
Sodyum klorür	5,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 ml

Besiyeri bileşenleri tartılıp saf suda çözülmüş ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. 45°C ye kadar soğutulan besiyerinin 100 ml 5-7 ml steril defibrine at kanı katılmıştır (Özçelik, 1998).

3.1.4 Çözeltiler

Çözelti 1. Fizyolojik Tuz Çözeltisi

Sodyum klorür 8.5 gram tartılmıştır. 70 ml saf suda çözülerek 1000ml tamamlanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Özçelik, 1995).

Çözelti 2. %40'lık Etil Alkol Çözeltisi

Etil alkol (%95)	20,8 ml
Saf su	179,2 ml

Belirtilen miktarlarda karıştırılarak elde edilmiştir (Özçelik, 1995).

Çözelti 3. % 40'lık NaOH Çözeltisi

Sodyum Hidroksit 40.0 g tartılmıştır. 50 ml saf suda çözülerek 100ml tamamlanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Özçelik, 1995).

Çözelti 4. 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 karıştırıldığında elde edilen bulanık çözelti spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu dalga boyunda absorbans değeri 0.08-0.10 aralığına girdiği kontrol edilmiştir. Bu değer 0,5 Mc Farland standardı olarak kabul edilmiştir. Standardın bulanıklılığı ile bakteri süspansiyonlarının bulanıklılığı çıplak göz ile karşılaştırılarak ayarlanmıştır. 0,5 Mc Farland standardı, ml'de 10⁸ bakteri yoğunluğunun bulanıklılığına karşılık gelmektedir (NCCLS, 1990).

Çözelti 5. Lügol Çözeltisi

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

Bileşenler tartılarak saf suda çözülmüş ve iyot ve potasyum iyodürün çözülmesi için 24 saat beklenmiştir (Özçelik, 1998).

Çözelti 6. ¼ Ringer Çözeltisi

NaCl	2,25 g
KCl	0,105 g
CaCl ₂	0,12 g
NaHCO ₃	0,05 g
Saf su	1000 ml

Maddeler tartılarak saf suda çözülmüş ve pH 7.2'ye ayarlanmıştır. Otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Özçelik, 1998).

Çözelti 7. %01 TritonX 100

Triton X100	1 ml
Saf su	1000 ml

Madde saf suda çözülmüş ve otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

Çözelti 8. Reagent 1 (Saponifikasyon çözeltisi)

Sodyum Hidroksit	45,0 g
Methanol (HPLC saflıkta)	150 ml

Deiyonize saf su 150 ml su ve metanol karıştırılmış ve sodyum hidroksit pelletleri çözeltiliye eklenerek karıştırılmıştır. Pelletler eriyene kadar karıştırma işlemine devam edilmiştir (Sasser, 1990).

Çözelti 9. Reagent 2 (Metilasyon çözeltisi)

6,00N Hidroklorik asit	325 ml
Methanol (HPLC saflıkta)	275 ml

Karıştırarak metanole asit eklenmiş ve standart baz çözeltisine karşı 6,00N final çözeltisi ile titre edilmiştir (Sasser, 1990).

Çözelti 10. Reagent 3 (Ekstraksiyon çözeltisi)

Hekzan (HPLC saflıkta)	200 ml
Metil tert butil eter (HPLC saflıkta)	200 ml

Hekzan içerisine metil tert bütül eter eklenerek iyice karıştırılmıştır (Sasser, 1990).

Çözelti 11. Reagent 4 (Yıkama çözeltisi)

Sodyum hidroksit	10,8 g
Deiyonize distile su	900 ml

Deiyonize distile su NaOH pelletleri eklenerek iyice karıştırılmıştır (Sasser, 1990).

Çözelti 12. Doymuş NaCl çözeltisi

Sodyum klorür	40,0 g
Saf su	100 ml

NaCl saf su içerisinde iyice eritilerek hazırlanmıştır (Özçelik, 1998).

Çözelti 13. 6N HCl ekstraksiyon da kullanılmıştır.

Çözelti 14. Ninhidrin çözeltisi (Sigma) aminoasit varlığının tesbitinde kullanılmıştır.

Çözelti 15. p-iodonitrotetrazolyum violet (TTC) (Sigma) biyootografi ve MİK deneylerinde kullanılmıştır.

Çözelti 16. %2.5 luk çamaşır suyu

Sodyum Hipoklorid	2,5 ml
Saf su	100 ml

Aşağıdaki kimyasallar çeşitli aşamalarda kullanılmıştır.

%96'lık etanol, gram boyamada kullanılmıştır

n-Butanol, İTK'da kullanılmıştır.

Toluen, İTK'da kullanılmıştır.

Petrol eteri, Kolon kromotografisinde kullanılmıştır.

Etil asetat, ekstraksiyon ve İTK'da ve kolon kromotografisinde kullanılmıştır.

Kolon kromotografisi çözeltileri aşağıda belirtilen oranlarda karıştırılarak elde edilmiştir.

Etil asetat	Petrol eteri
10 ml	90 ml
20 ml	80ml
30 ml	70 ml
40 ml	60 ml
45 ml	55 ml
50 ml	50 ml
60 ml	40 ml
70 ml	30 ml
80 ml	20 ml
90 ml	10 ml
100 ml	
Bitirme çözeltileri	
Metanol	Etil asetat
5ml	95ml

3.1.5 Boyalar

Boya1. Kristal Viyole

Çözelti A

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

Çözelti B

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

Çözelti A ve B karıştırılmış ve saf su ile 1:10 oranında sulandırılmıştır ve filtre kağıdından süzülmüştür (Özçelik, 1998).

Boya 2. Safranin Boyası

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

Safranin saf su içerisinde iyice çözülmüştür (Özçelik, 1998).

Boya 3. Malaşit Yeşili

Malaşit yeşili	5,0 g
Saf su	100,0 ml

Boya saf su içinde çözülmüş ve filtre kağıdından süzülmüştür (Özçelik, 1998).

3.2 Yöntem

3.2.1. Toplanan Örneklerin Hazırlığı

Örnekler çeşitli mevkilerden toplanmış olup bununla ilgili veriler Çizelge 3.1, 3.2, 3.3'de verilmiştir. Laboratuvara getirilen örnekler en kısa zamanda incelenmeye alınmıştır. Endospor oluşturan basillerin izolasyon yöntemi örnek tipine bağlı olarak değişiklik göstermiştir.

3.2.1.1. Arthropod Örneklerinin Hazırlanması

Hayvanlardan alınan doku ve barsakların hazırlanması steril bir ortamda yapılmıştır. Örnek alma işlemi başlamadan önce arthropodların dış yüzeyindeki mikroorganizmaların kontaminasyonu engellemek için %70'lik etanolde bir dakika bekletilmiştir. Kesilen her bir örnek daha sonra 1000 µl'lik fizyolojik tuzlu su çözeltisi ile bir mikrotüpe doldurularak titreşimli karıştırıcıda 5 dak kadar karıştırılarak süspansiyon hazırlanmıştır (Gebhardt et al., 2002). Endospor oluşturan basillerin izolasyonu için örnekler 80°C de 15-20 dak. ısıtılmıştır (Sessitsch et al., 2003).

3.2.1.2 Toprak ve Gübre Örneklerinin Hazırlanması

10 gram toprak örneği aseptik bir şekilde 90 ml steril distile su ile karıştırılarak homojen duruma getirildikten sonra bu ana çözeltiden diğer dilüsyonlar hazırlanmıştır. Endospor oluşturan *Bacillus* izolasyonu için örnekler 80°C' de 15-20 dak. ısıtılmıştır (Demain and Davies, 1999; Ünlütürk ve Turantaş, 1996).

3.2.1.3 Bitki Rizosfer Örneklerinin Hazırlanması

500 ml lik erlen içerisine alınan bitkinin kök kısmı üzeri kapanacak kadar ¼'lük ringer çözeltisi ilave edilmiş ve 200 rpm de 22 °C de 20 dakika kadar steril cam boncuklarla çalkalanmıştır. Endospor oluşturan *Bacillus* izolasyonu için örnekler 80°C de 15-20 dak. ısıtılmıştır (Germida and Siciliano, 2001; Sessitsch et al., 2003).

3.2.1.4 Bitki Kök Dokusu Örneklerinin Hazırlanması

Sterilizasyon-dövme-plating tekniği kullanılarak bitkinin kök dokusundan izolasyon yapılmıştır (Kloepper et al., 1992). Bitkiden alınan kök örneklerinin üzeri

kapatılacak kadar % 2,5 çamaşır suyu konulmuş 200 rpm de 22°C de 10 dakika çalkalanmış ve daha sonra 4 kez ¼'lük ringer çözeltilisiyle çalkalanarak yıkanmıştır. Steril olan havanda bitki kökleri iyice ezilmiş ve ezilen kök parçaları 10 ml steril ¼ ringer çözeltilisi içerisine konularak 200 rpm de 30 dak 22°C'de çalkalanmıştır. Endospor oluşturan *Bacillus* izolasyonu için örnekler 80°C'de 15-20 dak. ısıtılmıştır (Kloepper et al., 1992; Sessitsch et al., 2003)

3.2.1.5 Bitki Tohum Örneklerinin Hazırlanması

Bitki tohumundan izolasyon yapmak için sterilizasyon-dövme-plating tekniği kullanılmıştır (Kloepper et al., 1992). 10 g bitki tohumu 250 ml erlen içerisine % 2,5 sodyum hipoklorid ile 200 rpm de 22°C'de 10 dakika süre ile çalkalanmıştır. Daha sonra 4 kez ¼'lük ringer çözeltilisiyle çalkalanarak yıkanmıştır. Steril havanda iyice ezilen bitki tohumları 250 ml erlenlere konularak 10 ml steril ¼'lük ringer çözeltilisi içerisinde 22°C de 200 rpm de 30 dakika süreyle çalkalanmıştır ve endospor oluşturan *Bacillus* izolasyonu için örnekler 80°C'de 15-20 dak. ısıtılmıştır (Sessitsch et al., 2003).

3.2.2 Endospor Oluşturan *Bacillus*'ların İzolasyonu

Endospor oluşturan *Bacillus* izolasyonu için, Brain Heart İnfision Agar (BHA) ve Nutrient Agar (NA) besiyerleri kullanılmıştır. Hazırlanan artropod örneklerinden her bir petriye 50 µl transfer edilerek yayma plaka yöntemi ile ekim yapılmıştır (Gebhardt et al., 2002). Plaklar aerobik olarak 32°C de 7 gün süre ile inkübe edilmiştir. Toprak, gübre ve bitki örnekleri ise yukarıda adı geçen besiyerleri üzerine 0,1 ml aktarılarak yayma plaka yöntemi ile ekim yapılmıştır. Plaklar aerobik olarak 30°C de 1-2 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloniler izolasyon için seçilmiştir.

Gram boyama sonucunda pozitif olan izolatlar endospor oluşumunu teşvik için J agar'da 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Mikroskobik incelemeler sonucunda endospor içeren basiller saf kültür halinde yatık NA'larda +4°C'de stoklanmış ve gerektiğinde aktiflenerek kullanılmıştır.

3.2.2.1 Gram Boyama

Temiz bir lamın ortasına bir öze dolusu su konulmuştur. Öze yardımı ile 24 saatlik kültürden bir miktar alınıp su damlası içine dairesel hareketlerle yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteriyal film önce havada kurutulmuş ve daha sonra bakteriyal film üste kalacak şekilde lam iki üç kez alevden geçirilerek fiske edilmiştir. Preperat önce kristal viyole ile 1 dakika muameleye bırakılmıştır. Sürenin sonunda boya akıtılarak suyla yıkanmıştır. Daha sonra bakteriyal film tabakası üzerine lügol çözeltisi ilave edilerek 1 dakika bekletildikten sonra, suyla yıkanmıştır. 1-2 saniye alkol ile muamele edilen preperatın alkolü suyla uzaklaştırılmıştır. 30 sn kadar safraninle muamele edildikten sonra boya akıtılarak suyla yıkanmıştır. Kurumaya bırakılan preperat immersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifi yardımıyla incelenmiştir. Kristal viyole boyasını tutup mor renkte gözükten basiller gram pozitif olarak kaydedilmiştir (Tamer vd., 1989)

6.2.2.2 Endospor boyama

Gram boyaması pozitif çıkan izolatlar yatık J agar ortamına ekim yapılmıştır. 37°C -27°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra endospor boyama yapılmıştır. Temiz bir lamın ortasına küçük bir su damlası bırakılmış ve öze yardımıyla bir miktar 24 saatlik kültürden alınıp su damlası içine dairesel hareketlerle yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteriyal film önce havada kurutulmuş ve daha sonra bakteriyal film üstte kalacak şekilde lam iki üç kez alevden geçirilerek tespit edilmiştir. Preperat kaynar su banyosu düzeneği üzerine yerleştirilerek 5 dakika malasit yeşili ile muamele edilmiştir. Su ile yıkandıktan sonra 30 saniye safranin ile muamele edilmiştir. Su ile tekrar yıkanıp havada kurutulduktan sonra immersiyon yağı yardımıyla immersiyon objektifinde incelenmiştir. Uygulanan işlem sonucu sporlar yeşil renkli, vejetatif hücreler ise pembe renkli olarak görülmüştür (Tamer vd., 1989)

3.2.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

3.2.3.1 Agar Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal maddenin belirlenmesi aşamasında agar difüzyon yönteminin, modifiye edilmiş hali olan piece agar, disk difüzyon ve agar kuyucuk yöntemleri kullanılmıştır.

Stoklanmış olan endospor oluşturan basillus izolatları yatık NA besiyerine alınarak canlandırılmıştır. Her bir izolata ilk olarak piece agar yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde göre standart petri kabı içerisine kalınlığı 3-4 mm olacak şekilde 25 ml NA besiyeri dökülmüştür. Her bir izolat Nutrient Agar (NA) plaklarının yüzeyine öze yardımı ile sürülerek 37° C’de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrinin yüzeyindeki mikroorganizmalar steril bir lam yardımı ile sıyrılmıştır. Daha sonra 254 nm dalga boylu UV ışığı altında 30 dakika bekletilmiştir. Agarın yüzeyi 10 mm çapındaki mantar delicisi yardımıyla agar bloklar elde edilmiştir (Ichikawa et al., 1971). Antimikrobiyal aktivite belirlenmesinde test kültürleri Nutrient Broth (NB)’da aktiflenmiştir. Aktif bakteri süspansiyonu ml de 10⁸ olacak şekilde steril fizyolojik su ilave edilerek Mc Farland 0,5 bulanıklığına göre hazırlanmıştır. Bakteriler için hazırlanan Mueller Hinton Agar MHA plakların yüzeyi 35°C’de 2-3 saat kurutulmuştur. Test bakterileri agarın tüm yüzeyine steril eküvyon yardımı ile sürümüş ve agar bloklar yerleştirilerek 2 saat buzdolabında +4°C’de bekletildikten sonra 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Aynı işlem klinik izolatlardan MRSA, *E. feacium*, *Acinetobacter baumannii* kanlı agarda gerçekleştirilmiştir. Oluşan inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür.

Yatık Saboraud Dekstroz Agar (SDA) besiyerine aktiflenen maya kültürleri steril fizyolojik su ile 0,5 Mc Farland’a ayarlanmıştır. Hazırlanan maya süspansiyonu, seyreltme yapılarak 10⁷ maya içeren süspansiyon elde edilmiştir. SDA plakları 35°C’de 2-3 saat kurutulmuştur. İnoküle edilen plaklar üzerine daha önce elde edilen agar bloklar yerleştirilmiş ve 2 saat buzdolabında +4°C’de bekletildikten sonra 37°C’de inkübe edilmiştir. Oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür.

Patatose Dekstroz Agar’da 27°C’de 3-4 gün inkübe edilerek aktifleştirilen küf sporları ile SDA plakları orta noktadan aşılmalıdır. Küf ile aşılama yapılan plağa agar bloklar kenara gelecek şekilde yerleştirilmiş ve 3-4 gün 27°C’de inkübe edilmiştir. Oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür.

Diğer yöntem olan disk difüzyon yönteminde agar bloklar yerine 6 mm çaplı steril kağıt diskler (Schleicher&Schuell) kullanılmıştır. Agar blok üzerine yerleştirilen disklere 10 µl etken madde içeren ekstre emdirilerek inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür. Her iki yöntemde bakteri, maya ve küfler için uygulanmıştır.

Fermentasyon çalışmaları sırasında ise agar kuyucuk yöntemi kullanılmıştır (Yılmaz vd., 2005). Bu yöntemde 15 ml MHA ve SDA petrilere dökülmüştür. Daha sonra 0,5 Mc Farland'a ayarlı test organizmaları, eküvyon yardımı ile yüzeye sürülmüştür. 10 mm çapında oyuklar açılmış ve 100 µl elde edilen supernatanttan konulmuştur. 2 saat +4°C'de bekletilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyon sonunda oyuk çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüştür

3.2.4. Endospor Oluşturan *Bacillus*' lardan Metabolit Üretimi

Aktiflenmiş izolatlardan 5 ml SG besiyerine bir öze dolusu aşılama yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Oluşan hücre süspansiyonundan % 2 oranında 50 ml SG ortamı içeren 250 ml'lik erlenlere aşılama yapılmıştır. 37°C'de 160 rpm hızdaki çalkalamalı etüvde 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra üretim ortamı 20°C de 30 dakika 4500 rpm hızla santrifüj edilerek biyokütlenin ortamdan ayrılması sağlanmıştır. Süpernatant'ın pH'sı 6N'lik HCl ile 4'e ayarlandıktan sonra aynı hacimde etilasetat ile ekstrakte edilmiştir. Rotary evaporatörde çözücü uzaklaştırıldıktan sonra ekstrakt 1ml etil asetat ile ortamdan alınmıştır. Çalışmalar sırasında kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir (Gebhardt et al., 2002).

3.2.5 Endospor Oluşturan *Bacillus*'ların İdentifikasyonu

İdentifikasyonu yapılacak olan izolatlara gram boyama, endospor varlığı, katalaz testi gibi *Bacillus* cinsi tanımlanmasında esas olan testlerde Bergey's Manual of Systematic Bacteriology esas alınmıştır. İzolatlar VITEK sistem ve yağ asidi profillerine göre (FAME) ile identifiye edilmiştir. İzolat Anaerobik Brewer Agar içeren petrilere ekim yapılarak anaerobik şartlar altında 37 Cde 2 gün inkübe edilmiştir (Sneath et al., 1986). Üreme görülmemesi organizmanın zorunlu aerob olduğunu ifade etmektedir.

3.2.5.1 Biyokimyasal Özelliklere Dayalı İdentifikasyon

İdentifikasyon, biyokimyasal özellikleri esas alan VITEK sisteme ait *Bacillus* biyokimyasal kartı (BioMerieux VITEK, Hazehood, MO, USA) ile yapılmıştır. Bu identifikasyonla izolatlara 31 biyokimyasal test uygulanmıştır. Yapılan testler aşağıda verilmiştir.

1	Negatif kontrol	12	Tetrazolyum kırmızısı	23	Raffinose
2	Galaktoz	13	Ksilol	24	Trehalose
3	Amigdalın	14	Riboz	25	%7 NaCl
4	Sorbitol	15	Amylopektin	26	Nalidixic asit
5	Oleandomycin	16	Arabitol	27	Inositol
6	Trehaloz	17	Tagatose	28	Salicin
7	Sukroz	18	Mannitol	29	Platinose
8	Arabinoz	19	Maltoz	30	Mandelic asit
9	Inulin	20	Potasyum thioyanate	31	Esculin
10	N-asetil D-glukozamine	21	Polyamidohygro		
11	Sodvum asetat	22	streptin Glukoz		

İzolatların NA plaklarında saf kültür elde etmek üzere 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Tek düşmüş kolonilerden 0,5 Mac Farland'a karşılık gelen yoğunlukta hücre süspansiyonu hazırlanıp VITEK kartlarının inokülasyonu sağlanmış ve inkübatöre yerleştirilmiştir. 24 saat sonunda optik okuyucu sayesinde alınan sonuçlar VITEK bakteri veri tabanındaki kayıtlara göre değerlendirilmiştir.

3.2.5.2. Yağ Asidi Profilleri Esas Alınarak İdentifikasyon

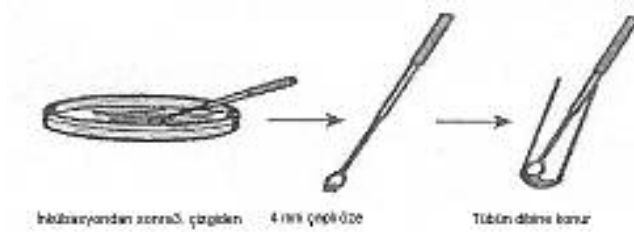
İzolatların Yağ Asidi Metil Esterlerinin (FAME) analizi Sasser (1990)'e göre yapılmıştır. Ekstre edilen yağ asitleri metil esterlerine türevlendirilmiştir. Her bir strainin yağ asidi metil esterleri MIDI (Microbial Identification System) (Microbial İD, Inc. Newark, Del.) sistemi (Gaz kromatografisi Agilent Technologies 6890N, TSBA 50 software) ile analiz edilmiştir. İşlem aşağıdaki aşamalarda gerçekleştirilmiştir.

İzolatların Ekimi: Triptik Soy broth agar besiyerine saf kültür elde etmek için Şekil 3.1'de görüldüğü gibi çizgi ekim tekniği uygulanmıştır. 28±1°C'de 24±2 saat inkübe edilmiştir.

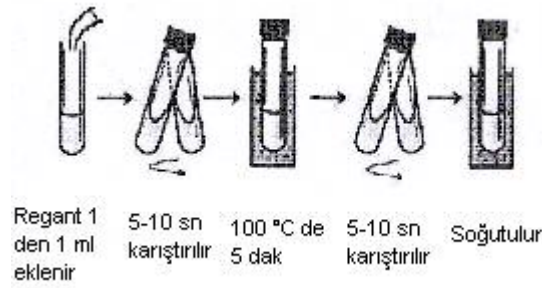


Şekil 3.1 Besiyerine izolatların çizgi yöntemi ile ekilmesi

İnkübasyondan sonra 4 mm öze ile çizgi ekimin 3. çizgisinden yaklaşık 40 mg saf kültürden canlı hücreler, temiz kuru 13x 100 mm vidalı kapaklı cam tüplere alınmıştır.



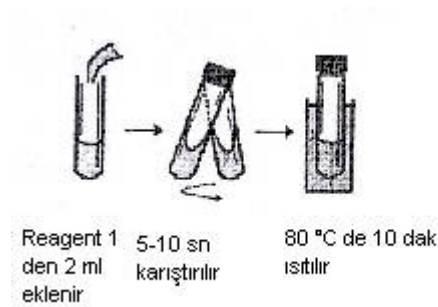
Şekil 3.2 Besiyerinden izolatların tüp içerisine aktarılması



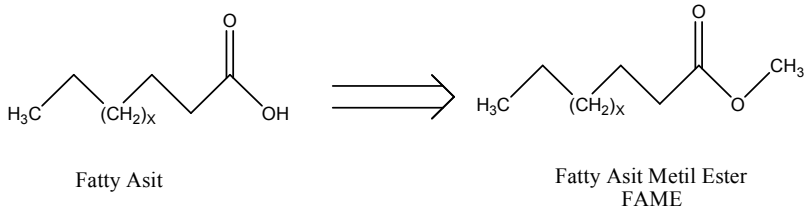
Saponifikasyon: Hücrelerin öldürülerek lisisi için güçlü bir metanolik baz eklenecek ısıtılır. Bu işlem sonunda yağ asitleri hücre lipidlerinden ayrılır ve sodyum tuzları ile değişir. Reagent 1 den 1,0±0.1mL pipet yardımı ile tüpün içine ilave edilmiştir. Kapağı kapatılan tüp 5-10 saniye vorteksle karıştırılmış ve 100°C’de 5 dak. su banyosu içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra çeşme suyu altında tüpler hızlıca soğutulmuştur.

Şekil 3.3. Saponifikasyon işlem basamağı

Metilasyon: Metilasyon, yağ asitlerini yağ asiti metil esterlerine dönüştürerek yağ asitlerinin gaz kromatografisi için uygulanabilirliğini (uçuculuğu) artırır.



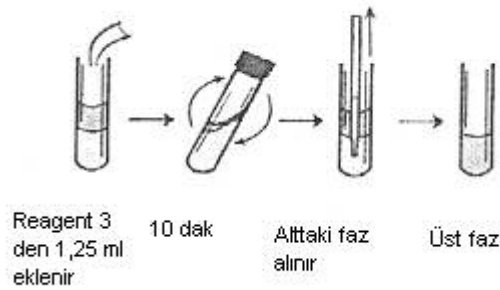
Şekil 3.4. Metilasyon işlem basamağı



Şekil 3.5. Yağ asitinin yağ asidi metil esterine dönüşüm reaksiyonu

Kapağı açılan tüp içerisine pipet yardımı ile $2,0 \pm 0,1$ ml reagent 2 den ilave edilmiştir. Kapağı kapatılan tüpler 5-10 saniye vortekste karıştırılmış ve $80 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 10 ± 1 dakika ısıtılmış ve sonra hızlıca çeşme suyu altında soğutulmuştur.

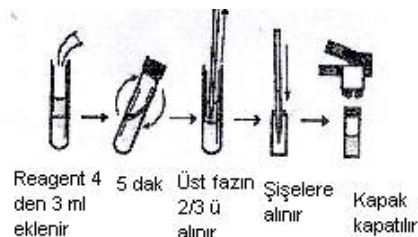
Ekstraksiyon: Yağ asit metil esterleri asidik sulu fazdan ayrılarak sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemine göre organik faza geçerler. Kapağı açılarak tüplere $1,25 \pm 0,1$ ml reagent 3 den ilave edilmiş ve kapağı kapatılarak 10 dakika kuvvetlice yatay bir biçimde çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Daha sonra tüplerin içinde oluşan alttaki fazı temiz pastör pipeti yardımı ile alınmıştır.



Şekil 3.6 Ekstraksiyon işlem basamağı

Yıkama işlemi: Kapağı açılarak tüplerin içerisine $3,0 \pm 0,1$ ml reagent 4 den ilave edilerek 5 dakika yatay çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Bu işlem bittikten sonra tüpteki

oluşan fazın üst kısmının $2/3$ 'ü pastör pipeti yardımı ile küçük kahverengi şişelere alınmıştır. Faz oluşumu görülmeyen tüplere doymuş NaCl çözeltisinden 1-2 damla ilave edilerek 2-3 dakika beklenerek faz oluşumu sağlanmıştır (Sasser, 1990).



Şekil 3.7 Yıkama işlem basamağı

3.2.6 Fermentasyon

50 ml SG ortamı içeren 250 ml erlenlere 3.2.4'de anlatıldığı şekilde inokulumdan %2 oranında inoküle edilmiş ve 160 rpm de 37°C'de 88 saat inkübe edilmiştir. Dört ile sekiz saat ara ile alınan örneklerde; biyokütle ölçümü, pH değişimi, spor sayımı ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapılmıştır.

Fermentasyon boyunca büyüme de meydana gelen değişiklikleri incelemek için aynı koşullarda hazırlanan 12 erlende fermentasyon başlatılmıştır. Biyokütle ölçümü UV visible spektrofotometre ile (Cecil Ce 4002) 620 nm de sıvı örneklerin absorbansı SG ortamına karşı okutulmuştur. Çalışmalarımız 2 paralel halinde yürütülmüştür.

Fermentasyon sıvısının pH'sı 4-8 saatte bir pH metre ile ölçülmüştür.

Ependorf tüplerine 1 ml fermentasyon sıvısı alınarak 14.000 rpm 20°C'de 10 dak. santrifüj edilmiştir, antimikrobiyal aktivite agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmiştir. Rutin denemelerde ve aktif molekül saflaştırma çalışmalarında *S. aureus* ve *C. glabrata* test organizması olarak kullanılmıştır.

Spor sayısının belirlenmesi için fermentasyon sıvısından 4 ml alınıp 80°C'de 20 dak. bekletilmiştir. Hazırlanan bir seri seyreltme dökme ve yayma plaka yöntemleri ile NA ekim yapılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve 1 ml'deki spor sayısı hesaplanmıştır.

3.2.7 Deney Tasarımı (Response Surface Modeli) ile Optimizasyon

3.2.7.1 Fiziksel Faktörlere Davalı Deney tasarımı

Fermentasyon boyunca mikroorganizma üzerine etki eden 3 fiziksel faktörün optimizasyonu esas alınmıştır. Optimizasyonda 3 faktör belirlenmiştir. Kültür ortamının başlangıç pH'sı, sıcaklık, çalkalama hızı olmak üzere 3³ istatistiksel modelleme yapılmıştır. Her bir faktör için üç düzeyde deney sahası belirlenmiş olup bu modelleme ile 27 deney yapılmıştır. Response surface modeli kullanılarak sözü edilen faktörlerin (başlangıç pH, sıcaklık, çalkalama hızı), hücre gelişimine ve antibakteriyal ve antifungal metabolit üretimi (*S. aureus*, *C. glabrata*) üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Modelleme yapılırken faktörlerin alt, üst ve orta noktaları (düzeyleri) belirlenmiş, buna göre pH aralıkları 5, 7, 9 olarak, sıcaklık aralıkları 28, 35, 42 ve çalkalama hızı (rpm) ise 100, 150, 200 olarak alınmıştır. Buna göre 3.2.5' de anlatıldığı gibi işlemler yapılmıştır. Çizelge 4.20'ye uygun olarak deney gerçekleştirilmiş 48 saatin sonunda hücre gelişimi (OD), metabolit üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Faktörlerin düzeyleri aşağıdaki gibi ifade edilmiştir:

$$\begin{aligned} X_1 &= (\text{pH}-7)/2 \\ X_2 &= (T-35)/7 \\ X_3 &= (\text{rpm}-150)/50 \end{aligned}$$

Faktörlerin doğrusal, karesel ve ikili etkileşim etkilerini içeren model aşağıdaki şekilde genel formda yazılabilir.

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_{ii}^2 + \sum_{i,j=1}^3 \beta_{ij} x_{ix_j}$$

Modelin çalışmamız için açık formu ise aşağıdaki gibidir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Burada Y bağımlı değişken (hücre gelişimi OD, antibakteriyal ve antifungal aktivite, X_1 (Başlangıç pH), X_2 (Sıcaklık), X_3 (Çalkalama hızı) ise faktörlerimizdir.

- β_0 =Sabit terim
- β_i =Faktörlerin doğrusal etkilerine ilişkin katsayılar
- β_{ii} = Faktörlerin karesel etkilerine ilişkin katsayılar
- β_{ij} = Faktörlerin ikili etkileşim etkilerine ilişkin katsayılar

Çözümlemede Statistica istatistiksel paket programı kullanılarak katsayıların anlamlılığını belirlemek için Student t testinden yararlanılmıştır. Burada ($p < 0,05$) olduğu için katsayıların anlamlı olduğuna karar verilmiştir.

Çizelge 3.2 Responce surface modele göre kullanılan fiziksek faktörlerin sıra ve düzeyleri

	Sıra ve Seviyeler		
Testler	-1	0	+1
pH	5	7	9
Sıcaklık	28	35	42
rpm	100	150	200

3.2.7.2 Kimyasal Faktörlere Dayalı Deneysel Tasarım

Fermentasyonda kullanılan besiyeri bileşeninin optimizasyonunda 3 faktör belirlenmiştir. Karbon kaynağı, azot kaynağı, mineral madde olmak üzere 3^3 istatistiksel modelleme yapılmıştır. Her bir faktör için üç düzeyde deney sahası belirlenmiş olup bu modelleme ile 27 deney yapılmıştır. Response surface modeli kullanılarak sözü edilen faktörlerin (karbon kaynağı, azot kaynağı, mineral madde), hücre gelişimine (OD), antibakteriyal ve antifungal metabolit üretimine etkisi araştırılmıştır.

Modelleme yapılırken faktörlerin alt, üst ve orta noktaları (düzeyleri) belirlenmiş, buna göre karbon kaynakları (glukoz, gliserol, laktoz), azot kaynakları (soya peptonu, bakteriyolojik pepton, yeast ekstrakt) ve mineral madde ise ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$) olarak alınmıştır. Buna göre 3.2.5’ de anlatıldığı gibi işlemler yapılmıştır. Çizelge 4.20’ye uygun olarak deney gerçekleştirilmiş 48 saatin sonunda hücre gelişimi (OD), antibakteriyal ve antifungal metabolit üretimine etkisi incelenmiştir. Faktörlerin düzeyleri aşağıdaki gibi ifade edilmiştir:

Faktörlerin doğrusal, karesel ve ikili etkileşim etkilerini içeren model aşağıdaki şekilde genel formda yazılabilir.

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_{ii}^2 + \sum_{i,j=1}^3 \beta_{ij} x_i x_j$$

Modelin çalışmamız için açık formu ise aşağıdaki gibidir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Burada Y bağımlı değişken (hücre gelişimi OD, antibakteriyal ve antifungal metabolit üretimi) X_1 (Karbon kaynağı), X_2 (Azot kaynağı), X_3 (mineral madde) ise faktörlerimizdir.

β_0 =Sabit terim

β_i =Faktörlerin doğrusal etkilerine ilişkin katsayılar

β_{ii} = Faktörlerin karesel etkilerine ilişkin katsayılar

β_{ij} = Faktörlerin ikili etkileşim etkilerine ilişkin katsayılar

Çözümlemede Statistica istatistiksel paket programı kullanılmış olup katsayıların anlamlılığını belirlemek için Student t testinden yararlanılmıştır. Burada ($p < 0,05$) için katsayıların anlamlılığına karar verilmiştir

Çizelge.3.3 Responce surface modele göre kullanılan kimyasal faktörlerin sıra ve düzeyleri

Testler	Sıra ve Seviyeler		
	-1	0	+1
Karbon kaynağı	Glikoz	Gliserol	Laktoz
Azot kaynağı	Soya peptonu	Bakteriyolojik pepton	Yeast ekstrakt
Mineral madde	MgSO ₄ .7H ₂ O	MnSO ₄ .7H ₂ O	CaCl ₂ .2H ₂ O

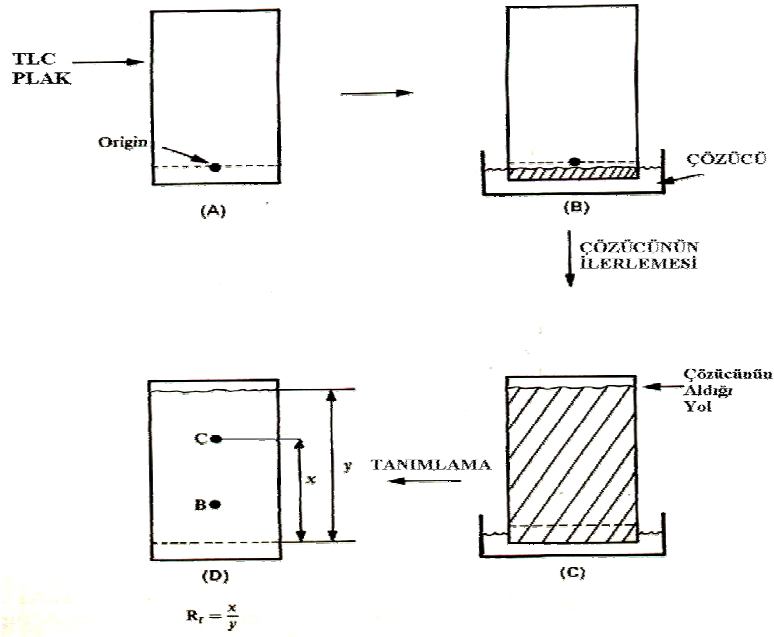
3.2.8 Antibakteriyal Etkili Molekülün İzolasyonu

Antibakteriyal etkili molekülün izolasyon çalışmaları, çözücü ekstraksiyonu, ince tabaka kromatografisi, biyootogram ve kolon kromatografisi yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.1 İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Kromatografi, bir karışımın poröz bir ortamda, hareketli bir çözücünün etkisiyle karışımı oluşturan bileşiklerin farklı hareketleri sonucu bileşenlerine ayrılması olarak tanımlanabilir. Başlıca silika ve aliminyum ile kaplanmış tabakalar yaygın olarak cam, aliminyum veya plastik üzerinde kullanılır. Silika hafif asidik olup, hafif bazik aliminyuma nazaran daha çok kullanılır. İnce tabaka kromatografisi işlemleri sırasında F₂₅₄ (Merck, 0,25kalınlığında) İTK plağı kullanılmıştır.

Etil asetat ile ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstratlar önce etil asetat ile çözüldüğü halde getirilmiştir. İTK plakası levhanın sağından ve solundan 1 cm içeri, alt kısımdan da 2 cm olacak şekilde uygulanacak örnek sayısına göre eşit şekilde kurşun bir kalemle işaretlenmiştir. Örnekler bu noktanın tam ortasına gelecek şekilde 5 µl kılcal boru yardımı ile emdirilmiştir. Bu işlem en az 4 kez tekrar edilmiştir.



Şekil 3.8 İnce tabaka Kromatografisinin (İTK) nın yapılışı

Hareketli faz olarak Toluen: Etilasetat: Metanol: Butanal (29.1: 0.9: 5: 5) kullanılmıştır. Yürütme çözeltisi (hareketli faz) ile doymuş hale gelen tankın içine plaka düzgün şekilde yerleştirilmiştir. Örnek uygulanan noktaların sıvı içinde kalmamasına özen gösterilmiştir. Yürütme işlemi plakanın üst kısmından 0,3cm kalana kadar devam etmiş ve süre sonunda tankın içinden çıkarılan plakalar havada kurutulmuştur. Yürütme sonunda çözücünün ve örneklerin ilerlediği mesafe metrik bir cetvelle ölçülmüştür. Her madde için uygulama koşulları belirtilerek karakteristik bir değer olan R_f ile ifade edilir (Erdik vd., 1997; Gündüz, 1997, Ay, 1998).

$R_f = \text{Maddenin ilerlediği yol} / \text{Çözücünün ilerlediği yol}$

Amino asitler ninhidrin ile görünür hale getirilir. Aminoasitler ve proteinlerde α amino grubunun tanımlanmasında kullanılan en yaygın reaksiyon ninhidrin reaksiyonudur. Bu reaksiyon aynı zamanda aminoasitlerin miktarını tayin etmek için de kullanılmaktadır. Eğer bir α aminoasit çözeltisi ninhidrin ile ısıtılacak olursa CO_2 açığa çıkar, aminoasitin amino grubundan da amonyak açığa çıkmaktadır. Daha sonra amonyak bu iki hidrindantini oksitleyecek olursa, bütün α aminoasitler, peptitler ve proteinler tarafından morun çeşitli tonları meydana getirilir. Yalnız prolin ve hidroksiprolin sarı renk oluşumuna neden olmaktadır. Aminoasitlerin kağıt kromatogramında gözlenebilmeleri ve tayin edilebilmeleri genellikle ninhidrin

reaksiyonu sayesinde olmaktadır (Gözükara, 1997). Aminoasit varlığını ortaya koymak için plaka üzerine pülverizatörle ninhidrin püskürtülmüş ve ısıtılmıştır.

3.2.8.2 Biyootografi

Biyootografi, birden fazla madde içeren ekstraktların kromotografik plak üzerinde yürütülmesi sonucu oluşan spotlarının biyolojik yolla belirlenmesini kapsar. Biyolojik etkiye sahip spotlar, kromotografi plağı üzerine yayılan mikroorganizma ile aşılınmış besiyerinde üremeyi engelleyerek varlığını gösterir (Wedge and Nagle 2000). Aynı işlem standart antibiyotikler kullanılarak karşılaştırma olanağı yaratır. Bu yöntem basit, ekonomik ve hızlı ve güvenilir sonuç verdiği için kullanılmıştır. Ekstrakt kromotografik kağıt üzerinde yürütüldükten sonra, İTK plakları üzerindeki çözücü sistemi uzaklaştırılarak oluşan etken maddenin belirlenmesi için plağın üzerine, duyarlı olan test organizmaları, bakteriler için 5 ml MHA'a mayalar için SDA'a 0,5 Mc Farlanda ayarlı bakteri/maya süpansiyonundan 0,1 ml ilave edilerek hazırlanan besiyerinin ince bir tabaka halinde yayılmasıyla gerçekleştirilmiştir. 4°C'de 2 saat bekletilip daha sonra 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Plak üzerine p-iodonitrotetrazolyum violet püskürtülmüş ve gelişme görülmeyen şeffaf zonlar aktif inhibisyon etkisine sahip spotlar olarak ifade edilmiştir (Wallhuser, 1969).

3.2.8.3 Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi ile saflaştırma için 3x55cm boyutundaki cam kolon içerisine silika jel konulmuş ve kolondan 3-4 kez petrol eteri geçirilmiştir. Balon içerisindeki 3,20 g ekstrakt silika jel ile kolona alınmıştır. İlk olarak %10 etilasetat, petrol eteri den başlayarak %100 etil asetat aşamalı olarak çözücü karışımı geçirilmiştir. Kolondan çıkan çözücü ardarda tüplere alınarak İTK uygulanmıştır. Benzer spotların görüldüğü tüpler bir araya toplanarak çözücü uzaklaştırılmıştır. Kolon bitiminde %5 lik metanol etil asetat karışımı ile saatte 35 ml (35 ml h^{-1}) bütün maddeler alınıp kolon çalışması bitirilmiştir.

3.2.9 Erime Noktası ve Çözünürlük Testi

Saflaştırılan madde erime noktası tayin cihazına (Shimadzu) konularak erime noktası belirlenmiştir. Bu nedenle dietil eter, kloroform, toluen, etanol, aseton, butanol,

DMSO ve sudaki çözünürlüklerine bakılarak çözünürlük testi yapılmıştır (Erdik vd., 1997).

3.2.10 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

Test edilecek kimyasal maddeler, hassas terazide 6 mg (0,006g) tartılarak steril flakonlara aktarılmış ve üzerlerine 2 ml steril dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek çözülmüştür. Kimyasal maddeler, DMSO içerisinde homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. 400 µl MHB içeren eppendorf tüplerinden birine stok solüsyondan 400 µl aktararak karıştırılmıştır. İyice karıştırdıktan sonra birinci eppendorf dan 400 µl alınarak ikinci eppendorfa aktarılmış ve bu işlemleri yaparken her aktarımda yeni mikropipet ucu kullanarak devam edilmiştir. Bu şekilde maddenin iki katlı bir (1, 1/2, 1/4, 1/8,.....) konsantrasyon serisi elde edilmiştir. Daha sonra her bir tüpe ml 10^5 hücre içeren mikroorganizma süspansiyonundan 20 µl aktarılmıştır. Kapakları kapatılarak bakteri ve maya için 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda eppendorflarda üremenin olup olmadığı bulanıklılığa bakılarak belirlenmiştir. Üremenin gözlenmediği en düşük seyreltmenin temsil ettiği konsantrasyon minimum inhibe edici konsantrasyon yani MİK olarak ifade edilmiştir. Tüplere 10 µl TTC ilave edilip 3-4 saat 37°C'de inkübe edilmesiyle mikroorganizma gelişiminin gözlenmesi kolaylaştırılmıştır (NCCL, 1990).

3.2.11 Minimum Sidal Konsantrasyonu (MSK)

Minimum Sidal Konsantrasyon (MSK), MİK'in aksine mikroorganizmaların üremesini durduran değil, tamamen öldüren en düşük kimyasal konsantrasyonu bulmak için yapılmıştır. Bu nokta bakterilerin % 99,9'unun ölümüne sebep olan konsantrasyon olarak kabul edilmektedir. MİK testi sonunda üremenin gözlemlenmediği tüp ve sonraki yüksek konsantrasyonlu diğer tüplerden NA plaklarına ekim yapılmıştır. konsantrasyonun artarak çoğaldığı geri kalan tüplerden öze ile örnek alınarak Nutrient Agar plakları üzerine öze yardımı ile çizgi ekim yapılmıştır. Plaklar inkübasyona bırakılarak MSK değerleri olarak belirlenmiştir (Koneman, 1997).

4. BULGULAR

4.1 Endospor Oluşturan Basillerin İzolasyonu

Endospor oluşturan basillerin izole edildiği habitatlar bitki, hayvan ve bu iki habitatın dışındaki habitatlar olmak üzere üç grup altında değerlendirilmiştir. Toplam 414 izolattan 128'i 22 bitki örneğinin çeşitli kısımlarından, 203'ü 42 hayvan örneğinin farklı bölümlerinden, 83'ü ise organizma dışı 6 örnekten elde edilmiştir. Bitki örneklerinin rizosferinden 39 izolat elde edilirken epifitik dokusundan 36, yaprağından 14, tohumundan 29, gövdesinden 10 izolat elde edilmiştir. Hayvanların barsağından 139, yutak ve midesinden 19, yumurta ve yumurta kanalından 6, gübresinden 39 izolat elde edilirken bunlara ilaveten topraktan 44, mağara ortamından 29, fabrika atık suyundan 10 izolat elde edilmiştir.

İzolatların elde edildiği habitatlar esas alınarak yapılan izolat kodlaması ve habitatlar hakkında bilgiler Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Bitkisel habitatlar ve izolasyonda kullanılan besiyeri tiplerine göre izolat kodları

Bitki no	Taxa	Toplandığı yer ve tarih	Kısım	Besiyeri tipi	İzolat kodu	İzolat no
1P	<i>Olacium corniculatum</i> (Gelincik)	Afyon 2004 Haziran	a (rizosfer)	N	1PaN1	1
				B	1PaB2	2
				N	1PbN1	3
				N	1PbN2	4
			b (epifitik)	B	1PbB1	5
				B	1PbB2	6
				B	1PbB2	7
				B	1PbB3	8
				B	1PbB4	9
				B	1PbB5	10
				B	1PbB6	11
2P	<i>Brassica</i>	Afyon2004 Haziran	a (rizosfer)	N	2PaN1	12
				N	2PaN2	13
				N	2PaN3	14
				N	2PaN4	15
				B	2PaB1	16
			b (epifitik)	B	2PaB2	17
				B	2PaB3	18
				N	2PbN1	19
				B	2PbB1	20
				B	2PbB2	21
				B	2PbB3	22
3P	<i>Wiedemannia orientalis</i> (Ballibaba)	Afyon 2004 Haziran	a (rizosfer)	B	3PaB1	23
				B	3PaB2	24
			b (epifitik)	N	3PbN1	25
				N	3PbN2	26
				N	3PbN3	27
				N	3PbN4	28
				N	3PbN5	29
				N	3PbN6	30
				N	3PbN7	31
				N	3PbN8	32
				B	3PbB1	33
4P	<i>Carlaria disaba</i>	Afyon2004 Haziran	a (rizosfer)	N	4PaN1	34
				N	4PaN2	35
				N	4PaN3	36
				B	4PaB1	37
			b (epifitik)	N	4PbN1	38
				N	4PbN2	39
				N	4PbN3	40
				N	4PbN4	41
				N	4PbN5	42
				B	4PbB1	43
				B	4PbB2	44
B	4PbB3	45				

Çizelge 4.1. devamı

Bitki no	Taxa	Toplandığı yer ve tarih	Kısım	Besiyeri tipi	İzolat kodu	İzolat no
4P				B	4PbB4	46
5P	<i>Cupressus</i> (Servi)	K.Maraş 2004 Temmuz	c (gövde)	N	5PcN1	47
				B	5PcB1	48
				B	5PcB2	49
6P	<i>Pinus ssp.pallasiana nigra</i> (Siyah çam)	K.Maraş 2004 Temmuz	c (gövde)	N	6PcN1	50
				N	6PcN2	51
				N	6PcN3	52
				B	6PcB1	53
7P	<i>Pyrus cydonia</i> (Ayva)	K.Maraş 2004 Temmuz	c (gövde)	N	7PcN1	54
				N	7PcN2	55
				N	7PcN3	56
8P	<i>Fibigia clypeata</i>	Eskişehir 2004 Eylül	a (rizosfer)	N	8PaN1	57
				N	8PaN2	58
				N	8PaN3	59
				N	8PaN4	60
			b (epifitik)	N	8PaN5	61
				N	8PaN6	62
				B	8PaB1	63
				B	8PaB2	64
9P	<i>Echinops ritro</i> (Deve dikeneni)	Eskişehir 2004 Eylül	a (rizosfer)	B	9PaB1	65
				N	9PaN1	66
				N	9PaN2	67
				B	9PaB2	68
				B	9PaB3	69
				B	9PaB4	70
			b (epifitik)	B	9PaB5	71
B	9PaB6	72				
10P	<i>Acantholimon acerosum</i> (Çoban yastığı)	Eskişehir 2004 Eylül	a (rizosfer)	B	9PaB7	73
				N	9PbN1	75
11P	<i>Xanthium strumarium</i> (Domuz pıtırağı)	Eskişehir 2004 Eylül	a (rizosfer)	B	9PbB1	76
				N	10PaN1	77
				N	11PaN1	78
			b (epifitik)	N	11PaN2	79
				N	11PaN3	80
11P	<i>Xanthium strumarium</i> (Domuz pıtırağı)	Eskişehir 2004 Eylül	a (rizosfer)	B	11PaB1	81
				B	11PaB2	82
				B	11PaB3	83
			b (epifitik)	N	11PbN1	84
				N	11PbN2	85

Çizelge 4.1. devamı

Bitki no	Taxa	Toplandığı yer ve tarih	Kısım	Besiyeri tipi	İzolat kodu	İzolat no
				N	12PcN1	86
				N	12PcN2	87
				N	12PcN3	88
12P	<i>Grimmia trichophylla</i>	Eskişehir 2004 Temmuz	c (yaprak)	N	12PcN4	89
				N	12PcN5	90
				B	12PcB1	91
				B	12PcB2	92
				N	13PcN1	93
				N	13PcN2	94
				B	13PcB1	95
13P	<i>Spirogira sp.</i>	Eskişehir 2004 Temmuz	c (yaprak)	B	13PcB2	96
				B	13PcB3	97
				B	13PcB4	98
				B	13PcB5	99
14P	<i>Cardamine pratensis</i> (Acı tere)	Eskişehir 2004 Aralık	d (tohum)	B	14PdN1	100
15P	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Fasulye)	Eskişehir 2004 Aralık	d (tohum)	N	15PdN1	101
				N	16PdN1	102
16P	<i>Herba erucae</i> (Roka)	Eskişehir 2004 Aralık	d (tohum)	N	16PdN2	103
				B	16PdN1	104
				B	16PdN2	105
				N	17PdN1	106
				N	17PdN2	107
				N	17PdN3	108
				N	17PdN4	109
17P	<i>Urtica urens</i> (Isırgan otu)	Eskişehir 2004 Aralık	d (tohum)	N	17PdN5	110
				N	17PdN6	111
				N	17PdN7	112
				B	17PdN1	113
				B	17PdN2	114
				B	17PdN3	115
18P	<i>Vitex agnus</i> (Hayt otu)	Eskişehir 2004 Aralık	d (tohum)	N	18PdN1	116
				N	18PdN2	117
19P	<i>Mullus</i> (Barbunya)	Eskişehir 2004 Aralık	d (tohum)	B	19PdN1	118
				N	20PdN1	119
				N	20PdN2	120
20P	<i>Cucumis sativus</i> (Salatalık)	Eskişehir 2004 Aralık	d (tohum)	N	20PdN3	121
				N	20PdN4	122
				N	20PdN5	123
				B	20PdN1	124
				B	20PdN2	125
21P	<i>Papaver somiferum</i> (Haşhaş)	Eskişehir 2004 Aralık	d (tohum)	B	21PdN1	126
				B	21PdN2	127
				B	21PdN3	128

Çizelge 4.2 Hayvansal habitatlar ve izolasyonda kullanılan besiyeri tiplerine göre izolat kodları

Hayvan no	Taxa	Toplandığı yer ve tarih	Kısım	Besiyeri tipi	İzolat kodu	İzolat No
1A	Arachnidae (Örümcek)	Eskişehir 2003 Mayıs	a (barsak)	N	1AaN1	1
				N	1AaN2	2
			a (barsak)	B	2AaB1	3
				B	2AaB2	4
2A	<i>Rhagium inguisitor</i> (Teke böceği)	Eskişehir 2003 Eylül	b (yutak+mide)	N	2AbN1	5
				N	2AbN2	6
				B	2AbB1	7
				B	2AbB2	8
3A	<i>Lubricus terrestris</i> (Solucan)	Eskişehir 2003 Nisan	a (barsak)	N	3AaN1	9
				N	3AaN2	10
				B	3AaB1	11
			c (mide)	N	3AcN1	12
				N	3AcN2	13
				N	3AcN3	14
4A	<i>Lubricus terrestris</i> (Solucan)	Eskişehir 2003 Nisan	a (barsak)	B	4AaB1	15
				N	4AbN1	16
			b (yutak+mide)	N	4AbN2	17
				N	4AbN3	18
				N	4AbN4	19
				B	4AbB1	20
				B	4AbB2	21
				N	5AdN1	22
5A	<i>Meleagris</i> (Hindi)	Eskişehir 2003 Kasım	d (barsak+mide)	N	5AdN2	23
				N	5AdN3	24
				N	5AdN4	25
				N	5AdN5	26
				N	5AdN6	27
6A	<i>Callinectes</i> (Yengeç)	Eskişehir 2004 Mart	a (barsak)	B	6AaB1	27
			c (mide)	N	6AcN1	28
			e (yumurta kanalı)	N	6AeN1	29
				N	6AeN2	30
7A	<i>Erinaceus europaeus</i> (Kirpi)	Eskişehir 2003 Ekim	a (barsak)	N	7AaN1	31
				N	7AcN1	32
			c (mide)	N	7AcN2	33
8A	<i>Equus</i> (At)	İzmir 2003 Kasım	f (gübre)	N	8AfN1	34
				N	8AfN2	35
				N	8AfN3	36
				B	8AfB1	37
				B	8AfB2	38
				N	9AfN1	39
9A	<i>Passer</i> (Serçe)	Eskişehir 2004 Aralık	f (gübre)	N	9AfN2	40
				N	9AfN3	41
				N	9AfN4	42
				B	9AfB1	42

Çizelge 4.2. devamı

Hayvan no	Taxa	Toplandığı yer ve tarih	Kısım	Besiyeri tipi	İzolat kodu	İzolat No
10A	<i>Columba</i> (Güvercin)	Eskişehir 2004 Aralık	(gübre)	N	10AfN1	43
				N	10AfN2	44
				N	10AfN3	45
				N	10AfN4	46
				N	10AfN5	47
				B	10AfB1	48
				B	10AfB2	49
				B	10AfB3	50
				B	10AfB4	51
11A	<i>Ovis</i> (Koyun)	Eskişehir 2004 Şubat	d (barsak+mide)	N	11AdN1	52
				N	11AdN2	53
				B	11AdB1	54
				B	11AdB2	55
				B	11AdB3	56
				B	11AdB4	57
				B	11AdB5	58
				B	11AdB6	59
				B	11AdB7	60
12A	<i>Bos taurus</i> (İnek)	Eskişehir 2004 Şubat	d (barsak+mide)	N	12AdN1	61
				N	12AdN2	62
				N	12AdN3	63
				B	12AdB1	64
				B	12AdB2	65
				B	12AdB3	66
				B	12AdB4	67
				B	12AdB5	68
				N	12AdN4	69
13A	<i>Bos taurus</i> (İnek)	İzmir 2003 Kasım	f (gübre)	N	13AfN1	70
				N	13AfN2	71
				N	13AfN3	72
				N	13AfN4	73
				N	13AfN5	74
				B	13AfB1	75
				B	13AfB2	76
				B	13AfB3	77
				B	13AfB4	78
14A	<i>Arachnidae</i> <i>Galeodes</i> (Örümcek)	Afyon 2004 Haziran	a (barsak)	N	14AaN1	79
			e (yumurta kanalı)	N	14AeN1	80
				B	14AeB1	81
15A	<i>Carabidae</i>	Eskişehir 2004 Haziran	a (barsak)	N	15AaN1	82
				N	15AaN2	83
				N	15AaN3	84
				B	15AaB1	85
				B	15AaB2	86
B	15AaB3	87				

Çizelge 4.2devamı

Hayvan no	Taxa	Toplandığı yer ve tarih	Kısım	Besiyeri tipi	İzolat kodu	İzolat No
16A	<i>Scarabaeidae</i>	Afyon 2004 Haziran	a (barsak)	N	16AaN1	88
				N	16AaN2	89
				B	16AaB1	90
				B	16AaB2	91
				B	16AaB3	92
				B	16AaB4	93
				B	16AaB5	94
				B	16AaB6	95
				B	16AaB7	96
17A	<i>Lepidoptera</i> (Kelebek)	Eskişehir 2004 Ağustos	a (barsak)	N	17AaN1	98
				N	17AaN2	99
				B	17AaB1	100
18A	<i>Lacerta</i> (Kertenkele)	Eskişehir 2004 Haziran	a (barsak)	B	17AaB2	101
				B	17AaB3	102
			c (mide)	N	18AaN1	103
				N	18AaN2	104
				B	18AaB1	105
19A	<i>Lacerta</i> (Kertenkele)	Eskişehir 2004 Ağustos	a (barsak)	B	18AcB1	106
				B	18AcB2	107
				B	18AcB3	108
				N	19AaN1	109
20A	<i>Arachnidae</i> (Örümcek)	Eskişehir 2004 Haziran	a (barsak)	N	19AaN2	110
				N	19AaN3	111
				B	19AaB1	112
				B	19AaB2	113
				B	19AaB3	114
				N	20AaN1	115
				N	20AaN2	116
21A	<i>Histeridae</i> <i>Hister</i>	Eskişehir 2004 Haziran	a (barsak)	N	20AaN3	117
				N	20AaN4	118
				N	20AaN5	119
				B	20AaB1	120
			g (yumurta)	B	20AaB2	121
				B	20AaB3	122
				B	20AaB4	123
				N	21AaN1	124
21A	<i>Histeridae</i> <i>Hister</i>	Eskişehir 2004 Haziran	a (barsak)	N	21AaN2	125
				N	21AaN3	126
				B	21AgB1	127
			g (yumurta)	B	21AgB2	128
				B	22AaB1	130

Çizelge 4.2devamı

Hayvan no	Taxa	Toplandığı yer ve tarih	Kısım	Besiyeri tipi	İzolat kodu	İzolat No
22A	Brachycara (Sinek)	Eskişehir 2004 Haziran	a (barsak)	B	22AaB2	131
				B	22AaB3	132
				B	22AaB4	133
				B	22AaB5	134
23A	<i>Bambus</i> (Bal Arısı)	Eskişehir 2004 Ağustos	a (barsak)	N	23AaN1	135
				N	23AaN1	136
				N	23AaN2	137
				N	23AaN3	138
				B	23AaB1	139
				B	23AaB2	140
24A	<i>Lepidoptera</i> (Kelebek)	Eskişehir 2004 Ağustos	a (barsak)	N	24AaN1	142
				N	24AaN2	143
25A	(Tesbih böceği)	K.Maraş 2004 Temmuz	a (barsak)	N	25AaN1	144
				N	25AaN2	145
				N	25AaN3	146
				N	25AaN4	147
				B	25AaB1	148
				B	25AaB2	149
				B	25AaB3	150
26A	<i>Odanata</i>	Eskişehir 2004 Ağustos	a (barsak)	N	26AaN1	152
				N	26AaN2	153
				N	26AaN3	154
27A	<i>Saltotioria</i> (Çekirge)	Eskişehir 2004 Ağustos	a (barsak)	N	27AaN1	155
				N	27AaN2	156
				N	27AaN3	157
				N	27AaN4	158
				B	27AaB1	159
				B	27AaB2	160
				B	27AaB3	161
28A	<i>Lampyridae</i> (Ateş böceği)	Eskişehir 2004 Ağustos	a (barsak)	N	28AaN1	162
				N	28AaN2	163
				N	28AaN3	164
				N	28AaN4	165
				N	28AaN5	166
				N	28AaN6	167
				B	28AaB1	168
				B	28AaB2	169
				B	28AaB3	170
				29A	<i>Caelifera</i> (Kırmızı çekirge)	Eskişehir 2004 Ağustos
N	29AaN2	172				
N	29AaN3	173				

Çizelge 4.2devamı

Hayvan no	Taxa	Toplandığı yer ve tarih	Kısım	Besiyeri tipi	İzolat kodu	İzolat No
30A	Engraulis encrasicolus (Hamsi)	Karadeniz 2004 Ağustos	a (barsak)	N	30AaN1	174
				N	30AaN2	175
				N	30AaN3	176
				N	30AaN4	177
				B	30AaB1	178
				B	30AaB2	179
				B	30AaB3	180
31A	<i>Coloptera</i>	Eskişehir 2004 Ağustos	a (barsak)	N	31AaN1	181
				N	31AaN2	182
				B	31AaB1	183
				B	31AaB2	184
32A	<i>Coloptera</i>	Eskişehir 2004 Aralık	a (barsak)	B	32AaB1	185
				B	32AaB2	186
33A	<i>Arachnidae</i> (Örümcek)	Eskişehir 2004 Aralık	a (barsak)	B	33AaB1	187
34A	<i>Forficula</i> (Kulağa kaçan)	Eskişehir 2004 Aralık	a (barsak)	N	34AaN1	188
35A	<i>Struthio camelus</i> (Deve kuşu)	Bursa 2005 Ocak	f (gübre)	N	35AfN1	189
				N	35AfN1	190
				N	35AfN2	191
				N	35AfN3	192
				N	35AfN4	193
				N	35AfN5	194
				B	35AfB1	195
				B	35AfB2	196
				B	35AfB3	197
				B	35AfB4	198
				B	35AfB5	199
				B	35AfB6	200
36A	<i>Hemiptera</i> (Bayram böceği)	Eskişehir 2004 Aralık	a (barsak)	B	36AaB1	201
				B	36AaB2	202
37A	<i>Hemiptera</i> (Tıs böceği)	Eskişehir 2004 Aralık	a (barsak)	B	37AaB1	203

Çizelge 4.3. Diğer habitatlar ve izolasyonda kullanılan besiyeri tiplerine göre izolat kodları

Diğer örnek no	Toplandığı yer ve tarih	Kısım	Besiyeri tipi	İzolat kodu	İzolat no			
O1	Eskişehir 2004 Temmuz	a (kil toprağı)	N	O1aN1	1			
			N	O1aN2	2			
			N	O1aN3	3			
			N	O1aN4	4			
			N	O1aN5	5			
			N	O1aN6	6			
			N	O1aN7	7			
			N	O1aN8	8			
			N	O1aN9	9			
			N	O1aN10	10			
			N	O1aN11	11			
			N	O1aN12	12			
			N	O1aN13	13			
			N	O1aN14	14			
			N	O1aN15	15			
			N	O1aN16	16			
			N	O1aN17	17			
			O2	Eskişehir 2004 Mayıs	a (mağara toprağı)	N	O1aN18	18
						N	O1aN19	19
N	O2aN1	20						
N	O2aN2	21						
N	O2aN3	22						
N	O2aN4	23						
N	O2aN5	24						
N	O2aN6	25						
N	O2aN7	26						
N	O2aN8	27						
N	O2aN9	28						
N	O2aN10	29						
N	O2aN11	30						
N	O2aN12	31						
N	O2aN13	32						
N	O2aN14	33						
N	O2aN15	34						
N	O2aN16	35						
N	O2aN17	36						
N	O2aN18	37						
N	O2aN19	38						
N	O2aN20	39						
N	O2aN21	40						
N	O2aN22	41						
N	O2aN23	42						
N	O2aN24	43						
N	O2aN25	44						

Çizelge 4.3.devamı

Diğer örnek no	Toplandığı yer ve tarih	Kısım	Besiyeri tipi	İzolot kodu	İzolot no
O2			N	O2aN26	45
			N	O2aN27	46
			N	O2aN28	47
			N	O2aN29	48
O3	Eskişehir2004 Temmuz	a (toprak)	N	O3aN1	49
			N	O3aN2	50
			B	O3aB1	51
			B	O3aB2	52
			B	O3aB3	53
O4	Isparta 2004 Eylül	a (toprak)	N	O4aN1	54
			N	O4aN2	55
			N	O4aN3	56
			N	O4aN4	57
			N	O4aN5	58
			B	O4aB1	59
			B	O4aB2	60
			B	O4aB3	61
O5	Afyon 2004 Nisan	a (toprak)	B	O4aB4	62
			B	O4aB5	63
			B	O4aB6	64
			B	O4aB7	65
			N	O5aN1	66
			N	O5aN2	67
			N	O5aN3	68
			N	O5aN4	69
			N	O5aN5	70
			N	O5aN6	71
O6	Eskişehir 2004 Aralık	b (su)	N	O5aN7	72
			N	O5aN8	73
			N	O6bN1	74
			N	O6bN2	75
			N	O6bN3	76
			N	O6bN4	77
			B	O6bB1	78
			B	O6bB2	79
			B	O6bB3	80
			B	O6bB4	81
B	O6bB5	82			
B	O6bB6	83			

4.2. Endospor Oluşturan Basillerin Antimikrobiyal Aktivitesi

İzolatlarının piece agar yöntemi ile test organizmalarına karşı gösterdikleri aktivite Çizelge 4.4, 4.5 ve 4.6 da verilmiştir.

Çizelge 4.4 Bitki örneklerinden elde edilen izolatların piece agar yöntemiyle test organizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (Ø10 mm).

İzolat Kodu	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. graminearum</i>
1PaN1	12	-	-	-	-	-	-	-	-
1PbN1	-	11	-	-	-	-	11	-	-
1PbN2	-	-	-	-	-	-	-	-	11
1PbB2	11	-	-	-	-	-	-	-	-
1PbB4	-	-	-	-	-	-	-	11	-
1PbB5	-	-	-	-	-	11	-	-	-
2PaN3	-	14	-	20	-	-	-	12	12
2PaB1	-	-	-	-	-	14	14	12	16
3PaB2	-	11	-	-	-	-	-	-	-
3PbN2	-	-	-	-	-	-	-	11	-
4PbN4	-	-	-	12	-	13	16	22	20
4PbN5	-	-	-	16	-	20	-	-	14
5PcB1	11	-	-	-	-	11	-	-	-
5PcB2	15	11	-	12	12	30	14	12	20
6PcN1	11	-	-	-	-	-	-	-	-
6PcN3	-	11	-	-	-	-	-	-	-
8PaN1	-	-	-	-	-	30	28	-	-
8PaN2	-	-	-	-	-	12	15	14	28
8PaN6	-	-	-	-	-	11	16	-	18
8PaB2	11	-	-	11	-	-	16	14	14
9PaN1	-	-	-	-	-	30	18	16	26
9PaN2	-	-	-	-	-	18	16	-	20
9PaB1	-	-	-	-	-	20	-	-	-
9PaB2	13	13	11	20	-	16	12	18	22
9PaB3	-	-	-	-	-	12	-	-	-
9PaB4	-	-	-	-	-	14	14	16	14
9PaB5	-	-	-	-	-	17	-	-	-
9PaB6	-	-	-	-	-	20	-	-	-
9PaB7	-	11	-	-	-	16	20	16	22
10PaN1	-	-	-	-	-	20	-	-	16
11PaN2	-	-	-	11	-	13	16	12	24
11PaN3	12	-	-	-	-	16	14	14	22

Çizelge 4.4. devamı

İzolat Kodu	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. graminearum</i>
11PaB1	-	-	-	-	-	22	-	-	16
11PaB2	-	-	11	15	-	-	-	-	30
11PaB3	-	-	-	-	-	-	12	14	18
11PbN1	-	-	-	15	-	18	16	-	20
11PbN2	-	-	-	-	-	40	-	14	20
12PcN2	-	-	-	-	-	-	11	-	-
12PcN4	-	-	-	11	-	-	12	-	-
12PcB2	-	11	-	-	-	11	-	-	-
13PcB1	-	-	-	-	-	12	-	-	-
13PcB3	-	-	-	-	-	11	-	-	-
13PcB4	-	-	-	-	-	12	-	-	-
13PcB5	-	-	-	-	-	24	16	-	24
14PdB1	-	-	-	-	-	-	-	14	14
15PdN1	-	11	-	-	-	26	-	16	24
16PdN1	-	-	-	-	-	-	12	12	20
16PdN2	-	-	-	-	-	-	-	-	12
16PdB1	-	-	-	-	-	-	-	14	12
16PdB2	-	-	-	11	-	28	-	-	13
17PdN1	11	-	-	-	-	-	-	-	-
17PdN2	-	-	-	-	-	20	-	-	20
17PdN3	-	11	-	-	-	26	14	-	14
17PdN4	13	16	-	15	-	-	16	14	25
17PdN5	-	-	-	-	-	20	-	-	-
17PdN6	-	-	-	-	-	-	16	-	15
17PdN7	12	-	-	18	-	22	-	-	20
17PdB1	11	12	-	17	-	-	22	-	-
17PdB2	14	13	-	20	-	-	16	17	-
17PdB3	11	11	-	17	-	-	22	12	18
18PdN1	13	12	-	19	-	-	12	-	-
18PdN2	15	11	-	18	-	-	26	-	14
19PdB1	-	-	-	-	-	14	18	12	12
20PdN2	-	-	-	-	-	14	14	-	-
20PdN3	-	-	-	-	-	12	16	-	16
20PdN4	-	-	-	-	-	16	-	14	16
20PdN5	-	-	-	-	-	-	18	-	14
21PdB2	-	-	-	-	-	12	18	-	-
21PdB3	-	-	-	-	-	-	14	15	17

Bitkilerden elde edilen 128 izolattan % 53'ü en az bir mikroorganizmaya karşı aktivite göstermiştir. Aktivite gösterenler arasında %8'i sadece bakterilere, % 53'ü sadece funguslara, % 37'si hem bakteri hem de funguslara karşı etki göstermiştir.

Çizelge 4.5. Hayvan örneklerinden elde edilen izolatların piece agar yöntemiyle test organizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (Ø10 mm).

İzolat no	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. graminearum</i>
2AaB1	11	-	-	-	-	11	12	12	14
2AbN1	-	-	-	-	11	14	-	14	16
2AbB1	-	-	-	12	-	-	-	-	12
2AbB2	-	-	-	12	-	-	-	12	16
3AaN2	-	14	-	15	-	-	-	12	12
3AaB1	-	-	-	11	-	-	-	-	-
3AcN1	-	-	-	-	-	-	14	22	22
3AcN2	-	14	-	15	-	-	-	12	14
4AbN2	-	-	-	11	-	12	12	14	15
4AbN3	-	-	-	11	-	11	12	22	18
5AdN3	-	-	-	-	-	-	11	-	-
5AdN5	-	-	11	-	-	-	-	-	-
6AcN1	-	11	-	-	-	-	-	-	-
7AcN1	-	-	-	12	-	-	12	12	-
8AfN1	15	13	-	15	-	26	12	-	-
9AfN1	-	-	-	11	-	-	-	-	-
10AfN1	-	-	11	12	-	12	-	16	12
10AfN2	-	-	-	11	-	-	14	12	-
10AfN5	-	-	-	-	-	15	20	-	16
10AfB1	-	-	-	-	-	12	-	-	-
11AdB2	-	-	-	14	-	-	-	-	-
11AdB4	-	-	-	14	-	20	-	12	14
12AdN2	-	-	-	-	-	16	-	-	-
12AdN3	-	-	-	-	-	15	-	-	-
12AdB1	-	-	-	-	-	14	-	-	-
12AdB2	-	-	-	-	-	16	-	-	-
12AdB3	-	-	-	-	-	18	12	14	-
12AdB4	-	-	-	-	-	17	-	-	-
12AdB5	-	11	-	16	-	20	18	20	20
13AfN1	-	-	-	-	-	20	-	16	14
13AfN2	17	16	-	18	-	20	-	16	14
13AfN3	13	11	-	18	-	-	-	-	-
13AfN4	14	-	-	-	-	12	-	-	-

Çizelge 4.5. devamı

İzolat no	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. graminearum</i>
13AfB1	21	18	-	20	-	26	13	14	18
13AfB2	11	-	-	-	-	-	-	-	-
13AfB3	12	14	-	-	13	18	-	16	18
13AfB4	11	-	-	-	-	30	-	14	14
14AaN1	-	-	-	-	-	-	-	22	20
14AeN1	-	-	-	11	-	11	-	19	-
14AeB1	-	-	-	11	-	11	-	19	-
15AaN1	-	-	-	11	-	-	-	-	-
15AaN2	-	-	-	12	-	14	12	13	20
15AaN3	-	-	-	11	-	-	-	-	-
15AaB2	-	-	-	11	-	-	-	-	-
16AaN2	11	-	-	-	-	-	-	-	-
17AaN1	-	-	-	14	-	-	-	-	-
17AaN2	-	-	-	12	-	-	-	-	-
17AaB1	-	-	-	14	-	-	12	14	12
17AaB2	-	-	-	15	-	-	-	-	-
17AaB3	-	-	-	12	-	20	14	20	14
19AaN3	-	-	-	-	-	11	-	-	-
20AaN1	13	-	11	-	-	22	-	26	14
20AaN4	11	12	-	-	-	-	-	-	-
20AaN5	-	13	-	-	-	11	-	-	-
21AaN3	11	12	11	15	-	26	-	20	18
21AgB1	-	-	-	-	-	26	-	20	18
21AgB2	-	-	-	-	-	12	14	13	-
22AaB3	-	-	-	-	-	-	18	-	-
22AaB4	12	-	-	-	-	11	18	20	20
22AaB5	-	15	-	-	-	-	-	18	18
23AaN3	-	-	-	-	-	15	12	20	18
23AaB2	-	-	-	-	-	16	12	-	-
23AaB3	18	-	-	-	-	-	-	-	-
25AaN1	11	-	-	-	-	11	12	-	-
25AaN2	-	14	-	-	-	24	-	16	20
25AaN3	-	-	-	-	-	-	-	16	12
25AaB4	-	-	-	-	-	13	12	12	-
26AaN1	-	-	-	-	-	-	12	12	12
27AaN1	13	-	-	-	-	-	-	16	22
27AaN3	15	12	-	14	-	35	-	20	18
27AaB2	-	-	-	-	-	14	-	-	-
28AaN3	12	-	13	-	-	12	-	-	-

Çizelge 4.5. devamı

İzolat no	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. graminearum</i>
28AaN4	-	12	-	-	-	-	-	14	12
28AaN5	13	13	12	-	-	16	-	-	-
28AaB3	-	-	-	-	-	15	14	20	16
29AaN1	12	-	-	-	-	-	-	-	12
29AaN2	-	-	11	-	-	14	12	-	-
29AaN3	-	-	-	-	12	14	-	16	16
30AaN1	-	-	-	-	-	13	12	18	18
30AaN2	-	-	-	-	-	-	16	14	-
30AaN3	11	15	-	-	-	-	-	-	-
30AaB1	-	-	-	-	-	-	14	-	-
31AaN1	-	15	-	-	-	16	-	18	16
31AaN2	11	-	-	-	-	30	-	12	20
32AaB1	11	11	-	11	-	14	-	16	18
32AaB2	11	11	-	-	-	14	-	12	12
33AaB1	-	-	-	-	-	-	-	14	16
34AaN1	-	-	-	-	-	-	12	14	14
35AfN1	-	-	-	-	-	-	12	14	12
35AfN2	-	-	-	-	-	-	12	14	12
35AfN3	-	-	-	-	-	-	-	12	-
35AfN4	-	-	-	-	-	20	16	14	-
35AfN5	-	-	-	-	-	-	-	-	12
35AfB2	-	-	-	-	-	-	12	16	18
35AfB3	-	-	-	-	-	-	16	21	13
35AfB4	-	-	-	-	-	16	12	20	16
35AfB5	-	-	-	-	-	-	12	-	12
36AaB1	-	-	-	-	-	-	-	14	18

Hayvan kaynaklı 203 izolatın % 48'i aktivite gösterirken bunların %16'ı sadece bakterilere, %40'ı sadece funguslara, %42'si hem bakteri ve hem de funguslara karşı aktivite göstermiştir.

Çizelge 4.6 Diğer örneklerden elde edilen izolatlarının piece agar yöntemiyle test organizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (Ø10 mm).

İzolot no	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. graminearum</i>
O1aN1	13	-	-	-	-	-	20	26	14
O1aN11	-	-	-	11	-	11	-	-	-
O1aN14	11	-	11	-	-	-	-	-	-
O1aN15	-	-	11	-	-	-	-	-	-
O1aN17	-	-	11	-	11	22	20	18	19
O1aN18	12	-	-	-	-	-	-	-	12
O1aN19	15	-	-	-	-	-	12	12	16
O2aN1	18	11	-	13	-	-	-	-	-
O2aN3	13	-	-	-	-	-	-	-	-
O2aN5	15	-	-	20	-	-	-	-	-
O2aN6	20	-	-	13	-	-	-	-	-
O2aN7	21	13	-	-	-	-	-	-	-
O2aN8	12	-	-	-	-	-	-	-	-
O2aN9	16	-	-	-	-	-	-	-	-
O2aN10	12	-	-	-	-	-	-	-	-
O2aN11	17	-	-	-	-	-	-	-	-
O2aN12	16	-	-	-	-	-	-	-	-
O2aN13	21	12	-	11	-	-	-	-	-
O2aN17	12	-	-	-	-	-	-	-	-
O2aN18	-	11	-	-	-	-	-	-	-
O2aN19	20	11	-	-	-	-	-	-	-
O2aN20	16	12	-	12	-	-	-	-	-
O2aN21	15	-	-	14	-	-	-	-	-
O2aN22	12	-	-	-	-	-	-	-	-
O2aN23	15	-	-	-	-	-	-	-	-
O2aN24	19	-	-	11	-	-	-	-	-
O3aN2	-	-	-	-	-	15	14	-	-
O3aB1	-	-	-	-	-	-	-	18	18
O3aB2	11	-	-	15	-	-	16	12	16
O3aB3	-	-	-	13	-	15	-	-	-
O4aN1	13	-	-	-	-	14	14	12	-
O4aN3	12	-	-	-	-	30	15	-	-
O4aN4	11	12	-	11	-	22	14	20	18
O4aN5	-	11	-	-	-	18	12	-	-
O4aB1	-	-	-	11	-	-	18	20	12
O4aB2	-	-	-	-	-	-	18	20	12

Çizelge 4.6 devamı

O4aB3	-	-	-	-	-	-	-	14	16
O4aB5	-	-	-	-	-	-	12	-	-
O4aB6	-	-	-	-	-	-	14	14	14
O4aB7	-	-	-	-	-	16	14	-	-
O5aN1	-	-	-	-	-	13	14	-	-
O5aN4	-	-	-	-	-	11	-	-	-
O5aN7	-	-	-	-	-	22	18	12	18
O5aN8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O6bN1	-	-	-	12	-	-	-	-	-
O6bN2	-	-	-	13	-	-	-	12	-
O6bN3	-	15	-	16	-	-	-	-	-
O6bN4	-	16	-	18	-	-	-	-	20
O6bB1	12	12	-	16	-	-	-	12	12
O6bB2	14	12	-	18	-	20	-	14	12
O6bB3	15	15	-	11	-	-	-	-	-
O6bB4	18	15	-	19	-	-	-	-	-
O6bB5	-	-	-	21	-	-	-	14	14
O6bB6	-	-	-	-	-	-	-	-	18

Organizma dışı kaynaklardan elde edilen 83 izolattan %62'si aktivite göstermiş olup bunların %48'si bakteriler, %21'i funguslar, %30'u hem bakteri ve hem de funguslar üzerine etkili olduğu bulunmuştur.

Ayrıca çizelge 4.7'de inhibisyon zonuna bağlı olarak test organizmalarına karşı etki gösteren aktif kültürlerin sayıları ve % oranları verilmiştir, 414 izolattan, 293 izolat hiç bir mikroorganizmaya etki göstermezken, 221 izolat en azından bir test organizmasına karşı etki göstermiştir.

Aktivite gösteren 221 izolat arasından seçim yapabilmek için dirençli klinik izolatlara karşı etkileri piece agar ve disk difüzyon yöntemleriyle belirlenmiştir. İnhibisyon zonu oluşturan izolatlar Çizelge 4.9 ve 4.10 da verilmiştir.

Çizelge 4.7 Test organizmalarına etki gösterdiği belirlenen 221 endospor oluşturan basillerin antimikrobiyal etki dağılımları (adet)

Test organizmaları	++++	+++	++	Pasif	Total aktif	% Aktif
<i>S. aureus</i>	-	5	66	150	71	17.1
<i>B. cereus</i>	-	-	51	170	51	12.3
<i>E. coli</i>	-	-	12	209	12	2.9
<i>Y. enterocolitica</i>	-	6	65	150	71	17.1
<i>P. aeroginasa</i>	-	-	5	216	5	1.2
<i>C. albicans</i>	8	28	70	115	106	25.6
<i>B. cinerea</i>	-	7	79	135	86	20.7
<i>F. solani</i>	-	19	82	120	101	24.3
<i>F. graminearum</i>	1	26	83	111	110	26.5

++++: inhibisyon zonu ≥ 30 mm, +++: 20-29 mm, ++: 10-19mm, pasif: inhibisyon oluşmamış.

Çizelge 4.8 Standart Bacillus türlerinin piece agar yöntemine göre test mikroorganizmalarına karşı gösterdikleri aktivite. (Ø10 mm).

Standart <i>Bacillus</i> spp	Test Mikroorganizmaları								
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. aeroginasa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. graminearum</i>
<i>B. circulans</i>	-	-	-	-	-	24	14	18	34
<i>B. alvei</i>	-	-	-	-	-	-	14	16	18
<i>B. mycoides</i>	-	-	-	-	-	19	12	-	12
<i>B. licheniformis</i>	12	13	13	13	15	-	22	16	14
<i>B. pumilis</i>	-	-	-	-	-	11	15	16	26
<i>B. polymyxa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	16
<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	12	-	18	16
<i>B. macerans</i>	-	-	-	-	-	-	-	18	14
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	20	-	24	18
<i>B. coagulans</i>	-	-	-	-	-	-	16	24	19

Çizelge 4.9. İzolatların test organizmalarına karşı piece agar yöntemine göre aktivite sonuçları (Agar bloğun çapı 10mm).

İzolat No	MRSA	<i>E. faecium</i>	<i>A. baumannii</i>
2PaB1	14		-
2PaN3	-	11	-
4PbN5	-	12	-
8PaB2	-	12	-
8PaN1	19	-	-
9PaB4	12	11	12
10PaN1	12	11	-
11PaB3	11	12	-
11PbN1	-	13	-
11PbN2	11	-	-
13PcB5	15	-	-
15PdN1	-	14	-
17PdB1	16	-	-
17PdB2	-	17	-
17PdB3	11	-	12
17PdN1	11	-	-
17PdN2	11	-	-
17PdN4	13	-	-
18PdN1	11	-	-
18PdN2	12	-	11
20PdN5	20	-	-
4OaB7	11	-	-
4OaN4	-	16	-
4OaN3	14	-	-
6ObB5	12	-	11
6ObB4	12	12	12
3AcN1	-	-	12
3AcN2	11	-	-
8AfN1	13	-	-
9PaB4	12	-	-
10AfN5	14	-	-
10AfN1	-	11	-
11AdB4	14	18	-
12AdB5	-	13	-
12AdB3	14	-	-
13AfB3	-	12	-
13AfB4	-	14	-
14aaN1	12	-	-
15AaN2	-	14	-
17AaB3	11	-	-
20AaN1	11	-	-

Çizelge 4.9 devamı

İzolat No	MRSA	<i>E. faecium</i>	<i>A. baumannii</i>
21AaN3	11	15	-
22AaB3	11	-	-
26AaN1	11	-	12
27AaN3	12	-	-
27AaN1	11	-	-
29AaN3	15	-	-
30AaN2	12	-	-
32AaB2	-	14	-
35AfB2	-	-	14
35AfN1	-	-	14
35AfB5	11	11	-
36AaB1	-	12	-
Bacitracin	30	28	21
Vankomisin (30 mcg/disk)	20	-	8
Oksasilin (1 mcg/disk)	-	-	-

Çizelge 4.10. Aktivite gösteren 53 izolatın dirençli suşlara karşı piece agar yöntemine göre antimikrobiyal etki dağılımları (adet)

Test organizmaları	++++	+++	++	Pasif	Total aktif	%Aktif
MRSA	-	1	35	17	36	67,9
<i>E. faecium</i>	-	-	21	32	21	39,6
<i>A. baumannii</i>	-	-	9	44	9	16,9

++++: inhibisyon zonu ≥ 30 mm, +++: 20-29 mm, ++: 10-19mm, **pasif**: inhibisyon oluşmamış.

Çizelge: 4.11 İzolatların difüzyon yöntemi kullanarak klinik test organizmalarına karşı görülen aktivite sonuçları (disk çapı 6mm)

İzolat No	MRSA	<i>E. faecium</i>	<i>A. baumannii</i>
2PaB1	20	-	8
2PaN3	-	-	-
4PbN5	-	-	-
8PaB2	-	-	-
8PaN1	9	10	8
9PaB4	9	10	9
10PaN1	-	-	-
11PaB3	-	-	-
11PbN1	8	10	9
11PbN2	-	-	-
13PcB5	10	10	9
15PdN1	8	10	8
17PdB1	8	10	8
17PdB2	8	8	8
17PdB3	8	9	7
17PdN1	-	-	-
17PdN2	-	-	-
17PdN4	9	9	8
18PdN1	-	-	-
18PdN2	8	-	8
20PdN5	8	9	8
4OaB7	-	-	-
4OaN4	8	8	8
4OaN3	8	8	8
6ObB5	9	8	9
6ObB4	9	9	9
3AcN1	8	8	-
3AcN2	-	-	-
8AfN1	8	8	-
9PaB4	-	-	-
10AfN5	8	8	-
10AfN1	-	-	-
11AdB4	9	8	7
12AdB5	8	8	8
12AdB3	8	9	7
13AfB3	-	-	-
13AfB4	9	8	-
14aaN1	-	-	-
15AaN2	20	16	13
17AaB3	-	-	-

Çizelge: 4.11

20AaN1	-	-	-
21AaN3	8	8	7
22AaB3	-	-	-
26AaN1	10	10	8
27AaN3	-	-	-
27AaN1	-	-	-
29AaN3	9	8	8
30AaN2	-	-	-
32AaB2	17	15	10
35AfB2	10	10	8
35AfN1	10	10	8
35AfB5	-	-	-
36AaB1	-	-	-
Bacitracin	30	28	21
Vankomycine (30mcg/disk)	20	-	8
Oxacillin (1mcg/disk)	-	-	-

Çizelge 4.12 İzolatların dirençli suşlara karşı disk difüzyon yöntemine göre antimikrobiyal etki dağılımları (adet)

Test organizmaları	++++	+++	++	Pasif	Total aktif	%Aktif
MRSA	-	2	5	23	7	23,3
<i>E. faecium</i>	-	-	11	25	11	30,5
<i>A. baumannii</i>	-	-	2	27	2	10,0
++++: inhibisyon zonu ≥ 30 mm, +++: 20-29 mm, ++: 10-19mm, pasif : inhibisyon oluşmamış.						

4.2 İzolatların İdentifikasyonu

Klinik suşlara en etkili izolatlardan 10 tane izolat seçilerek identifikasyonu yapılmıştır. Bu izolatlar, 2PaB1, 8PaN1, 9PaB4, 13PcB5, 15PdN1, 35AfB2, 26AaN1, 33AaB2, 15AaN2, O6Bb4 dür.

4.2.1 Biyokimyasal Özelliklere Dayalı İdentifikasyon

Aktivite gösterdiği belirlenen 10 izolattın VITEK ile belirlenen test bulguları ve veritabanına dayalı identifikasyon sonuçları Çizelge 4. 14 de verilmiştir. VITEK ile FAME sonuçlarının karşılaştırılması Çizelge 4.16 da verilmiştir.

VITEK ile yapılan testler sonucunda yapılan testler sonucunda 10 izolattan 4'ü *B. subtilis*, 4'ü *B. cereus* 2' si *B. amyloliquefaciens*, olarak identifiye edilmiştir. .

4.2.2 Yağ Asidi Profillerine Dayalı İdentifikasyon

Biyokimyasal özelliklerine göre VITEK ile identifiye edilen aynı 10 izolattın yağ asidi profillerine göre identifikasyonu yapılmıştır ve Çizelge 4. 15' de gösterilmiştir.

Bakterilerde bulunan yağ asitlerinin tipi ve miktarı esas alınarak yapılan identifikasyonda *B. cereus* da en yüksek oranda (31,2) 15:ISO, en düşük oranda (0,51) 18:1w9c yağ asidi belirlenmiştir. *P. macerans* da en yüksek oranda bulunan yağ asiti ise (35,5) 15: 0 Anteiso iken en düşük oranda bulunan yağ asidi (0,13) 13: 0 Anteiso olduğu belirlenmiştir. *B. amyloliquefaciens*'e ait 1 izolat elde edilirken yapısında en yüksek oranda bulunan yağ asidi (31,3) 15: 0 Anteiso A, en düşük oranda bulunan yağ asidi ise (0,31) 12:00 olduğu belirlenmiştir. *B. subtilis* olarak tanımlanan izolatta en yüksek oranda bulunan yağ asidi (36,6) 15: 0 Anteiso, en düşük yağ asiti oranının ise (0,2) 13: 0 ISO bulunduğu belirlenmiştir.

İdentifiye edilen 3 türe ait izolatlardan klinik izolatlara karşı en yüksek aktivite gösteren suşu daha ayrıntılı çalışmak üzere seçilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.13 Aktivite gösteren 10 izolatın biyokimyasal özellikleri ve VITEK sistemi ile identifikasyonu

Yapılan Testler	2PaB1	8PaN1	9PaB4	13PcB5	15PdN1	35AfB2	26AaN1	33AaB2	15AaN2	O6bB4
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
8	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
9	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
10	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
11	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
12	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
14	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
15	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
19	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
25	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
26	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
27	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
29	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>
1. Negatif kontrol; 2. Galaktoz; 3. Amigdalın; 4. Sorbitol; 5. Oleandomysin; 6. Trehaloz; 7. Sukroz; 8. Arabinoz; 9. İnulin; 10. N-asetil D- glukozamine; 11. Sodyum asetat; 12. Tetrazolyum kırmızısı; 13. Ksilol; 14. Riboz; 15. Amilopektin; 16. Arabitol; 17. Tagatose; 18. mannitol; 19. Maltos; 20. Potasyum thioyanate; 21. Polymidohygro streptin; 22. Glukoz; 23. Rafinoz; 24. Trehaloz; 25.%7 Nacl; 26. Nalidixic asit; 27. İnositol; 28. Salisin; 29. Platinoz; 30. Mandelik asit; 31. Esculin										

Çizelge.4.14. Aktivite gösteren 10 izolatın yağ asit profilleri

Yağ Asitleri	İzolatlar									
	2PaB1	8PaN1	9Pa4	13PcB5	15PdN1	26AaN1	35Afb2	O6Bb4	15AaN2	32AaB2
10:0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11:0 ISO	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12:0 ISO	0.50	1.00	0.58	0.66	0.57	0.44	1.87	–	–	–
12:0	0.35	0.56	0.73	0.60	0.37	0.41	0.89	0.31	–	–
13:0 ISO	9.63	11.29	10.65	13.87	9.56	8.56	14.55	–	0.35	0.48
13:0 ANTEISO	0.90	2.15	0.98	1.33	1.02	1.00	1.44	–	–	–
14:0 ISO	4.06	5.51	3.47	4.05	4.64	3.21	7.05	0.75	0.65	0.68
14:0	2.76	3.27	3.91	2.94	2.98	2.81	2.92	0.72	1.78	2.22
15:0ISO	31.55	26.82	33.40	33.46	29.04	30.05	25.97	31.12	23.76	26.38
15:0 ANTEISO	4.30	6.46	3.55	3.95	4.43	4.57	3.58	31.36	36.80	34.79
15:0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
16:1w7c alkol	0.72	0.78	0.88	0.63	0.85	0.55	1.17	0.46	–	–
12:0	1.77	1.75	1.62	1.19	2.11	1.46	1.17	–	–	–
ALDE?										
16:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ISOI/14:0 3OH										
16:0 ISO	6.35	6.45	5.16	4.73	6.43	5.73	7.65	2.73	1.18	1.20
16:1w11c	0.67	0.80	0.81	0.80	0.71	0.68	1.45	1.20	3.76	3.99
16:1 w7c/15iso	10.65	10.70	14.61	10.69	10.99	11.17	8.33	–	–	–
2OH										
16:0	6.32	7.15	5.00	4.84	6.06	6.82	8.52	5.24	11.45	12.70
15:0 2OH	0.46	–	0.38	–	0.48	–	–	–	–	–
ISO 17:1 w10c	3.21	2.53	2.97	2.33	3.44	2.69	3.00	1.27	1.77	1.60
17:1 ISO I	–	–	–	–	–	–	–	0.72	0.80	–
/ANTEI B										
ISO 17:1 w5c	3.67	2.61	3.94	2.37	4.07	3.43	1.24	–	–	–
17:1 ANTEISO A	0.69	0.79	0.55	0.51	0.84	0.75	–	–	–	–
17:0 ISO	10.19	7.65	5.61	9.28	9.38	12.32	7.54	12.35	8.84	8.51
17:0ANTEISO	1.27	1.70	0.79	1.21	1.32	1.93	0.98	11.16	8.05	6.54
18:1 w9c	–	–	0.41	–	–	0.63	–	–	–	–
18:0	–	–	–	0.55	0.69	0.79	0.64	0.61	0.83	0.92
	<i>B.cereus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B. amyloliquefa</i>	<i>P. macerans</i>
										<i>P. macerans</i>

Çizelge 4.15 VITEK sistemi ve FAME sonuçlarının karşılaştırılması

İzolot kodu	VITEK %	FAME
2PaB1	%97 <i>B. cereus</i> group <%1 <i>Bacillus pantothenicus</i>	0.907 <i>Bacillus cereus</i> –GC subgroup A 0.744 <i>B. thuringiensis-kurstaki</i> 0.739 <i>B. thuringiensis- israelensis</i>
8PaN1	%99 <i>B. subtilis</i> <%1 <i>B.licheniformis</i>	0.716 <i>B. cereus</i> GC subgroupB 0.692 <i>B. cereus</i> subgroub A 0.457 <i>B. thuringiensis kurstaki</i>
9PaB4	% 99 <i>B. cereus</i> group <%1 <i>B. pantothenicus</i>	0.674 <i>B. cereus</i> subgroup A 0.667 <i>B. thuringiensis israilensis</i> 0.558 <i>B. thuringiensis kurstaki</i> 0.510 <i>B. thuringiensis dendrolimus</i>
13PcB5	% 99 <i>B. cereus</i> group <%1 <i>P. alvei</i>	0.719 <i>B. cereus</i> GC subgroupA 0.523 <i>B. thuringiensis israilensis</i> 0.519 <i>B. thuringiensis kurstaki</i>
15PdN1	% 99 <i>B. amyloliquefaciens</i>	0.857 <i>B cereus</i> GC subgroupA 0.642 <i>B. thuringiensis kurstaki</i> 0.564 <i>B. thuringiensis israilensis</i> 0.526 <i>B. cereus</i> GC subgroup B
26AaN1	%98 <i>B. cereus</i> group	0.676 <i>B. cereus</i> GC subgroup B 0.553 <i>B. cereus</i> GC subgroup A
35AfB2	%99 <i>B. amyloliquefaciens</i>	0.732 <i>B. cereus</i> GC subgroup A 0.523 <i>B. thuringiensis israelensis</i> 0.481 <i>B. thuringiensis kustakii</i>
O6Bb4	%99 <i>B. pumilis</i> <%1 <i>B. amyloliquefaciens</i>	0.648 <i>B. amyloliquefaciens</i> 0.639 <i>B. subtilis</i> 0.557 <i>B. laevolacticus</i> 0.413 <i>B. licheniformis</i>
15AaN2	%99 <i>B. subtilis</i> <%1 <i>B. licheniformis</i>	0.828 <i>P. macerans</i>
33AaB2	% 99 <i>B. subtilis</i>	0.844 <i>P. macerans</i> 0.659 <i>P. lentimorbus</i>

Çizelge 4.16 Seçilen 10 izolatin 3 klinik izolata karşı aktiviteleri (disk çapı 6mm)

İzolat	MRSA	<i>E. faecium</i>	<i>A. baumannii</i>	FAME sonucu
2PaB1	20	-	8	<i>B. cereus</i>
8PaN1	9	10	9	
9PaB4	9	10	9	
13PcB5	10	10	9	
15PdN1	8	10	8	
35AfB2	10	10	8	
26AaN1	10	10	8	
33AaB2	17	15	10	<i>P. macerans</i>
15AaN2	20	16	13	
O6bB4	9	9	9	<i>B. amyloliquefaciens</i>

Çizelge 4.17 *P. macerans*'ın disk difzyon yöntemine göre çeşitli test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi (disk çapı 6mm)

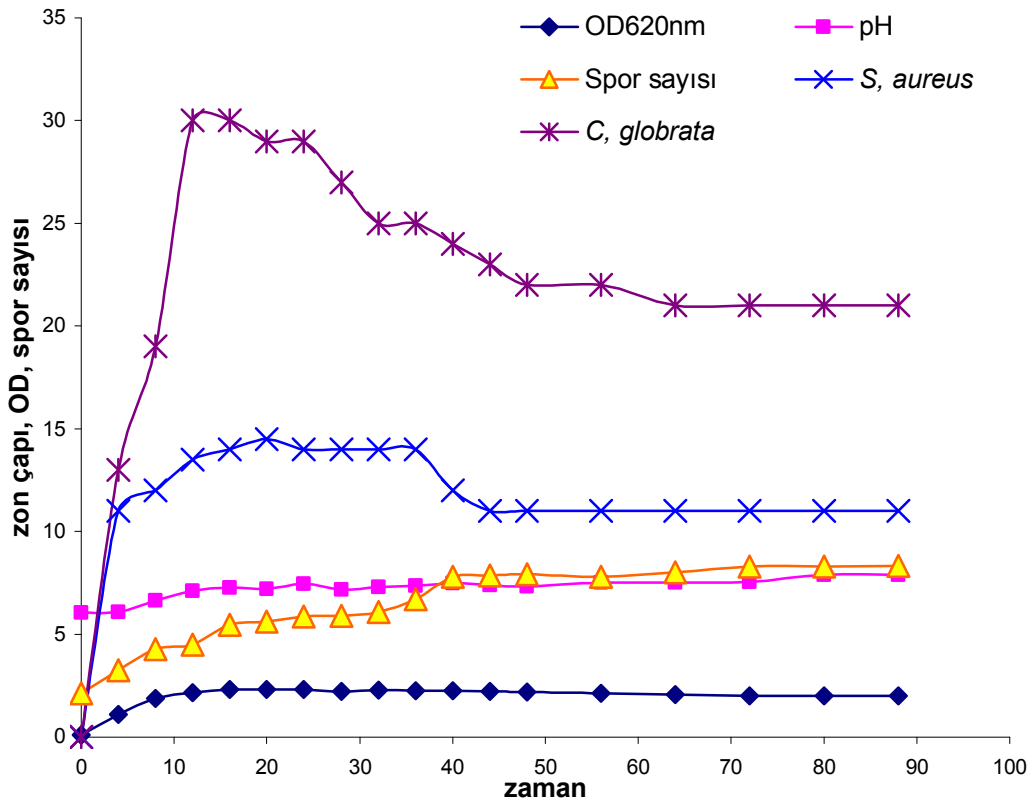
Test Mikroorganizmaları	15AaN2 (10µl/disk)
<i>E. coli</i>	8
<i>Ps pv. phaseolicola</i> T1599	7
<i>Ps. pv. glycine</i> PG1-T	9
<i>Ps. maltophila</i>	8
<i>Ps. gingeri</i> 3146	8
<i>Proteus vulgaris</i>	8
<i>Y. enterocolitica</i>	8
<i>E. aeroginasa</i>	-
<i>P. aeroginasa</i>	8
<i>S. aureus</i>	8
<i>S. faecium</i>	8
<i>S. epidermidis</i>	-
<i>C. albicans</i>	9
<i>C. glabrata</i>	16
<i>A. parasiticus</i>	-
<i>A. fumigatus</i>	-
<i>A. flavus</i>	-
<i>A. niger</i>	-
<i>F. graminearum</i>	-
<i>F. solani</i>	-
<i>G. candidum</i>	12
<i>B. cinerea</i>	8

Çizelgeye 4.17'ye göre 3 klinik izolata karşı en yüksek aktiviteye sahip olan 15AaN2 kodlu izolat Carabidae' ye ait bir böceğin barsağından elde edilmiştir. Yağ asdi profil bulguları *Paenibacillus macerans*, biyokimyasal test bulguları ise *B. subtilis* olduğunu ileri sürmektedir

P. macerans metabolitleri hem gram pozitif ve hem de gram negatif bakterilere karşı aktivite gösterirken funguslara karşı da aktivite belirlenmiştir. En yüksek aktiviteyi *C. glabrata*'ya 16 mm inhibisyon zonu ile göstermiş olup küfler arasında ise yüksek aktiviteyi *G. candidum*' a karşı görülmüştür (Çizelge 4. 18).

4.4 Fermentasyonla Antimikrobiyal Etkili Molekülün Üretimi

En yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenen *P. macerans*'a ait büyüme eğrisi çizilerek, metabolit üretimi, endospor oluşumu, pH değişimi belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *P. macerans*'a ait büyüme eğrisi, etken metabolit üretimi, spor oluşumu ve pH değişimi

P. macerans ile yapılan fermentasyon sürecinde antibiyotik üretimi 4. saatte başlamıştır. 20. saatte fermentasyon sıvısının *S. aureus* üzerine inhibisyon etkisi en yüksek değere ulaşmıştır (OD_{620nm} de 2,310). 12. saatte fermentasyon sıvısının *C. glabrata* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu en yüksek değer olan 33 mm ulaşmıştır (OD_{620nm} 2,160).

4.5. Fiziksel Faktörlere Dayalı Deney Tasarım (Responce Surface) Modeli Bulguları

3 fiziksel faktörün (sıcaklık, pH, çalkalama hızı rpm) 3 düzeyli deney sahası belirlenerek yapılan 27 denemenin sonuçları hücre gelişimi (OD) son pH (pH2) ve aktivite açısından ölçülerek belirlenmiştir. Çizelge 4.20 de verilmektedir.

Fiziksel faktörler esas alınarak yapılan deney tasarım bulguları en yüksek aktivitenin 42°C, pH 7, 200 rpm de olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.20)

4.5.1.1.Fiziksel faktörlerin hücre gelişimi (OD) üzerine etkisi

Bu bölümde üç faktörün hücre gelişimi, antibakteriyal ve antifungal metabolit üzerine etkileri regresyon katsayıları ve anlamlılık sınaması, varyans analizi ve responce surface grafiklerinden yararlanarak ele alınmıştır.

Çizelge 4.21 incelendiğinde hücre gelişimi üzerinde sıcaklığın karesel etkisi, rpm nin doğrusal etkisi ve sıcaklık ve rpm'in ikili etkileşim etkisine ilişkin katsayılar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). R^2 değeri 0,82 olarak bulunmuştur. Bu değer oldukça yüksektir ve modelin uygun olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 4.18 Fiziksel faktörlere dayalı deney tasarımı

Test (pH, Sıcaklık, rpm)	Hücre gelişimi (OD _{620nm})	<i>S.aureus</i>	<i>C.glabrata</i>	Son pH (pH2)
1 (28,5,100)	2.140	11	28	7.26
2 (28,5,150)	2.440	14	29	7.15
3 (28,5,200)	2.510	14	30	7.28
4 (28,7,100)	2.430	11	29	8.07
5 (28,7,150)	2.520	13	30	7.79
6 (28,7,200)	2.450	15	30	7.39
7 (28,9,100)	0.040	-	-	8.70
8 (28,9,150)	0.090	-	-	8.50
9 (28,9,200)	2.320	13	29	7.58
10 (35,5,100)	2.380	11	30	8.15
11 (35,5,150)	1.905	-	25	7.60
12 (35,5,200)	2.440	11	28	8.28
13 (35,7,100)	2.420	12	33	8.12
14 (35,7,150)	2.150	13	34	7.55
15 (35,7,200)	2.510	12	32	8.24
16 (35,9,100)	0.090	-	-	9.16
17 (35,9,150)	0.110	-	-	9.01
18 (35,9,200)	2.508	-	-	7.76
19 (42,5,100)	2.460	11	26	7.26
20 (42,5,150)	2.255	11	27	7.59
21 (42,5,200)	2.370	13	28	8.01
22 (42,7,100)	2.390	13	28	7.29
23 (42,7,150)	2.200	12	29	7.69
24 (42,7,200)	2.680	15	35	7.61
25 (42,9,100)	0.105	-	-	9.01
26 (42,9,150)	2.300	-	-	8.34
27 (42,9,200)	2.520	12	25	7.91

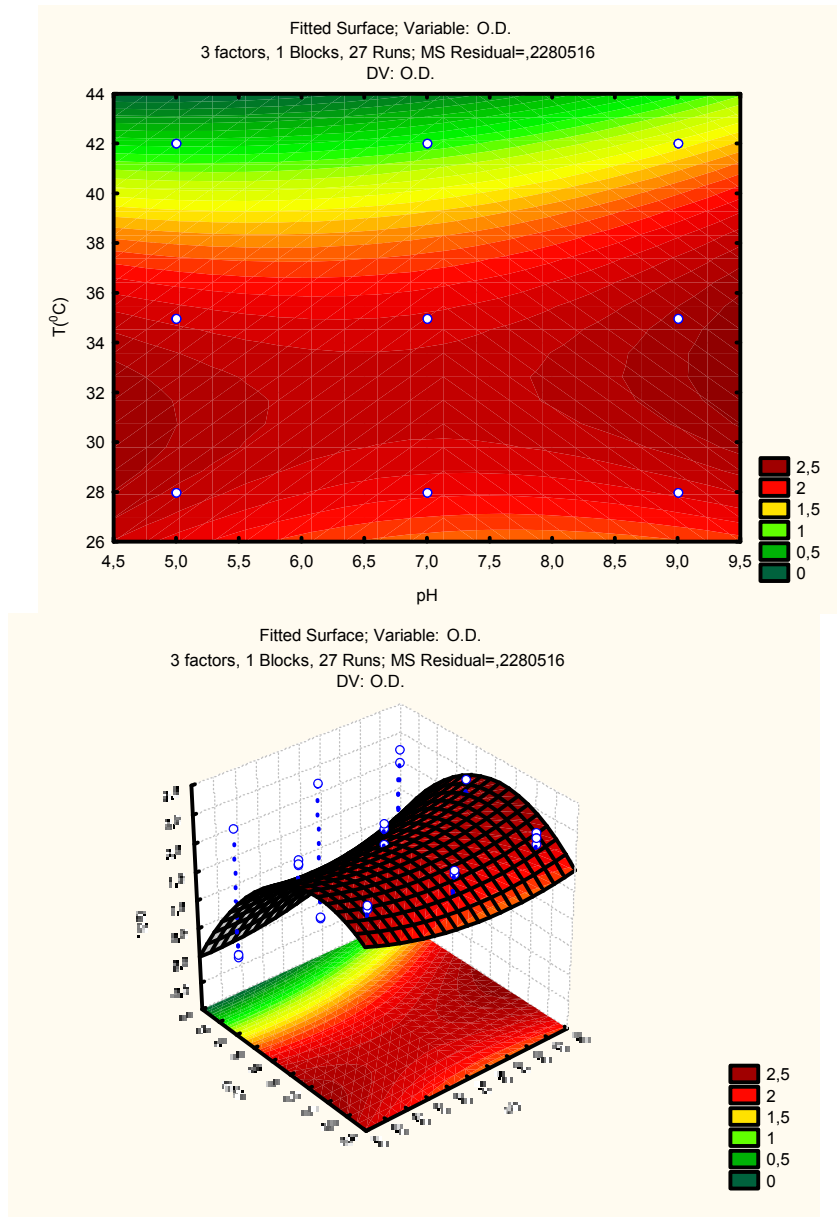
Çizelge 4.19. Üç faktörün hücre gelişimi (OD), *S. aureus* ve *C. glabrata* üzerindeki etkilerine ilişkin regresyon katsayıları) ve anlamlılık sınaması sonuçları (*<0,05)

	OD		<i>S. aureus</i>		<i>C. glabrata</i>	
Etkiler	Katsayı	p	Katsayı	p	Katsayı	P
Sabit terim	2,60218	0,696532	-11,5509	0,410445	-119,560	0,052711
pH _{doğrusal}	-1,06417	0,197757	-4,1250	0,023420	-4,556	0,520841
pH _{karesel}	0,04431	0,376043	0,2778	0,014213	0,264	0,544362
T _{doğrusal}	0,56107	0,072816	2,2480	0,001888*	12,448	0,000151*
T _{karesel}	-0,01417	0,002399*	-0,0351	0,000560*	-0,210	0,000014*
rpm _{doğrusal}	-0,07941	0,013748*	-0,0122	0,841823	-0,517	0,056714
rpm _{karesel}	0,00011	0,188307	0,0002	0,289839	0,001	0,179483
pH * T	0,01476	0,152176	0,0179	0,396893	0,012	0,891755
pH * rpm	-0,00005	0,971490	-0,0033	0,262553	0,002	0,891755
T * rpm	0,00161	0,000759*	-0,0000	1,000000	0,008	0,041091
R ²	0,82341		0,74876		0,85579	

Çizelge: 4.20 Hücre gelişimi için modele ilişkin varyans analizi tablosu (*<0,05)

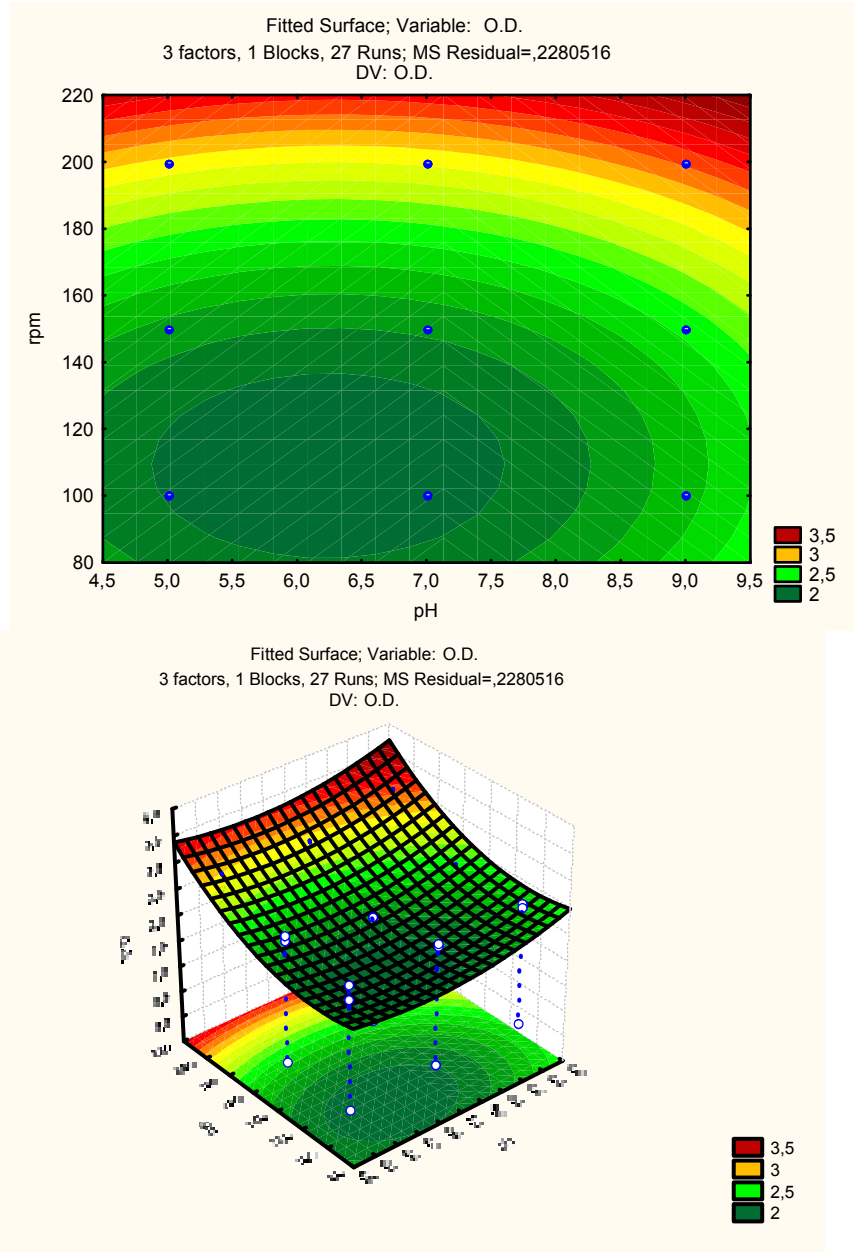
Değişim kaynağı	Kareler toplamı	SD	Kareler ortalaması	F	p
pH _{doğrusal}	0,30681	1	0,306806	1,34533	0,262127
pH _{karesel}	0,18845	1	0,188446	0,82633	0,376043
T _{doğrusal}	6,50402	1	6,504022	28,51996	0,000054*
T _{karesel}	2,89352	1	2,893519	12,68800	0,002399*
rpm _{doğrusal}	3,42347	1	3,423472	15,01183	0,001217*
rpm _{karesel}	0,42845	1	0,428446	1,87873	0,188307
pH * T	0,51253	1	0,512533	2,24744	0,152176
pH * rpm	0,00030	1	0,000300	0,00132	0,971490
T * rpm	3,81941	1	3,819408	16,74800	0,000759*
Hata	3,87688	17	0,228052		
Toplam	21,95383	26			

Analizde ayrıca modele uygun olarak varyans analizi gerçekleştirilmiş faktörlerin doğrusal, karesel ve etkileşim etkilerinin anlamlılığı sınanmış ve response surface grafiklerinden yararlanılmıştır. Çizelge 4.22'e göre hücre gelişimi üzerinde sıcaklığın doğrusal ve karesel etkisi, rpm'in doğrusal etkisi ve sıcaklık ile rpm etkileşimi etkisi anlamlıdır (p<0,05).



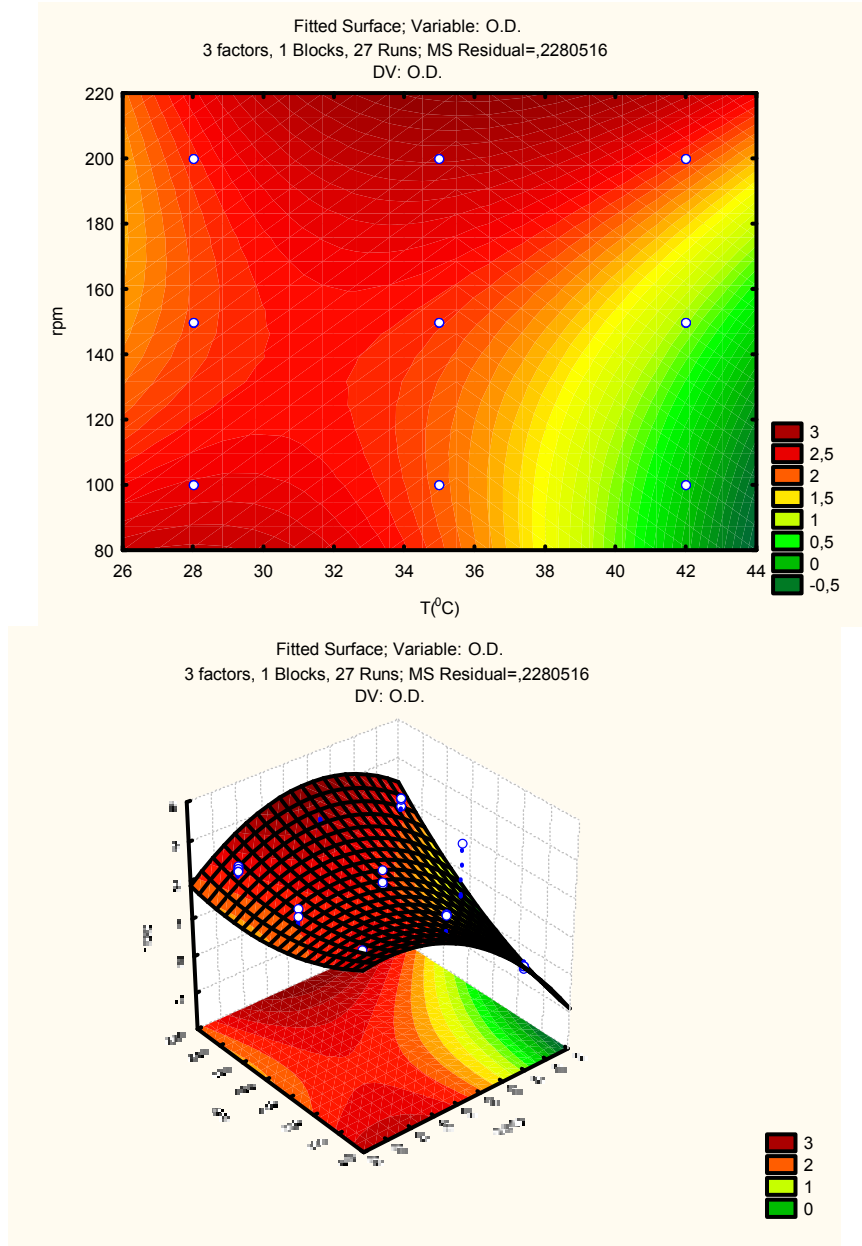
Şekil 4.2. Modele göre başlangıç pH ve sıcaklığın hücre gelişimi (OD) üzerindeki etkisi

Şekil 4.2 incelendiğinde hücre gelişimi 32 °C’de ve pH’nın alt ve üst düzeylerinde en yüksek değerine ulaşmaktadır. 38 °C’de sıcaklığın üzerinde pH ın etkisi olmaksızın hücre gelişimi değeri düşmektedir. Hücre gelişimi için etkilerin varyans analizi tablosu da dikkate alındığında sıcaklığın pH’a göre hücre gelişimi üzerinde daha fazla etkili olduğu gözlenmektedir



Şekil 4.3 Modele göre başlangıç pH ve çalkalama hızının (rpm) hücre gelişimi (OD) üzerindeki etkisi

Şekil 4.3 incelendiğinde hücre gelişimi, pH'nın üst düzeyinde, 200 ve üzerindeki çalkalama hızında en yüksek değerine ulaştığını göstermektedir.



Şekil 4.4. Modele göre çalkalama hızı (rpm) ve sıcaklığın hücre gelişimi (OD) üzerindeki etkisi

Şekil 4.4 incelendiğinde hücre yoğunluğu 35 °C de ve 200rpm ve üstündeki çalkalama hızlarında en yüksek değerine ulaşmaktadır. Çalkalama hızının sıcaklığa göre daha fazla etkili olduğu görülmektedir. Her iki faktörün düzeyleri değişikçe hücre gelişimi değerleri de değişmektedir. Yani iki faktörün etkileşimi etkisi önemlidir. Bu durum Çizelge 4.22. deki varyans analizi sonuçlarına da paralellik göstermektedir.

4.5.1.3. Fiziksel faktörlerin metabolit üretimi (*S. aureus*) üzerine etkisi

Çizelge 4.19 incelendiğinde metabolit üretimi üzerine sıcaklığın doğrusal ve karesel etkisine ilişkin katsayılar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Bulunan R^2 değeri 0.74 olduğundan dolayı modele uygun olduğunu gösterir.

Çizelge 4.21. *S. aureus* için modele ilişkin varyans analizi tablosu ($* < 0.05$)

Değişim kaynağı	Kareler toplamı	SD	Kareler ortalaması	F	p
$pH_{\text{doğrusal}}$	0,88889	1	0,88889	0,89523	0,357320
pH_{karesel}	7,40741	1	7,40741	7,46023	0,014213
$T_{\text{doğrusal}}$	6,72222	1	6,72222	6,77016	0,018605
T_{karesel}	17,79630	1	17,79630	17,92320	0,000560*
$rpm_{\text{doğrusal}}$	14,22222	1	14,22222	14,32364	0,001479*
rpm_{karesel}	1,18519	1	1,18519	1,19364	0,289839
$pH * T$	0,75000	1	0,75000	0,75535	0,396893
$pH * rpm$	1,33333	1	1,33333	1,34284	0,262553
$T * rpm$	0,00000	1	0,00000	0,00000	1,000000
Hata	16,87963	17	0,99292		
Toplam	67,18519	26			

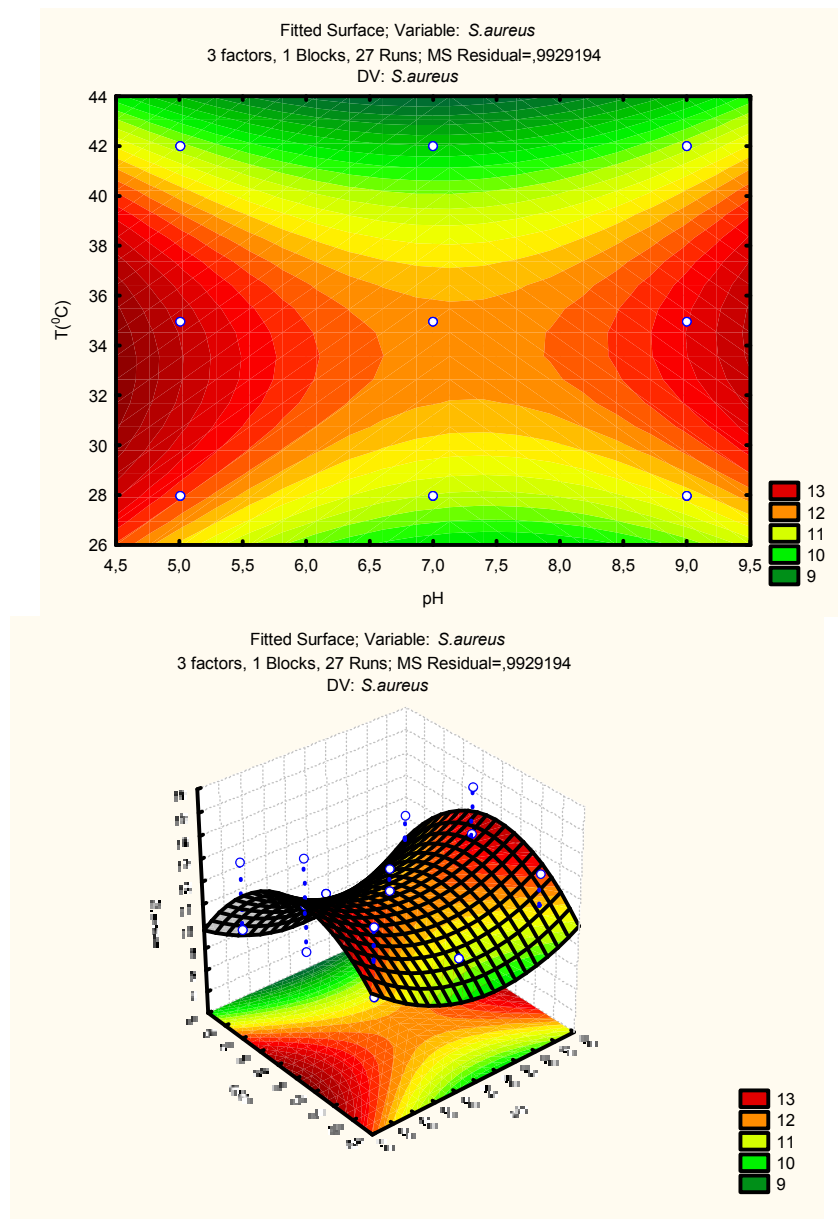
Analizde ayrıca modele uygun olarak varyans analizi gerçekleştirilmiş faktörlerin doğrusal karesel ve etkileşim etkilerinin anlamlılığı sınanmasında response surface grafiklerinden yararlanılmıştır. Çizelge 4.21'e göre metabolit üretimi üzerine sıcaklığın karesel ve çalkalama hızının doğrusal etkisi anlamlıdır ($p < 0.05$).

Çizelge 4.22 *C. glabrata*'ya ilişkin varyans analiz tablosu ($p < 0.05$).

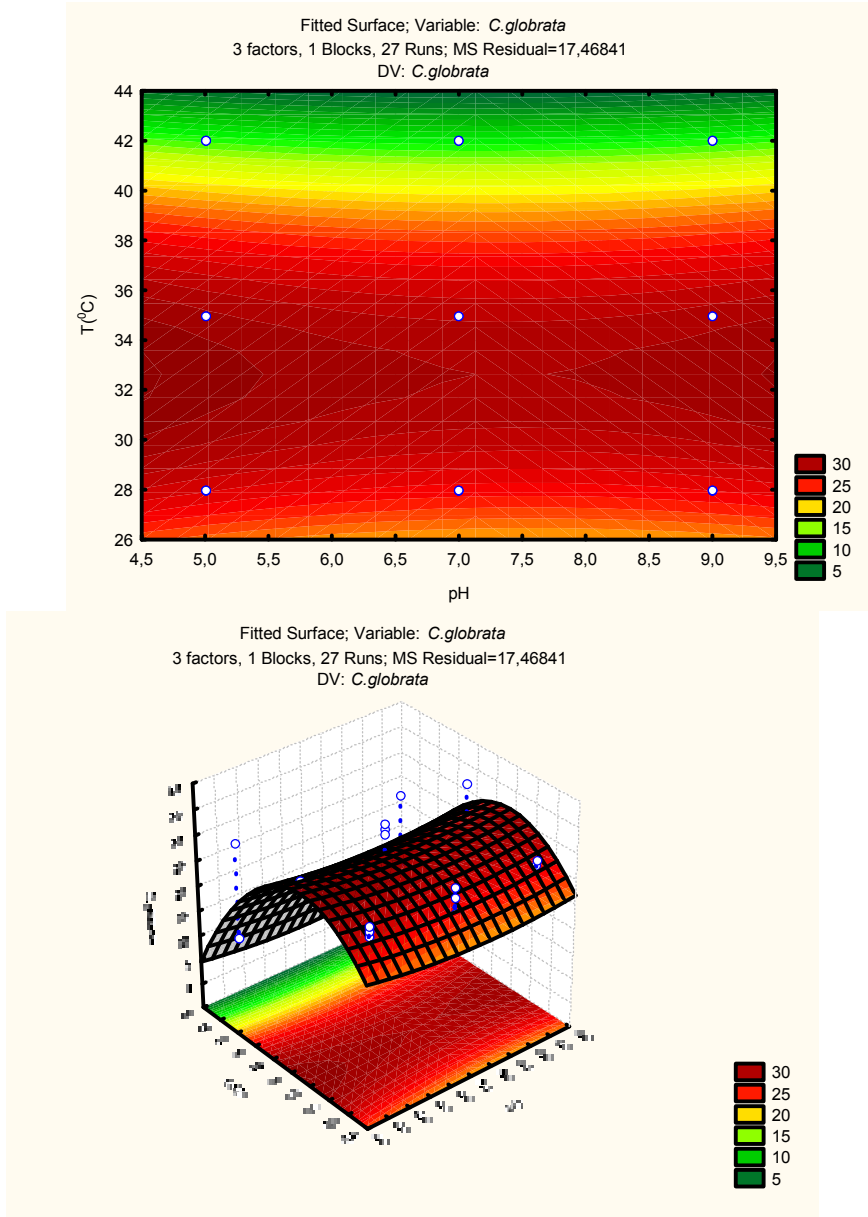
Değişim kaynağı	Kareler toplamı	SD	Kareler ortalaması	F	p
$pH_{\text{doğrusal}}$	2,722	1	2,7222	0,15584	0,697928
pH_{karesel}	6,685	1	6,6852	0,38270	0,544362
$T_{\text{doğrusal}}$	896,056	1	896,0556	51,29577	0,000002*
T_{karesel}	633,796	1	633,7963	36,28243	0,000014*
$rpm_{\text{doğrusal}}$	102,722	1	102,7222	5,88046	0,026739
rpm_{karesel}	34,241	1	34,2407	1,96015	0,179483
$pH * T$	0,333	1	0,3333	0,01908	0,891755
$pH * rpm$	0,333	1	0,3333	0,01908	0,891755
$T * rpm$	85,333	1	85,3333	4,88501	0,041091
Hata	296,963	17	17,4684		
toplam	2059,185	26			

Çizelge 4.22 incelendiğinde *C. glabrata* üzerinde sıcaklığın doğrusal ve karesel etkisine ilişkin katsayılar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). R^2 değeri 0.85 olması modelin uygun olduğunu ifade etmektedir

Analizde ayrıca modele uygun olarak varyans analizi gerçekleştirilmiş faktörlerin doğrusal karesel ve etkileşim etkilerinin anlamlılığı sınanmış ve response surface grafiklerinden yararlanılmıştır. Çizelge 4.19e göre sıcaklığın doğrusal ve karesel etkisi anlamlıdır ($p<0.05$).



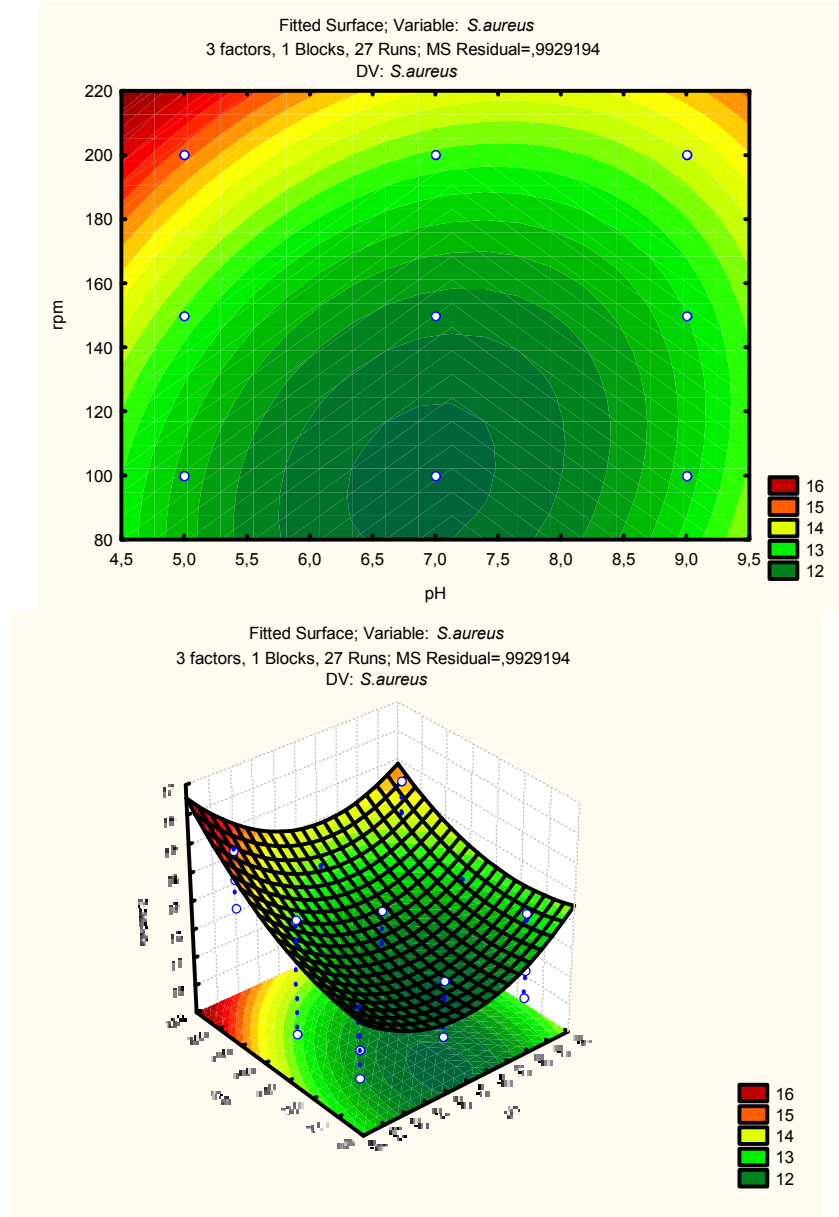
Şekil 4.5 Modele göre pH ve sıcaklığın *S. aureus* üzerine etkisi



Şekil 4.6 Modele göre sıcaklık ve pH'ın *C. glabrata* üzerine etkisi

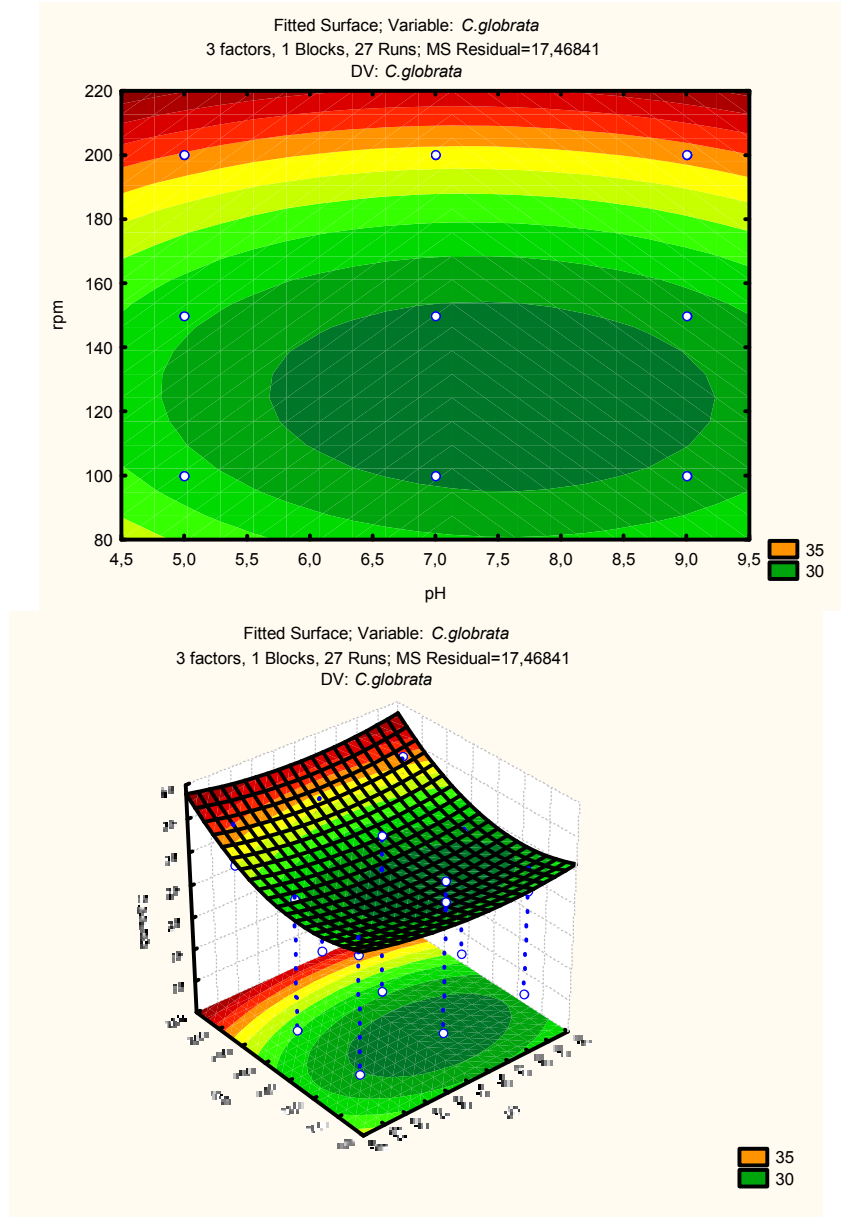
Şekil 4.5 incelendiğinde *S. aureus* üzerine inhibisyon etkisi 34 °C de ve pH'ın alt ve üst düzeylerinde en etkilidir.

Şekil 4.6 incelendiğinde antifungal metabolit üretimi üzerine etkisi (*C. glabrata*) üzerine inhibisyon etkisi pH'ın bütün düzeylerinde etkili olup, sıcaklık olarak 40 °C ye kadar etkili olmuştur. *C. glabrata* varyans analizi tablosu da dikkate alındığında sıcaklığın etkisi oldukça önemlidir.



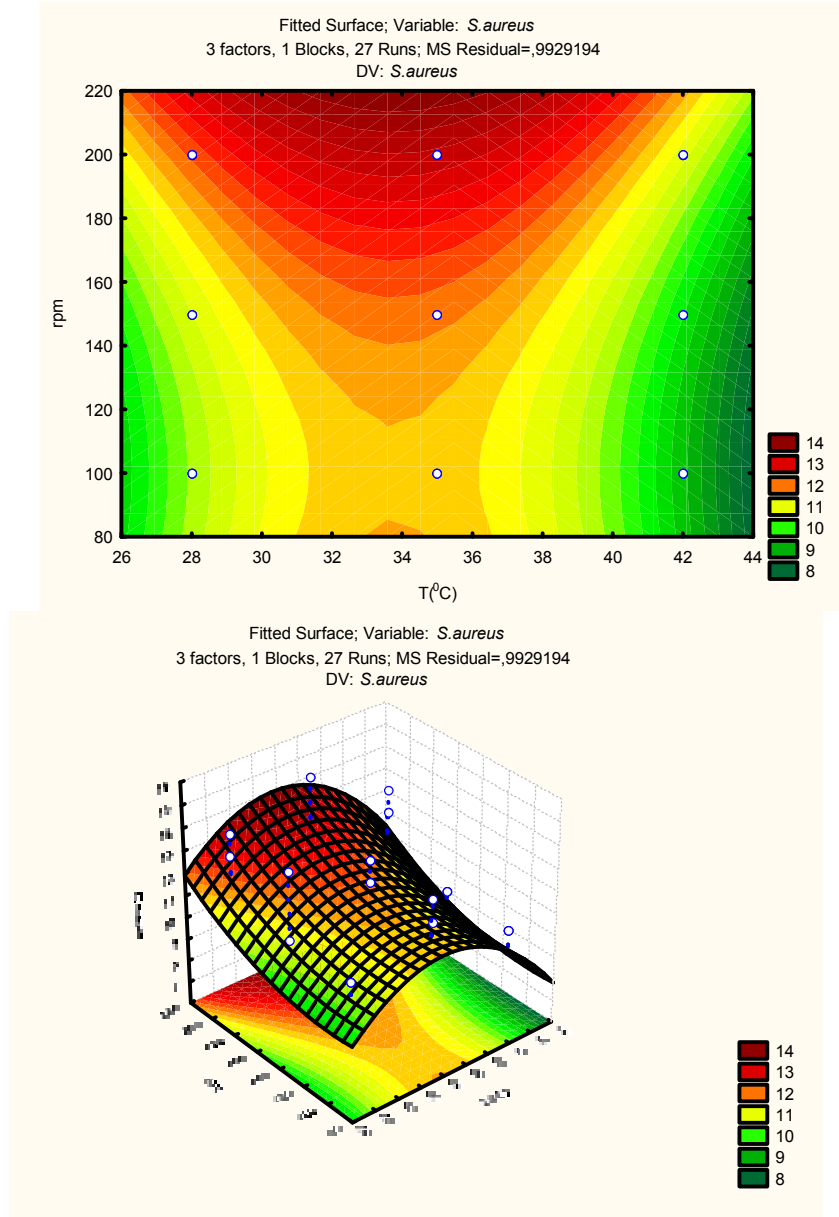
Şekil 4.7 Modele göre pH ve çalkalama hızı (rpm) *S. aureus* üzerine etkisi

Şekil 4.7 incelendiğinde *S. aureus* üzerine inhibisyon etkisi pH alt düzeyi ile 200 ve üzeri rpm lerde antibakteriyal etkili metabolit arttığı bulunmuştur.



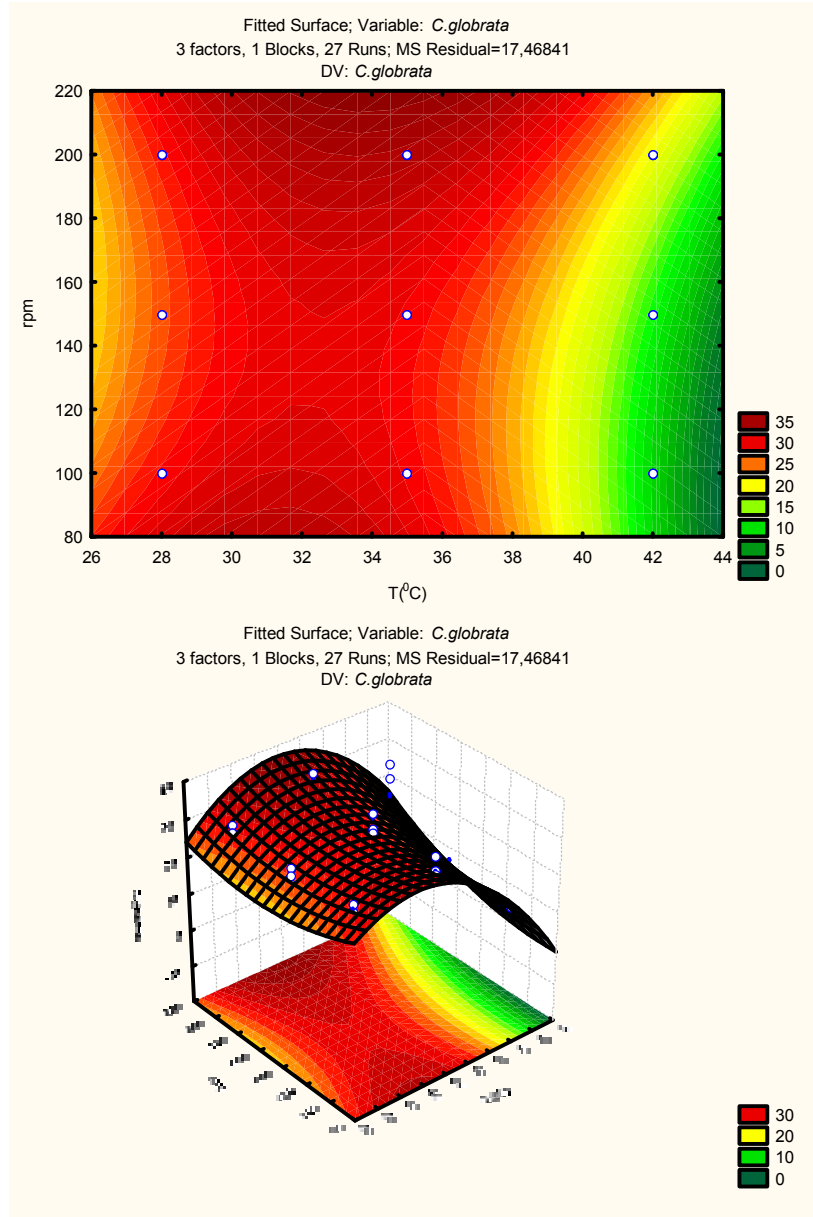
Şekil 4.8 Modele göre çalkalama hızı (rpm) ve pH *C. glabrata* üzerine etkisi

Şekil 4.8 incelendiğinde antifungal etkili metabolit üretimi üzerine (*C. glabrata*) üzerine inhibisyon etkisi pH'nın bütün düzeylerinde ve 200 rpm ve üzerindeki düzeylerde etkili bulunmuştur



Şekil 4.9 Modele göre sıcaklık ve çalkalama hızının rpm *S.aureus* üzerine etkisi

Şekil 4.9 incelendiğinde *S. aureus* üzerine inhibisyon etkisi 30-42 °C sıcaklık arasında 200 ve üzeri rpm de inhibisyon zonu en yüksek değere ulaşmıştır.



Şekil 4.10 Modele göre çalkalama hızı (rpm) ve sıcaklık *C. glabrata* üzerine etkisi

Şekil 4.13 incelendiğinde *C. glabrata* üzerine inhibisyon etkisi çalkalama hızının bütün düzeylerinde ve 40 °C ye kadar etki bulunmuştur

4.5.2. Kimyasal Faktörlere Dayalı Deney Tasarımı (Response Surface modeli) Bulguları

Çizelge 4.23 Besin ortamı değişkenleri ile deney tasarımı modeli

Test (Karbon kaynağı, azot kaynağı,mineral madde)	Hücre gelişimi (OD _{620nm})	Son pH (pH 2)	<i>S.aureus</i>	<i>Cglabrata</i>
1-4-7	2.590	8.45	11	25
1-4-8	2.690	7.97	14	32
1-4-9	2.750	8.07	16	35
1-5-7	1.006	5.17	-	20
1-5-8	1.606	4.97	-	20
1-5-9	1.696	4.89	11	22
1-6-7	2.350	7.97	12	27
1-6-8	2.330	7.96	12	27
1-6-9	2.000	7.86	12	26
2-4-7	2.385	8.32	12	24
2-4-8	2.235	7.92	12	27
2-4-9	2.385	8.04	12	25
2-5-7	2.185	7.68	-	25
2-5-8	2.490	7.52	13	26
2-5-9	2.220	7.76	-	26
2-6-7	2.540	7.93	12	26
2-6-8	2.690	7.60	13	26
2-6-9	2.550	8.18	12	24
3-4-7	0.234	6.25	-	12
3-4-8	0.165	6.54	-	12
3-4-9	0.613	6.83	-	19
3-5-7	0.242	6.58	-	12
3-5-8	0.223	6.26	-	13
3-5-9	0.660	6.29	-	14
3-6-7	0.188	6.66	-	12
3-6-8	0.215	6.57	-	12
3-6-9	0.526	6.81	-	14

1 Gliserol, 2. Glikoz, 3. Laktoz, 4 Bakteriyolojik Pepton, 5 Yeast ekstrakt, 6 Soya peptonu
7. Mg SO₄ 7H₂O 8. MnSO₄ 7H₂O 9. CaCl₂ 2H₂O

4.5.2.1. Deneysel tasarımının hücre gelişimi (OD) üzerine etkisi

Hücre gelişimi üzerine karbon kaynağının doğrusal ve karesel katsayıları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) (Çizelge 4.27). R^2 değeri 0,92 olması modelin uygun olduğunu ifade etmektedir.

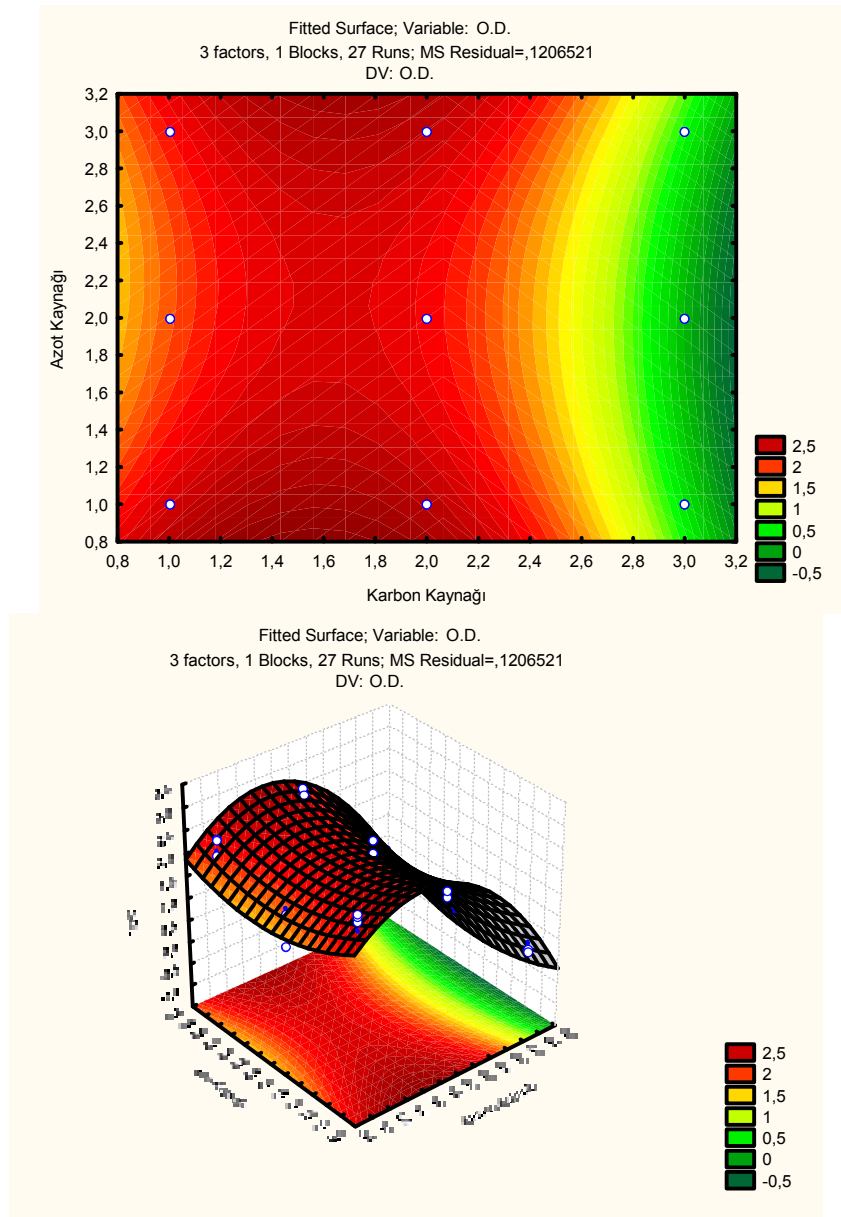
Çizelge 4.24 Kimyasal faktörlerin hücre gelişimi (OD), antibakteriyal ve antifungal aktivite üzerine etkilerine ilişkin regresyon katsayıları ve anlamlılıkların sınaması ($p < 0,05$).

Etkiler	Hücre Gelişimi (OD)		<i>S. aureus</i>		<i>C. glabrata</i>	
	Katsayı	p	Katsayı	p	Katsayı	P
Sabit terim	1,01704	0,373429	9,5556	0,458130	19,14815	0,050064
Karbon Kaynağı _{doğrusal}	3,51778	0,000039*	15,6111	0,045517	15,61111	0,008195*
Karbon Kaynağı _{karesel}	-1,18111	0,000000*	-4,6667	0,009775*	-5,77778	0,000111*
Azot Kaynağı _{doğrusal}	-1,66111	0,018766	-22,8889	0,005668*	-9,83333	0,076703
Azot Kaynağı _{karesel}	0,37556	0,016897	5,6667	0,002558*	2,72222	0,030951
Mineral madde _{doğrusal}	0,12111	0,852020	8,3889	0,262211	4,83333	0,367247
Mineral madde _{karesel}	-0,01111	0,938461	-1,0000	0,541325	-0,11111	0,924626
KK*AK	0,10667	0,302306	0,4167	0,717916	0,58333	0,485560
KK*MM	0,05333	0,601685	-1,3333	0,256031	0,00000	1,000000
AK*MM	-0,04500	0,659257	-0,4167	0,717916	-1,58333	0,069794
R²	0,92048		0,75298		0,88431	

Analizde ayrıca modele uygun olarak varyans analizi gerçekleştirilmiş faktörlerin doğrusal karesel ve etkileşim etkilerinin anlamlılığı sınanmış ve response surface grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.11, 4.12, 4.13). Çizelge 4.24' e göre karbon kaynağının doğrusal ve karesel etkisi anlamlıdır ($p < 0,05$).

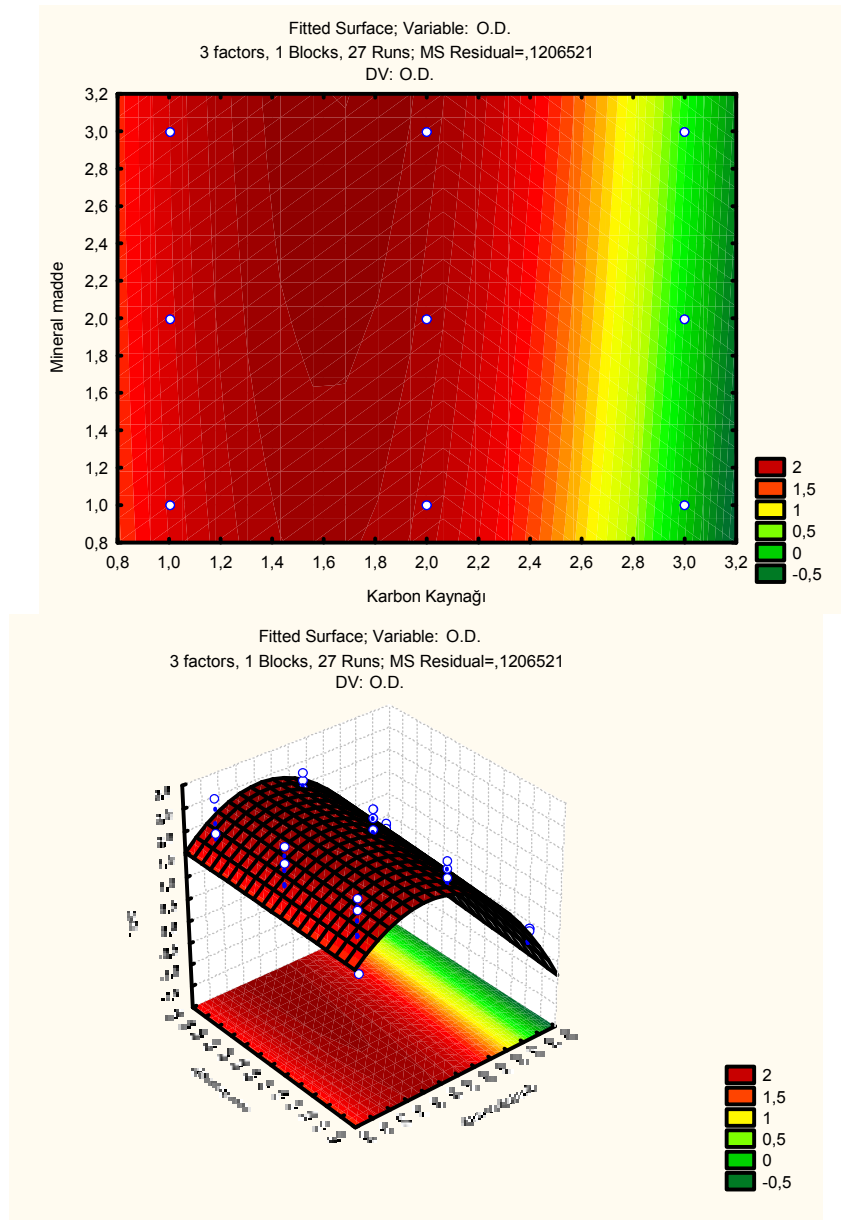
Çizelge :4.25 Hücre gelişimi için modele ilişkin varyans analizi tablosu ($p < 0,05$).

Değişim kaynağı	Kareler toplamı	SD	Kareler ortalaması	F	p
Karbon Kaynağı _{doğrusal}	14,15120	1	14,15120	117,2893	0,000000*
Karbon Kaynağı _{karesel}	8,37014	1	8,37014	69,3742	0,000000*
Azot Kaynağı _{doğrusal}	0,02276	1	0,02276	0,1886	0,669542
Azot Kaynağı _{karesel}	0,84625	1	0,84625	7,0140	0,016897
Mineral madde _{doğrusal}	0,15680	1	0,15680	1,2996	0,270093
Mineral madde _{karesel}	0,00074	1	0,00074	0,0061	0,938461
KK*AK	0,13653	1	0,13653	1,1316	0,302306
KK*MM	0,03413	1	0,03413	0,2829	0,601685
AK*MM	0,02430	1	0,02430	0,2014	0,659257
Hata	2,05109	17	0,12065		
toplam	25,79394	26			



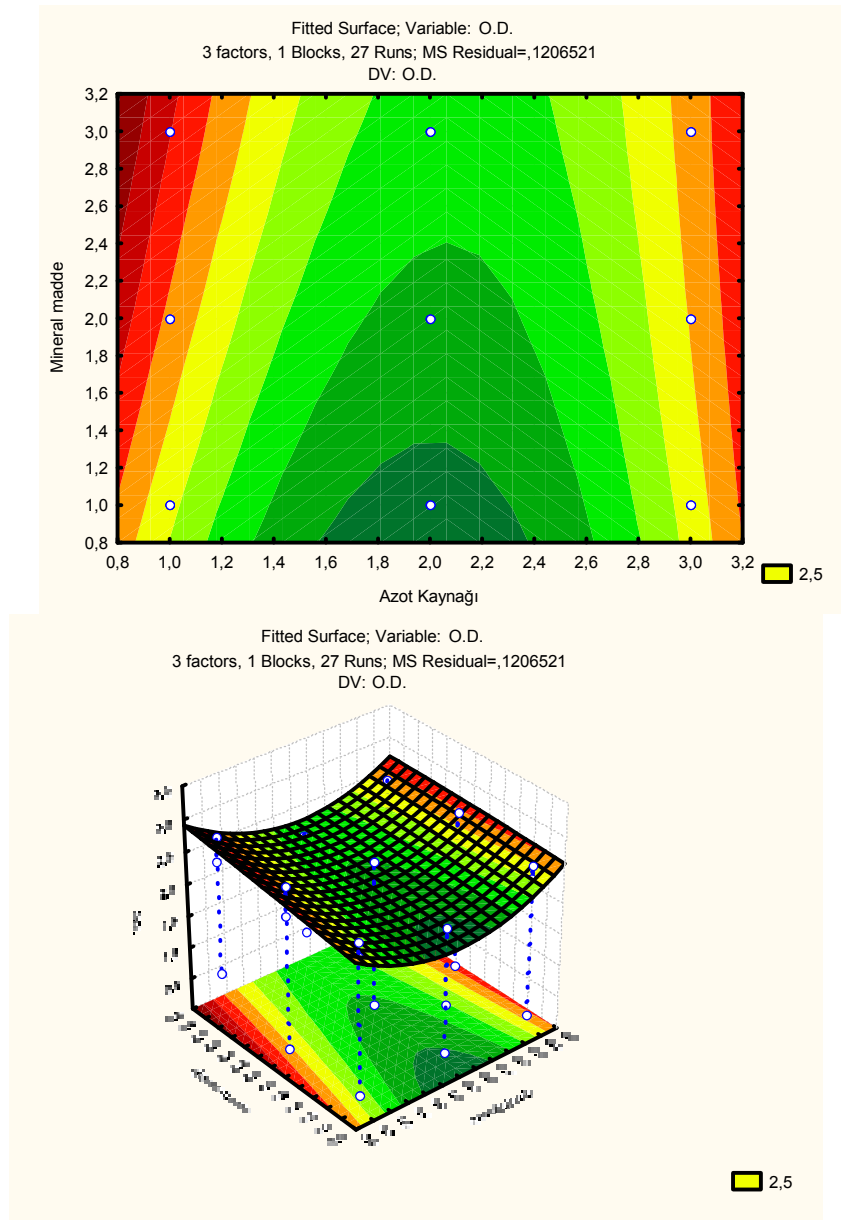
Şekil 4.11 Modele göre karbon kaynağı ve azot kaynağının hücre gelişimi (OD) üzerine etkisi

Şekil 4.11 incelendiğinde karbon kaynağı olarak glikoz ve gliserol ve üç farklı azot kaynağı kullanıldığında da hücre gelişiminin yüksek olduğu görülmüştür..



Şekil 4.12 Modele göre karbon kaynağı ve mineral madde'nin hücre gelişimi (OD) üzerine etkisi

Şekil 4.12 görüldüğü gibi response surface modeli glikoz, gliserol ve üç mineral madde kaynağının hücre gelişimini arttırdığını ifade etmektedir.



Şekil 4.13 Modele göre azot kaynağı ve mineral madde'nin hücre gelişimi (OD) üzerine etkisi

Şekil 4.13 response surface modeline göre incelendiğinde azot kaynağı ve mineral maddenin hücre gelişimi üzerine etkili olmadığı söylenebilir. Bu sonuç varyans analizi sonuçlarını doğrulamaktadır

4.5.2.3. Kimyasal faktörlerin antibakteriyal aktivite üzerine etkisi

Çizelge 4.24 incelendiğinde antibakteriyal aktivite üzerine karbon kaynağının karesel, azot kaynağının doğrusal ve karesel etkilerine ilişkin katsayıları, antifungal aktivite üzerine karbon kaynağının doğrusal ve karesel etkilerine ilişkin katsayıları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). R^2 değerleri sırasıyla 0,75 ve 0,88 olarak bulunmuştur. Bu yüksek değerler modelin uygun olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge :4.26 Antibakteriyal aktivite (*S. aureus*) için modele ilişkin varyans analizi tablosu

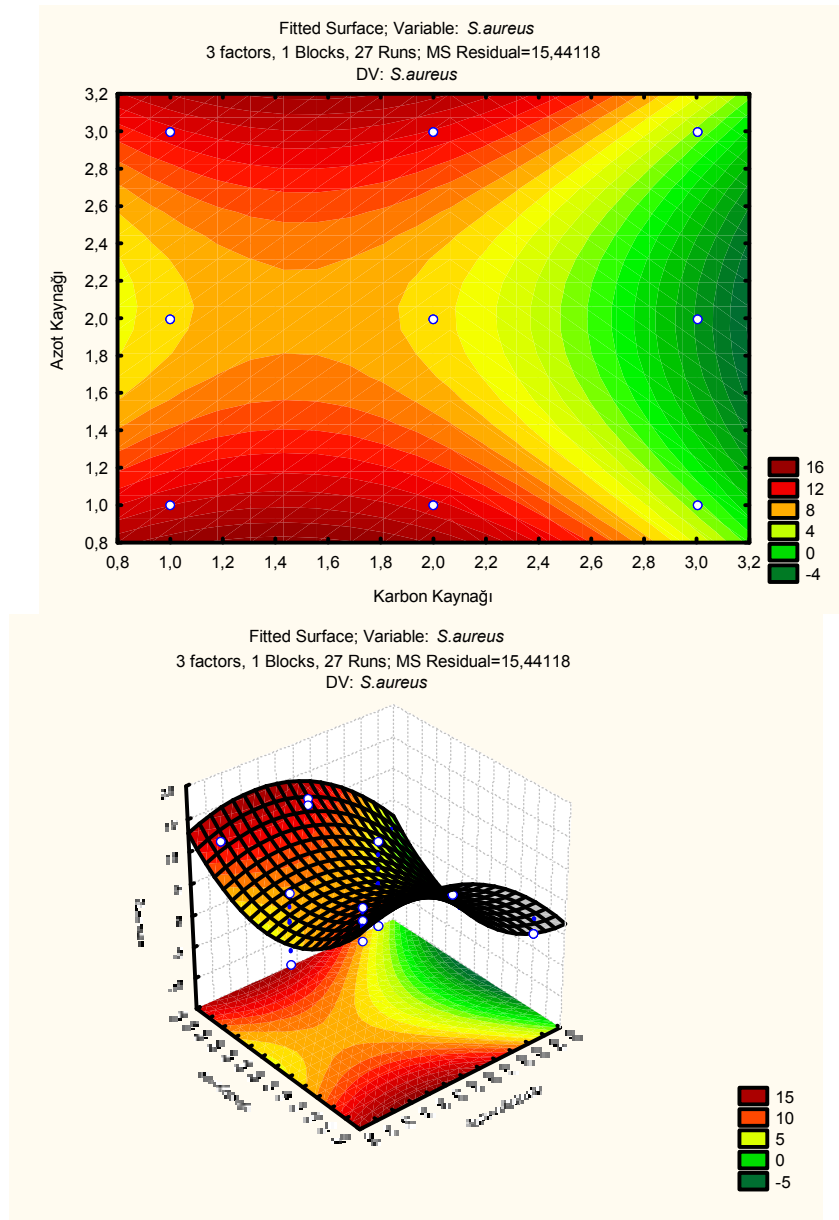
Değişim kaynağı	Kareler toplamı	SD	Kareler ortalaması	F	p
Karbon Kaynağı _{doğrusal}	430,222	1	430,2222	27,86201	0,000061*
Karbon Kaynağı _{karesel}	130,667	1	130,6667	8,46222	0,009775*
Azot Kaynağı _{doğrusal}	0,889	1	0,8889	0,05757	0,813254
Azot Kaynağı _{karesel}	192,667	1	192,6667	12,47746	0,002558*
Mineral madde _{doğrusal}	14,222	1	14,2222	0,92106	0,350649
Mineral madde _{karesel}	6,000	1	6,0000	0,38857	0,541325
KK*AK	2,083	1	2,0833	0,13492	0,717916
KK*MM	21,333	1	21,3333	1,38159	0,256031
AK*MM	2,083	1	2,0833	0,13492	0,717916
Hata	262,500	17	15,4412		
toplam	1062,667	26			

* $p < 0.05$

Modele ilişkin varyans analizi antibakteriyal aktivite üzerine karbon kaynağının doğrusal ve karesel etkisinin ve azot kaynağının karesel etkisi anlamlı olduğunu (Çizelge 4.26) antifungal aktivite üzerine ise sadece karbon kaynağının doğrusal ve karesel etkisinin anlamlı olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.27).

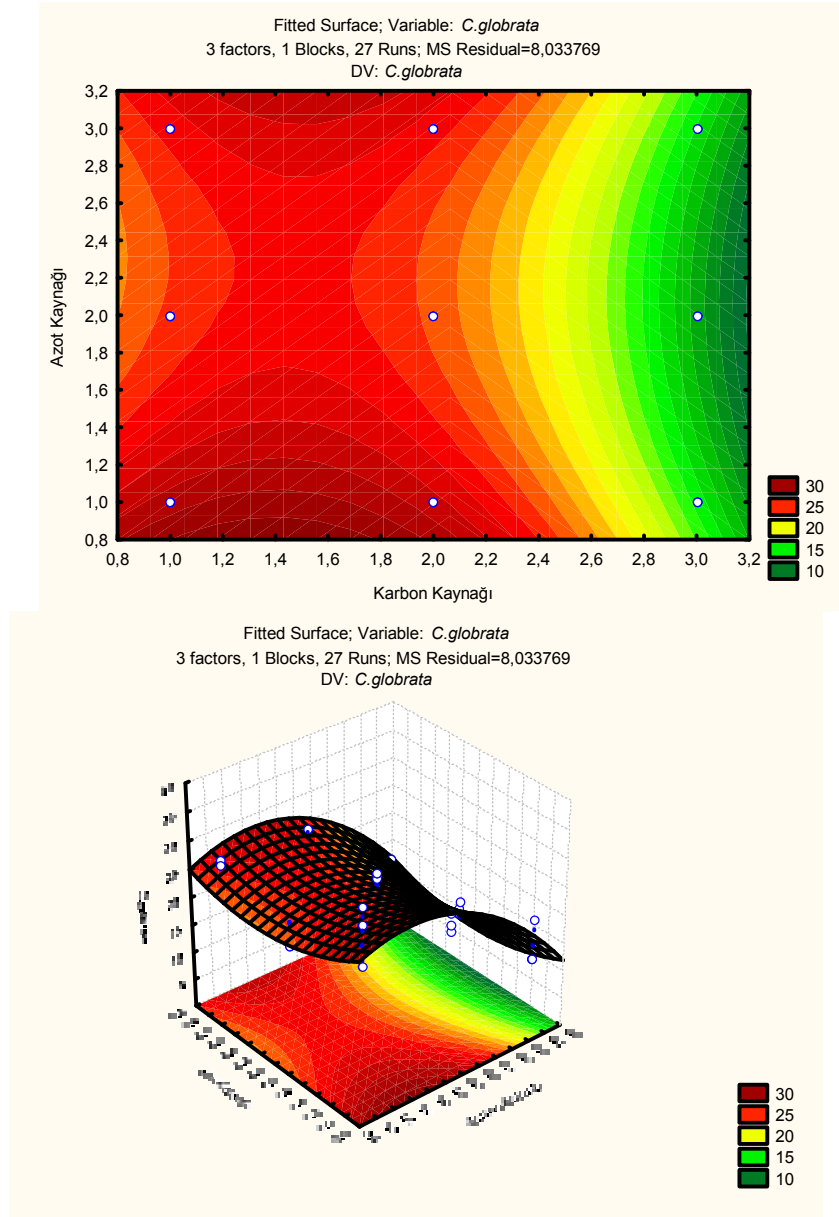
Çizelge :4.27 Antifungal aktivite (*C. glabrata*) için modele ilişkin varyans analizi tablosu

Değişim kaynağı	Kareler toplamı	SD	Kareler ortalaması	F	p
Karbon Kaynağı _{doğrusal}	722,000	1	722,0000	89,87064	0,000000*
Karbon Kaynağı _{karesel}	200,296	1	200,2963	24,93180	0,000111*
Azot Kaynağı _{doğrusal}	16,056	1	16,0556	1,99851	0,175505
Azot Kaynağı _{karesel}	44,463	1	44,4630	5,53451	0,030951
Mineral madde _{doğrusal}	26,889	1	26,8889	3,34698	0,084923
Mineral madde _{karesel}	0,074	1	0,0741	0,00922	0,924626
KK*AK	4,083	1	4,0833	0,50827	0,485560
KK*MM	0,000	1	0,0000	0,00000	1,000000
AK*MM	30,083	1	30,0833	3,74461	0,069794
Hata	136,574	17	8,0338		
toplam	1180,519	26			



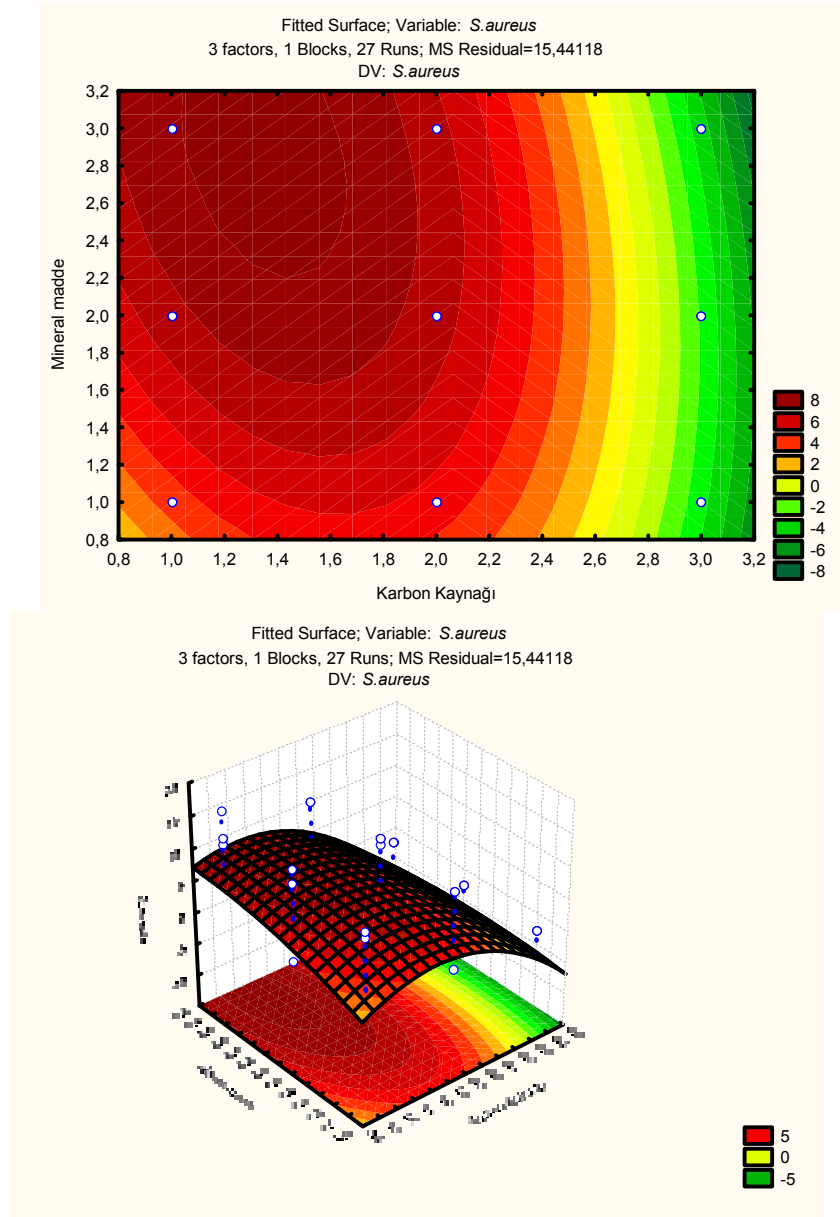
Şekil 4.14. Modele göre karbon kaynağı ve azot kaynağının *S. aureus* üzerine etkisi

Şekil incelendiğinde *S. aureus* üzerinde en etkili inhibisyon zonu oluşturan durumların gliserol ve glikoz ile azot kaynağının soya peptonu ve yeast ekstrakt'ta en iyi etki gözlenmiştir.



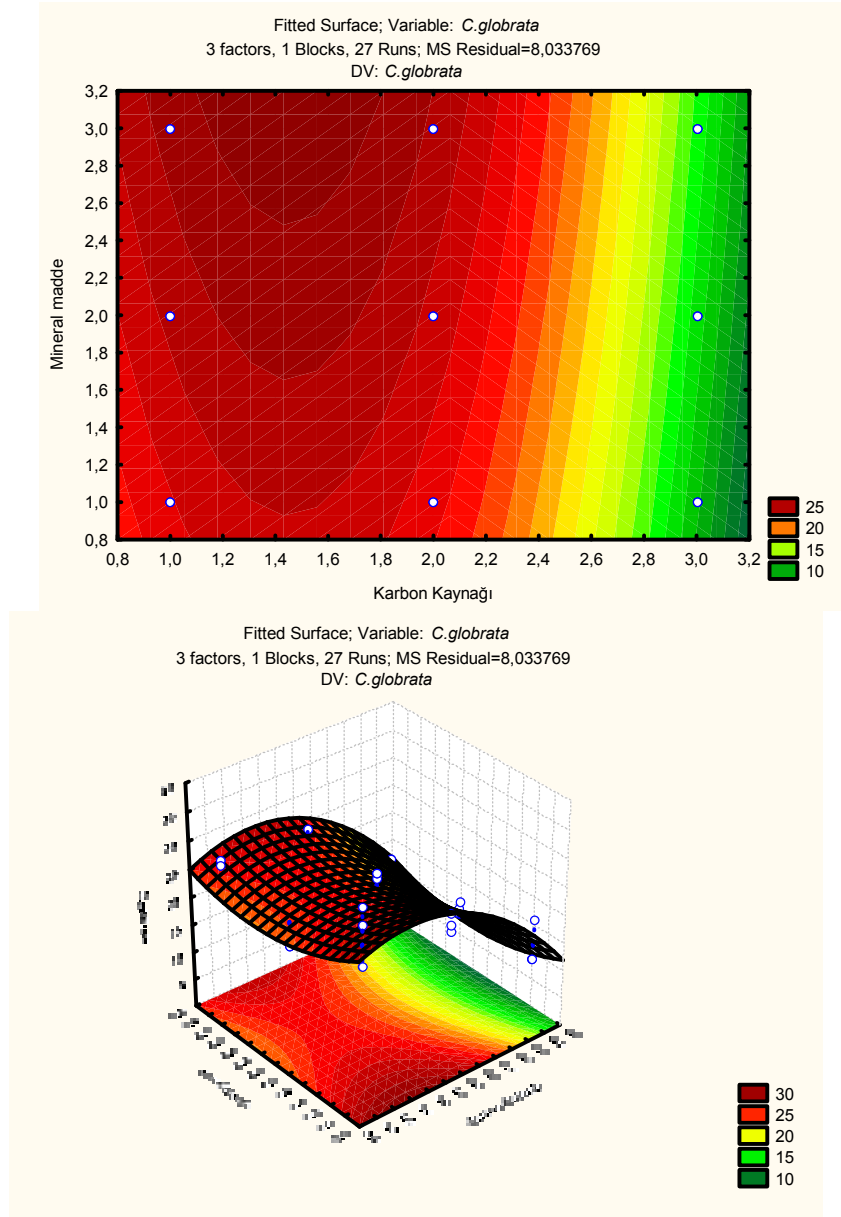
Şekil 4.15. Modele göre karbon kaynağı ve azot kaynağının *C. glabrata* üzerine etkisi

Response surface modeli karbon kaynaklarından glikoz ve gliserolün üç farklı azot kaynağı ile etkileşiminin antifungal aktiviteyi arttırdığını göstermektedir.



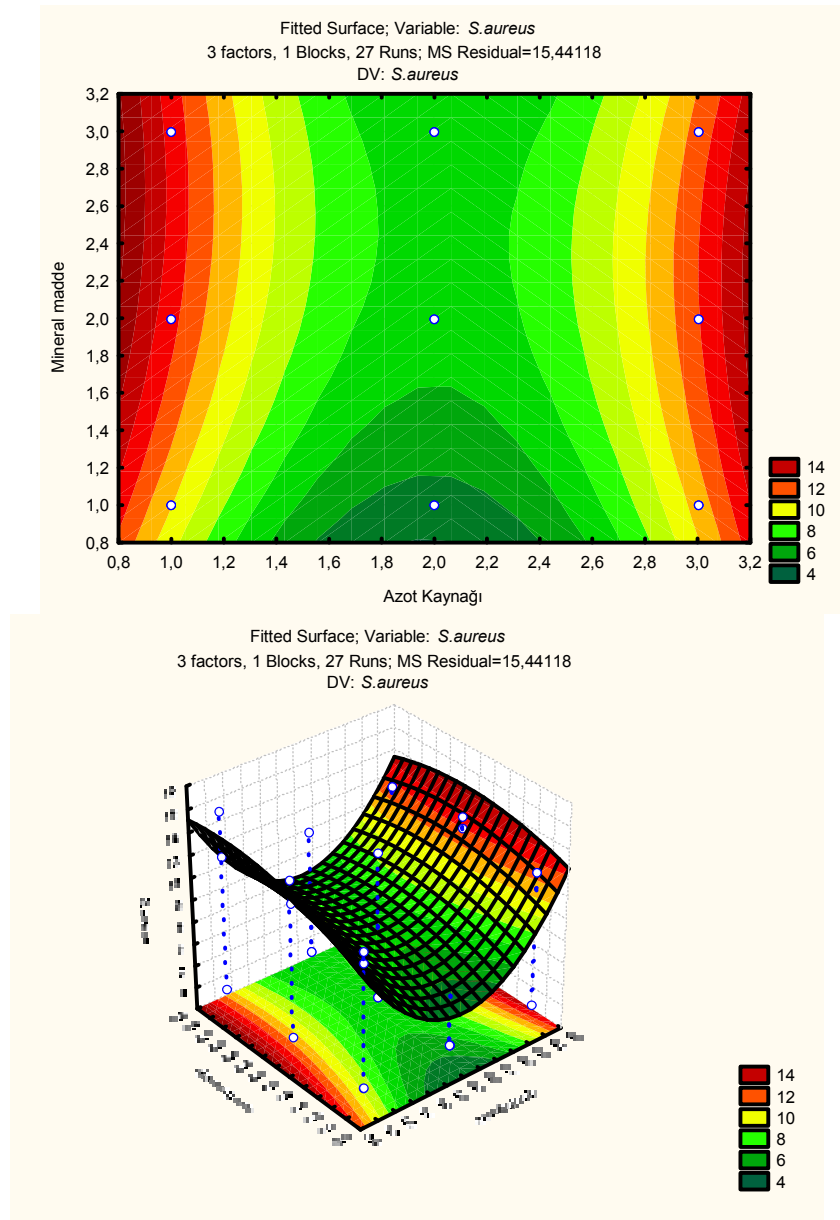
Şekil 4.16. Modele göre karbon kaynağının ve mineral maddenin *S. aureus* üzerine etkisi

Şekil 4.16 incelendiğinde üç mineral madde ile karbon kaynakları içerisinde glikoz ve gliserol ile etkili inhibisyon zonuna sahip olduğu görülmüştür.



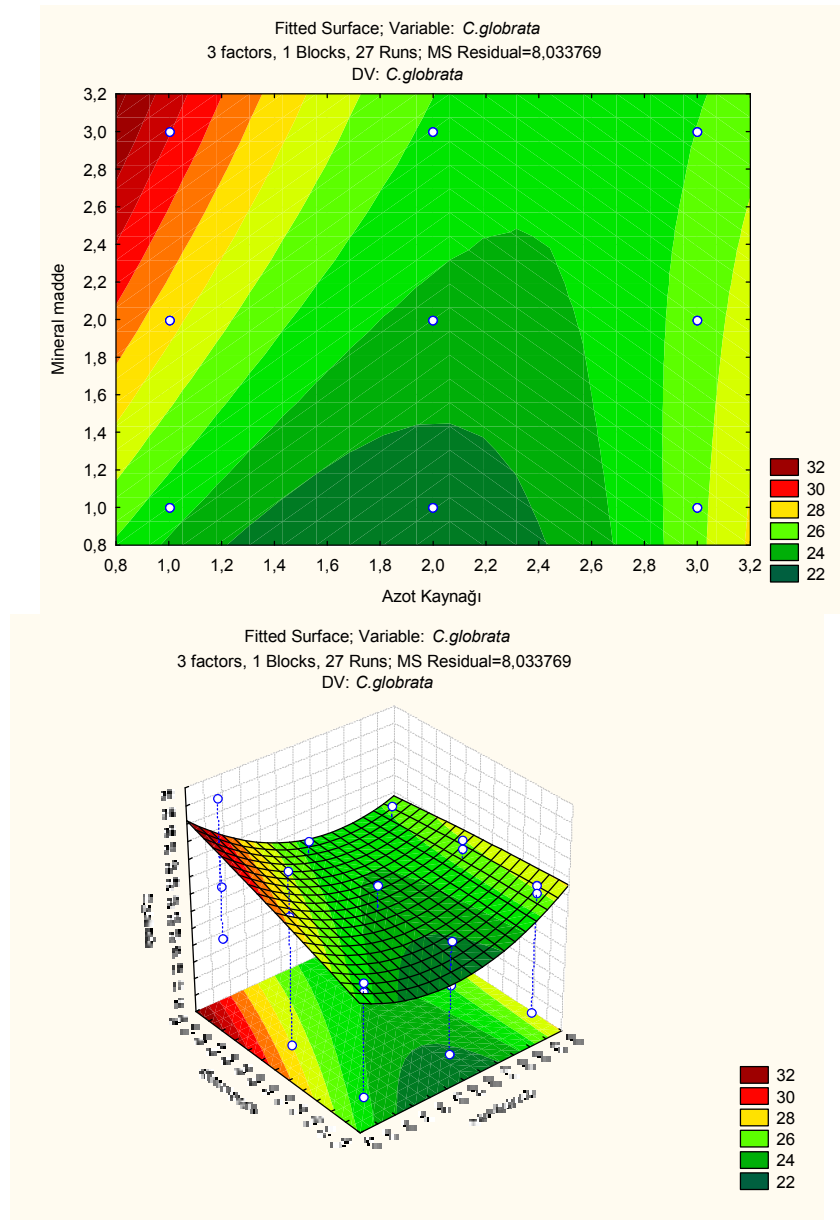
Şekil 4.17. Modele göre karbon kaynağı ve mineral maddenin *C. glabrata*'ya etkisi

Şekil 4.17 incelendiğinde karbon kaynaklarından gliserol ve glikoz'un bütün mineral maddelerle etkileşiminde aktivite en yüksek değerde bulunmuştur.



Şekil 4.18. Modele göre azot kaynağı ve mineral maddenin *S. aureus* üzerine etkisi

Şekil incelendiğinde, mineral maddenin üçü de azot kaynaklarının soya peptonu ve bakteriyolojik pepton ile bakteri üzerinde en iyi inhibisyon zonunu göstermiştir.



Şekil 4.19. Modele göre azot kaynağı ve mineral maddenin *C. glabrata* üzerine etkisi

Şekil incelendiğinde soya peptonu ve mineral maddenin $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de *C. glabrata*' ya en yüksek aktivite bulunmuştur. Ancak, bu etki çok anlamlı değildir. Varyans analizi sonucunda da bu etkilerin anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

4.3 Kolon ile saflaştırma ve Biyootografi

P. macerans'ın belirlenen optimum koşullarda üretimesi sonucu elde edilen supernatantın etil asetat ile ekstrakte edilmiş ve elde edilen ekstrakt kolon kromatografisine uygulanmıştır. %10'luk çözücü sistemi ile başlayan ve %100 etil asetat'da kadar yükselen çözücü gradiyentiyle ilerletilmiştir. İlk madde gelişi %45 lik çözücü sisteminde olmuştur. Saflaştırılan maddenin İTK'da R_f değeri 0,25 olarak bulunmuştur. İTK da yürütüldükten sonra ninhinrin püskürtülmüş ve mavi- mor renk vermiştir. MRSA, *S. aureus* ve *C. glabrata* ile biyootografi yapılmış R_f değeri belli olan spotun çevresinde inkübasyon sonunda şeffaf bir zon oluşmuştur. Bu zonu belirgin yapmak için TTC püskürtülmüştür.

4.4. MİK ve MSC Bulguları

Minimum inhibisyon konsantrasyonu ve minimum sidal konsantrasyonu, 2 bakteri (*S. aureus*, MRSA) bir maya(*C. glabrata*) ya uygulanmıştır. Sonuçlar basitrasinin ile karşılaştırılmıştır. MRSA ve *C. glabrata* 44.3 ile MİK ve MSK değerleri en yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.28 Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) minimum sidal konsantrasyonu (MSK) [$\mu\text{g/ml}$]

Test Mikroorganizması	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) [$\mu\text{g/ml}$]	Minimum Sidal Konsantrasyonu (MSK) [$\mu\text{g/ml}$]
<i>S.aureus</i>	88.7	88.7
MRSA	44.3	44.3
<i>C. glabrata</i>	44.3	44.3
Basitrasinin	22.1	22.1
Kontrol	+	+

4.5. Erime noktası ve çözünürlük testi

Kolonda saflaştırılan madde beyaz renkte olup erime noktası tayin cihazında yapılarak (Shimadzu) 183°C olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.29. Çözünürlük testi

	Dietil eter	Kloroform	Toluen	Etanol	Aseton	Butanol	Su
Madde	-	+	-	+	+	-	+

5. TARTIŞMA

Antimikrobiyal aktiviteye sahip metabolit ürettiği bilinen mikroorganizmalar aktinomisetler, funguslar ve *Bacillus* cinsi üyeleridir. Günümüzde kullanım alanı bulan biyoaktif metabolitlerin araştırılmasında mikroorganizmaların izole edildiği ana kaynak toprak olmuştur. Bu organizmalar çoğunlukla toprakta bol miktarda bulunmakla birlikte bitki ve hayvanların iç ve dış yüzeylerinde de rastlanmaktadır. Ancak mikroorganizmaların buldukları farklı özelliğe sahip ortamlara uyum sağlayabilmek için farklı mekanizmalar geliştirdikleri ve dolayısıyla farklı metabolit oluşturdıkları bilinmektedir. Buradan yola çıkarak son zamanlarda toprak dışındaki farklı habitatlardan mikroorganizma izolasyonu ve onlara ait biyoaktif metabolitler üzerine araştırmalar yoğunluk kazanmıştır. Son 20 yılda karasal habitatlarla birlikte deniz çevrelerinden biyoaktif metabolit üreten çok sayıda mikroorganizma izole edilmiştir (Faulkner, 2000; Yılmaz ve Beyatlı 2003). Kenny et al (1989) insektalardan izole ettikleri simbiyotik mikroorganizmaların yeni antimikrobiyal maddeler için potansiyel kaynak oluşturacağını ileri sürmüşlerdir. *Sogatella furcifera* böceğinin simbiyontu olan bir bakterinin diasetilfloroglusinol ve pyoluteorin ürettiğini rapor etmişlerdir. Benzer bir çalışmada ise Japon kıyı balıklarından izole edilen barsak bakterileri arasından seçilen *Bacillus* suşlarının yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Sugita et al., 1998). Földes et al (2000), doğal biyokontrol ajanlar olarak kullanılmak üzere hububatların rizosferinden *Bacillus* suşları izole ederek bu suşların gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerine etkisini incelemiştir. Gebhardt et al (2002) *Hexapoda* ve *Milipedes*'e (*Diplopoda*) ait çeşitli böceklerin bağırsağının farklı bölümlerinden izole ettikleri *Bacillus* cinsinden olan endosimbiyotik bakterileri biyoaktif metabolitleri açısından taramışlardır. Bunlara ilaveten Burgess et al (1999) deniz algleri ve omurgalıların yüzeyinde yaşayan deniz epibiyotik bakterilerinin kimyasal ekolojisi ile ilgilenmişler ve yeni kemoterapötik antibiyotiklerin araştırılmasında etkili bir strateji olarak önermişlerdir.

Buna ilaveten artropodlarla simbiyotik yaşayan ve aktif metabolit üreten mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmalarda artropodların yaklaşık %15-20 sinin simbiyotik mikroorganizmalara sahip olduğu rapor edilmiştir (Fredenhagen et al., 1989; Lee, et al., 1996). Bitki özsuyu yada vertebral kanı ile beslenen, ağaç ve keratin

üzerinde yaşayan bazı böceklerde mikroorganizmalarla endosimbiyotik yaşam şekline rastlanmaktadır (Koch, 1960; Buchner, 1965)

Çalışmamızda, bu tip habitatları temsil eden ağırlıklı olarak bitki ve hayvan olmak üzere gübre ve toprak örneklerinden endospor oluşturan bakteriler izole edilmiştir. 22 bitki 42 hayvan ve 6 organizma dışı örnekten izolasyon yapılmış ve toplam 414 endospor oluşturan basil izolatu elde edilmiştir (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3). 22 bitki örneğinin farklı bölgelerinden yapılan izolasyon sonucunda, rizosferden 39 izolat elde edilirken epifitik dokulardan 36, yapraklardan 14, tohumlardan 29 ve gövde kısımlarından 10 izolat elde edilmiştir. 37 hayvan örneğinden elde edilen 203 izolatu 116'sı hayvanların barsağından, 10'u yutak ve midesinden, 9'u midesinden, 4'ü yumurta kanalından, 3'ü yumurtasından, 39'u gübresinden ve 22'si barsak ve midesinden elde edilmiştir. Mağara toprağı, atık su gibi bitki ve hayvan dışında farklı habitatlardan yapılan izolasyonlar sonucunda 83 izolat elde edilmiştir.

Bacillus cinsinin başlıca özellikleri endospor oluşturan, aerobik (ya da fakültatif aerobik) ve gram pozitif çubuklar olmalarıdır. İzolasyon, esas olarak bu özellikler dikkate alınarak yapılmıştır. Ancak son bilgiler ışığında bu özelliklere sahip *Paenibacillus* gibi yeni cins ayrımları yapılmaktadır (Madigan et al., 2006). Sözü edilen özelliklere sahip tüm izolatlar çalışmamıza dahil edilmiştir.

Bacillus ve *Paenibacillus* türleri bir çok karbon kaynağı içeren tanımlanmış ortamlarda rahat gelişme gösterirler (Madigan et al., 2006). İzolasyon şansını artırmak amacıyla çalışmamızda Nutrien agar (NA) ve Brain Heart İnfüzyon Agar (BHA) olmak üzere iki tip besiyeri kullanılmış ve her iki besiyerinden izole edilen koloniler ayrı ayrı kodlanarak incelenmiştir. Her iki besiyerinde sadece benzer morfolojiye sahip koloniler değil farklı morfolojiye sahip kolonilere de rastlanmıştır. Buna ilaveten uygulanan örnek miktarının artması da farklı kolonileri izole etme şansını artırmıştır.

Elde edilen 414 izolat arasında yüksek etkili ve geniş spektrumlu aktivite gösteren metabolite sahip izolatların seçimi agar difüzyon testi esas alınarak yapılmıştır. Çalışma boyunca bu yöntemin 3 modifiye şekli olan piece agar yöntemi, disk difüzyon ve agar kuyucuk yöntemi kullanılmıştır. Her bir yöntem, uygulanacak sıvıdaki biyoaktif maddenin miktarına bağlı olarak üstün yönlere sahiptir. Aktivite gösteren

izolatların taranması, uygulama kolaylığı, ekonomik ve hızlı olması açısından piece agar yöntemi ile yapılmıştır.

Tarama işlemi genel olarak gram pozitif, gram negatif bakteriler maya ve küf türlerine karşı oluşturulan inhibisyon derecesine göre yapılmaktadır. Vlientick (1995) ve Martini (2001) yaptığı tarama çalışmasında *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *E. coli*, *B. subtilis*, *M. flavus*, *S. cerevisia*, *M. luteus*, *Streptococcus pyogenes*, *A. niger* mikroorganizmalarını kullanmıştır. Bu bilgilere dayanarak birinci tarama çalışmamızda *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *F. solani*, *F. graminearum*, *B. cinerea* kullanılmıştır. Tarama sonuçlarına göre 221 (%53) izolat en azından bir test organizmasına karşı etki gösterirken 293 (%46) izolat hiçbir mikroorganizmaya karşı etki göstermemiştir. Aktivite gösteren izolatların %31'inin gram pozitif bakterilere, %23'ünün gram negatif bakterilere ve %77'sinin funguslara karşı etkili olduğu saptanmıştır. Test organizmalarına etki gösterdiği belirlenen 221 endospor oluşturan basilin antimikrobiyal etki dağılımı (Çizelge 4.7) izolatlardan 8'inin *C. albicans* üzerine kuvvetli bir inhibisyon etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Buna ilaveten 106 izolatın değişik kuvvette aynı organizmaya karşı etkili olduğu anlaşılmaktadır. Bu bulgular endospor oluşturan basillerin yüksek antifungal potansiyele sahip olduklarını açıkça göstermektedir. Halbuki, standart *Bacillus* türlerinin aynı test organizmalarına karşı gösterdiği aktivite (Çizelge 4.8) izolatların gösterdiği aktiviteden daha zayıf ve düşük potansiyelindedir. Bu durumun *S. aureus* ve *Y. entecolitica* için de aynı olduğu görülmektedir.

Tarama sonucu çoğu izolatın gram pozitiflere karşı etkili olduğunun bulunması yapılmış diğer çalışmalar ile uygunluk göstermektedir. *Bacillus* metabolitlerinin gram-pozitif bakterilere gram negatif bakterilerden daha fazla etkili olduğu ve geniş spektrumlu antifungal aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir. Ayrıca Galvez, et al., (1993) yaptıkları çalışmada, *B. licheniformis* A12ve M4 suşlarından izole edilen amoebicinin, *B. megaterium*, *Corynebacterium glutamicum* ve *Sarcina* gibi türlere karşı aktif olduğunu bildirmişlerdir.

B. megaterium'dan elde edilen megacinler bu mikroorganizma ile ilişkide olan diğer mikroorganizmaları inhibe eder. *B. subtilis*'ten izole edilen botrycidin AJ 1316 ve alirin B-1 antifungal aktiviteye sahiptir. Yine *B. subtilis*'ten elde edilen subtilin ve

subtilosin A gram pozitif bakterilerin çoğu suşu üzerinde etkilidir. *B. licheniformis* M-4' den elde edilen amoebesidal maddenin bakteri ve funguslara karşı da aktif olduğu tespit edilmiştir (Logan, 1988). *B. aurantinus*'un gram pozitif bakteri ve anaeroplara karşı antimikrobiyal aktivite gösteren aurentinin A ve B'yi kapsayan bir yeni poliketit antibiyotik kompleksi meydana getirdiği bildirilmiştir (Nakagawa et al., 1988)

Bir diğer çalışmada, *Bacillus* cinsinin yabani tip suşları antimikrobiyal aktivite için seçilmiştir. İki adet suşun *B. polymyxa* MIR 23 ve *B. circulans* MIR 13'ün *Micrococcus luteus*'a karşı aktivite gösterdiği ve ayrıca *B. polymyxa* MIR 23'ün *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A.niger*'e karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Diğer suşun ise bu mikroorganizmalara karşı aktif olmadığı bildirilmiştir (Perez et al., 1993).

Denizli Acıgöl'den izole edilen 23 adet *Bacillus* türü suşların antimikrobiyal aktiviteleri *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *M. luteus*, *P. vulgaris* *E. coli*, *K. Pneumoniae*, *M. smegmatis* ve *C. albicans*'a karşı denenmiştir. Elde edilen sonuçlardan antibiyotiğin peptid yapısında olduğu ve çoğunlukla gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu, bunun yanında gram negatif bakterilere ve funguslara etkisinin az olduğu gösterilmiştir (Eltem ve Uçar, 1998).

Dirençli insan patojenlerinin artması ile yeni antibiyotiklerin araştırılmasına acil olarak ihtiyaç duyulmaktadır. Çoğu klinik kökenli mikroorganizmalar hastane çevresindeki antibiyotiklerin aşırı kullanılması sonucunda dirençli hale gelmişlerdir. *S. aureus* ve *S. epidermidis* sıkça görülen hastane enfeksiyonları olup ciddi hastalıklara neden olurlar. Bunların arasında metisiline dirençli *S. aureus* vankomisin hariç diğer bütün antibiyotiklere karşı dirençlidir. Bu nedenle dirençli *Staphylococcus*'lara karşı inhibitör etki gösteren sekonder metabolitlerin yeni bir molekül olması olasıdır (Hentschel, 2001). Bu düşünceyle, ikinci aşama olan seçim işleminde aktivite gösteren 221 izolatın MRSA, *E. faecium* ve *A. baumannii* gibi klinik ve dirençli suşlar üzerine etki potansiyelleri piece agar ve disk difüzyon yöntemine göre belirlenmiştir. Piece agar yöntemi sonuçlarına göre izolatların %68'i MRSA'ya %40'ı *E. faecium*'a, %17 si *A. baumannii*'ye etki göstermiştir. Disk difüzyon yöntemi bulgularına göre ise izolatların %43'ü MRSA'yı %32'si *E. faecium*'u %45 si *A. baumannii*'yi inhibe edici özellik göstermişlerdir.

B. subtilis ATCC 39374 ve ATCC 39320 suşları ile yapılan bir çalışmada, suşların polyenlakton fosfat esterleri olan diffisidin ve oksidiffisidin olarak adlandırılan antibiyotikler ürettiği bildirilmiştir. Ayrıca bu iki suştan basillin antibiyotiği de izole edilmiştir. Diffisidin ve oksidiffisidin bir veya daha fazla antibiyotiğe dirençli olan insan patojenlerinin çoğuna, anaerob ve aerob bakterilere karşı geniş ve kuvvetli bir aktiviteye sahip olduğu açıklanmıştır. Diffisidin ve oksidiffisidin antimikrobiyal maddelerinin protein sentezini etkilediği, bakterisidal etkisinin olduğu belirtilmiştir.(Zimmerman et al., 1986).

Uygulanan iki yöntem sonuçlarında görülen farklılıklar bu iki yöntemin uygulama şekline kaynaklanmaktadır. Piece agar yönteminde etken madde ürettiği beklenen organizma katı besiyeri üzerine yayılarak inkübe edilir ve tüm metabolitlerinin agar içine difüze olduğu kabul edilerek alınan agar bloğu, üzeri test organizması ile inoküle edilmiş diğer bir katı besiyeri üzerine yerleştirilir. Agar bloğun içerdiği metabolit, altındaki besiyerine difüze olur ve inhibiyon zonu oluşturur. Bu durumda üretici organizmanın sahip olduğu difüze olabilen tüm metabolitler agar blokta bulunur. Halbuki disk difüzyon yönteminde üretici organizma uygun bir sıvı besiyerinde geliştirildikten sonra sıvı ortama geçen metabolitler uygun bir çözücü ile ekstrakte edilir, yoğunlaştırıldıktan sonra disklere emdirilir ve test organizması inoküle edilmiş agar plağı üzerine yerleştirilir. Dolayısıyla ikinci yöntemde sadece kullanılan çözücüye geçen maddeler bulunur. Bu uygulama farklılığından dolayı aynı test organizması için farklı boyutlarda inhibisyon zonları oluştuğunu söyleyebiliriz. Disk difüzyon yönteminin bu aşamada uygulanmasıyla, ileriki aşamalarda etken madde ekstraksiyonunda kullanılacak olan çözücünün uygunluğu test edilmiştir.

Piece agar yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal etki değerlendirmesinde (Çizelge 4. 11) bir izolatın orta kuvvette MRSA'ya etkili olduğu görülmüştür. Etken maddenin ekstrakte edilerek uygulandığı disk difüzyon yöntemi bulgularına göre, izolatların antimikrobiyal etki dağılımları (Çizelge 4.12) iki izolatın MRSA'yı orta kuvvette inhibe ettiğini ve toplam 23 izolatın orta yada zayıf kuvvette inhibisyon oluşturduğunu göstermektedir. Pozitif kontrol olarak uygulanan basitrasin 3 dirençli suşa, vankomisin *E. faecium* ve *A. baumannii*'ye etki gösterirken oksasiline ise hiçbirine etki göstermediği bulunmuştur.

Yüksek ve geniş spektrumlu aktivite gösteren izolatların ikinci aşama seçimi (Çizelge 7.11) disk difüzyon bulguları esas alınarak ve diğer piece agar yöntemi bulguları ile desteklenerek yapılmış ve sonuçta Çizelge 4.11 de koyu işaretlenen 10 izolatın identifikasyonuna karar verilmiştir. Bakteri türünün belirlenmesi metabolitin kimyası hakkında bilgi verebilir. Şimdiye kadar *Bacillus* cinsinin üyelerinin genel olarak peptit yapıda antimikrobiyal maddeler ürettikleri bilinmektedir. Bunun yanı sıra biyosürafaktan, polien, aminoglikozid ve fosfolipit yapıda antimikrobiyal maddeler de üretmektedirler. *Bacillus licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. circulans* türleri tarafından üretilen çeşitli kimyasal yapıda antimikrobiyal maddeler tanımlanmıştır. İki aşamalı eleme sonucu belirlenen 10 izolat arasında üzerinde çalışılmamış bir türün varlığı, çalışmayı yeni bir metabolit yapısına sahip antimikrobiyal maddeye yönlendirecektir.

Özellikle dirençli suşlara karşı yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenen 10 izolat biyokimyasal ve yağ asidi özelliklerine dayanarak identifiye edilmiştir. Biyokimyasal özelliklerin belirlenmesinde VITEK sistem kullanılmış aynı zamanda bu sisteme ait *Bacillus* veritabanı ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucuna göre 10 izolattan 4'ü *B. cereus*, 4'ünün *B. subtilis* 2'sinin ise *B. amyloliquefaciens* olduğu belirlenmiştir. Tanımlanan 10 izolatın galaktoz, amigdalin, oleandomisin, trehaloz, arabitol, tagatoz negatif olduğu potasyum tiyonat, poliamidohigrostreptin, glikoz, mandelik asit, eskulin pozitif olduğu görülmektedir (Çizelge 4.13). 30 testten 11'inin ortak özellik olması izolatlar arası akrabalığı açıkça göstermektedir.

Buna ilaveten identifikasyon aynı izolatların yağ asidi profilleri belirlenerek desteklenmiştir. FAME adı verilen bu yöntem ile 10 izolattan 7 sinin *B. cereus*, 2 sinin *Paenibacillus macerans* ve 1 tanesinin *B. amyloliquefaciens* olduğu cihazda bulunan bakteri veri tabanına dayanarak belirlenmiştir. Her iki identifikasyon yöntemi sonuçlarının bire bir örtüşmediği Çizelge 4. 16'da yapılan karşılaştırmada açıkça görülmektedir.

Biyokimyasal analizlere dayalı identifikasyon oldukça yaygın kullanım alanına sahiptir. En iyi aktiviteye sahip olan 15AaN2 izolat VITEK sistemine göre *B. subtilis*, FAME'ye göre *P. macerans*' dir. *B. subtilis* ile *P. macerans* arasındaki belirgin farklardan birisi *P. macerans*'in fermentatif *B.subtilis*'in ise oksidatif olmasıdır (Sneath

et al., 1986). VITEK sistem’de yapılan biyokimyasal testler aerobik koşullarda gerçekleştiğinden dolayı bu testlere ek olarak anaerobik besiyerinde (Anaerobik Brewer Agar) izolatin gelişmesi incelenmiştir. 15AaN2 izolatu anaerobik gelişme gösterdiğinden dolayı *P. macerans* olarak değerlendirilmiştir. Rivas, (2005) yaptığı çalışmada *Paenibacillus* cinsi üyelerinin yağ asidi profilinde Anteiso-C15:0 yağ asitinin en fazla olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. *Nov phyllosphere* bir böcekten (*Phoenix dactylifera*) izole edilmiştir. Aynı şekilde Soo Kim, (2004) yaptığı çalışmada *Perilla frutescens* bitkisinin kökünden izole ettiği *Paenibacillus* türlerinde en yüksek yağ asitinin Anteiso-C15:0 olduğunu bildirmiştir. 15AaN2 izolatında da aynı yağ asidi en yüksek oranda bulunmuştur ve bu izolatin *Carabidae* familyasına ait bir böcekten izole edilmiş olmasıyla benzerlik göstermektedir. Bernal, (1997) denizden izole ettiği *B. macerans* (*P. macerans*) ve *B. pumilis* tarafından basilisin antibiyotığının üretildiğini rapor etmiştir.

Bitkilerin rizosferindeki mikroorganizmalar, topraktaki parçalama prosesinin ve topraktaki bitki sistemlerinin besin döngüsünü sağlar. Bitki ile bakteri arasındaki ortaklık, bitkiyi hastalıklardan korur ve bitkinin gelişmesini sağlar. Endofitik bakterilerin bitkinin gelişmesini artırmada ve bitkinin hastalıklarla mücadelesinde önemli olduğu iyi bilinir. Muhtemelen *Carabidae* familyasına ait olan böcek beslendiği bitki dokusundan yada topraktan bu basili almış olabilir. Uraz ve ark, (2002) yaptıkları çalışmada çiğ süt örneklerinden *P. macerans* izole etmiştir.

Tarama çalışmaları sonucunda belirlenen 15AaN2 izolat kodlu *P.macerans*’ın daha ileri aşamalarda kullanılmasına karar verilmiş ve tekrarlanan aktivite çalışmaları sonucunda *P. macerans* metabolitlerinin gram pozitif ve gram negatif bakterilere aktivite gösterdiği, başka bir deyişle geniş spektrumlu bir etkiye sahip olduğu kesinlik kazanmıştır. Bundan sonraki aşamalarda *P. macerans* 15AaN2 metabolitlerinin üretimi için optimum şartların belirlenmesi ve metabolitin karakterizasyonu için gerekli olan organizmanın büyüme ve metabolit üretme özellikleri araştırılmıştır.

Bacillus türlerinin geç logaritmik faz veya erken sabit fazda ikincil metabolit olarak antibiyotik üretme kapasitesinde olduğu ve sporulasyon olayı başladığında antimikrobiyal madde üretimini de başlattıkları bilinmektedir (Buchanan and Gibbons, 1974). Dolayısıyla organizmanın büyüme kinetiğinin belirlenmesi optimizasyon

çalışmalarını yönlendirmesi açısından önemlidir. Büyüme eğrisinin belirlenmesinde hücre yoğunluğuna ilaveten endospor oluşumu ve aktivite ölçümleri yapılarak ilişkilendirilmiştir (Şekil 4.1). Kültür sıvısındaki antimikrobiyal aktivitenin ölçülmesi agar kuyucuk yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntem direk kültür sıvısının uygulanmasına imkan sağlaması nedeniyle tercih edilmiştir. *P. macerans*'ın büyüme eğrisinden antibiyotik üretiminin 4. saatte başladığı 12. saatte *C. glabrata*, 20. saatte *S. aureus* inhibisyonunu en yüksek değere çıkararak konsantrasyona ulaştığı Şekil 4.1 de anlaşılmaktadır. Büyüme grafiğine göre antibiyotik üretiminin sporulasyonun başlamasıyla arttığı görülmektedir.

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

Bacillus hücreleri, büyümenin durgun faza girerken besin maddelerini daha fazla tüketirler. Bu aşamada sporulasyondaki fonksiyonların düzenlenmesi, gelişme yeteneği, hücre dışı parçalayıcı enzimler ve antimikrobiyal madde üretimi uyarılır. Bu çeşit olaylar *Bacillus* hücrelerinin beslenme stresine karşılık cevapları olarak yansır ve çevresel değişikliklere hızlı uyum gösterirler. Antimikrobiyal madde üretimi, sınırlı kaynakları olan bir çevrede yaşayan organizma için rekabet şansını arttıran önemli etkidir. Özel metabolitlerin, çevresel uyarıları cevaplama, bakteri popülasyonunu harekete geçiren hücre içi sinyaller olarak hizmet edebileceği gösterilmiştir (Galvez et al., 1994; Milner et al., 1995).

Bacillus türlerinde antibiyotik üretiminin kültürde sporulasyon aşaması olduğu zaman oluşmaya başladığı belirtilse de sporulasyon ve antibiyotik üretimi arasındaki bu ilişkinin olmadığına dair kayıtlar vardır. Moita et al. (2005), *Bacillus subtilis*'de antifungal metabolitin üretimi ile sporulasyon arasında herhangi bir ilişki bulamamışlardır. Chevanet et al (1986) basillomisin üretiminde, Hanlon ve Hodges

(1981) basitrasin üretiminde sporulasyonla antibiyotik üretimi arasında bir bağlantı bulamamışlardır (Moita et al, 2005).

P. macerans'a ait büyüme grafiğinde (Şekil 4.1) antibiyotik üretiminin endospor oluşumu ile birlikte olduğu ancak endospor sayısının artışıyla doğru orantılı olmadığı görülmektedir. *P. macerans*'ın antifungal etkisi, antibakteriyal etkisinden yüksek olduğu *C. glabrata* ve *S. aureus*'a uygulanan süpernatantın metabolit konsantrasyonu aynı olmasına rağmen farklı oranda etki görülmesi, mikroorganizmaların metabolite olan duyarlılığı ile açıklanabilir. Fermentasyon sıvısının birden fazla aktif metabolit içermesi de diğer bir olasılıktır. Ancak yapılan İTK uygulaması ve biyootografi tek bir etken metabolitin varlığını işaret etmiştir.

Geleneksel optimizasyon teknikleriyle değişkenler bağımsız olarak incelenebilir, ancak zor, zaman alıcı ve yetersiz işlem nedeniyle değişkenler arasındaki etkileşimler ortaya çıkarılamaz ve doğru bir optimum elde edilemez. Bu çalışmada değişken etkileşimlerinin değerlendirilebildiği bir deneysel strateji olan response surface yöntemi kullanılmıştır.

Son yıllarda kullanılan istatistiksel bir yöntem olan deney tasarımının amacı, faktörlerin birbirleriyle ve tek başlarına olan etkilerinin önem derecesi ve optimum değerleri, düzeyler arasındaki etkileşime dayanarak elde edilmesidir. Bu tasarım, soyut olarak ifade edilen verilere matematiksel somut bir anlam kazandırarak onların daha anlamlı hale gelmesine yardımcı olmaktadır. Response surface modeli tasarımcıya oldukça büyük yarar ve kolaylıklar sağlar, aynı anda bir çok faktörün etkisinin görülmesinde, faktörler arasındaki etkilerin araştırılmasında, deneylerden elde edilen bilgilerin arttırılmasında olabilecek ihtimalleri ortaya çıkaracağından rahatlıkla kullanılır. Verilere göre modele uygun çözümler yapılarak varyans analizi gerçekleştirilmiş faktörlerin doğrusal karesel ve etkileşim etkilerinin anlamlılığı sınanmış ve fiziksel ve kimyasal faktörlere ait response surface grafikleri oluşturulmuştur.

Fiziksel şartlar olarak ifade edilen kültür ortamının sıcaklığı, çalkalama hızı (rpm), başlangıç pH'sı olarak üç faktör belirlenmiştir. Bu faktörlerin alt, orta ve üst düzeyi

olmak üzere üç düzeyli (3^3) olarak çalışılmış ve 27 deney yapılarak veriler modele uygulanmıştır.

Aynı şekilde kimyasal şartlar olarak ifade edilen kültür ortamı bileşenleri karbon kaynağı (glukoz, gliserol, laktoz), azot kaynağı (bakteriyolojik pepton, soya peptonu, yeast ekstrakt) ve mineral madde ($Mg SO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$) olarak alınmış 27 deney yapılarak veriler modele uygulanmıştır.

Response surface modeline göre (Şekil 4. 2) *P. macerans*'ın hücre gelişimi üzerine sıcaklığın birinci derecede önemli olduğu, bunu çalkalama hızının takip ettiği söylenebilir. Çalkalama hızının en yüksek olduğu düzeyde pH'nın yüksek değerleri hücre büyümesinin artmasına neden olmaktadır. Yüksek pH değerlerinde sporulasyon katabolik olarak baskılandığı için (Katz and Demain, 1977) daha hızlı bir karbon kaynağı tüketimine yol açar. Bu da hücresel gelişimin yükselmesi anlamındadır. Büyüme ve sporulasyon pH'ya oldukça bağlıdır.

P. macerans'ın metabolit üretimi üzerine fiziksel faktörlerin etkisi antibakteriyal (*S. aureus*) ve antifungal (*C. glabrata*) aktivite derecesi ile belirlenmiştir. Modele göre (Şekil 4.4, 4.5) antibakteriyal ve antifungal aktivite 34-40°C arasında pH'dan fazla etkilenmeksizin en yüksek değerlere ulaşmaktadır. Çalkalama hızının en yüksek olduğu durumlarda her iki aktivite de maksimuma ulaşmaktadır. Antibakteriyal etki yüksek çalkalama hızlarında nötralden çok asidik ve bazik ortam koşullarında maksimuma ulaşırken antifungal etki ise pH'nın etkisi olmaksızın en yüksek çalkalama hızında görülmektedir. Havalandırmanın antibiyotik üretimini arttırması oksidatif metabolizmanın antibiyotik üretimini desteklediği fikrini akla getirmektedir. Response surface modelinden elde edilen bilgilere göre *P. macerans* 34-40°C arasındaki sıcaklıklarda çalkalama hızının 200 rpm koşullarda en fazla metabolit ürettiği söylenebilir. pH'nın doğrudan etkisi olmadığı ancak bazik koşulların metabolit üretimini arttıracağı düşünülmektedir.

Aynı modele göre hücresel gelişim ve metabolit üretimi üzerine karbon kaynağı, azot kaynağı ve mineral madde tipinin ikili etkileşimleri incelenmiştir. Hücresel gelişim denenen üç tip azot kaynağının (bakteriyolojik pepton, soya peptonu, yeast ekstrakt) varlığında glukoz ve gliserol ile maksimuma ulaştığı görülmektedir. Azot

kaynağı ve mineral madde çeşitlerinin etkileşiminden denenen azot kaynağı ve mineral maddelerin hücre gelişiminde çok fazla öneme sahip olmadıkları anlaşılmaktadır (Şekil 4.13)

Karbon kaynağı olarak glikoz yada gliserolün kullanımı halinde antibakteriyal ve antifungal aktivite artmakta, azot kaynaklarında soya peptonu ve yeast ekstrakt ile etkileşimi antibakteriyal aktiviteyi arttırmıştır. Mineral madde tipinin metabolit üretim üzerine önemli bir etkisi görülmemiştir. Her üç mineral maddenin glikoz ve gliserol ile etkileşimi metabolit üretimini olumlu yönde etkilemiştir. Aynı şekilde mineral maddelerin, azot kaynaklarından soya peptonu ve yeast ekstrakt ile etkileşimi özellikle antibakteriyal aktivitenin artmasında etkili olmuştur.

Response surface modelinden elde edilen bilgilere göre *P. macerans* karbon kaynaklarından gliserol ve glikozun varlığında ve azot kaynağı olarak soya peptonu ve yeast ekstraktın kullanımı metabolit üretimini olumlu yönde etkilediği söylenebilir. Mineral maddenin metabolit üretimi üzerine etkisi önemli düzeyde olmasa da, azot kaynaklarından soya peptonu ve yeast ekstrakt ile ikili etkileşimi olumlu yönde bulunmuştur.

Fermentasyon sonunda oluşan bileşiklerin, ortamdaki başlangıç maddeleri, besiyeri ve benzeri kirliliklerden ayrılması, temizlenmesi ve nihayet tanınması için basit, fakat güvenilir olan fizikokimyasal, biyolojik ve kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Fermentasyon ürünü için özel analizler gerekebilmektedir. (Denizci, 1996). Bu yöntemde tek bir plakada pek çok örneğin yürütülmesiyle UV ışığı altında bakılarak spotların belirgin bir şekilde görülmesi ve karşılaştırılması büyük kolaylık sağlar. Bu nedenle aktif molekül izolasyonu ile ilgili yaptığımız her basamakta, fermentasyon sıvısından elde edilen ekstrakt İTK ile incelenmiştir.

İyonik bileşikler, sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonunda suda, iyonik olmayan bileşiklerden daha çok çözünmektedir. Aynı zamanda iyonize bileşikler pH indirgenmesi ile ekstrakte edilmektedir. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen bileşikler üç sınıf içinde toplanırlar. Bunlar (1) Yüksek polar bileşikler; aminoasitler, organik asitler ve proteinler (2) Zayıf polar bileşikler; penisilin ve sefalosporinler (3) Polar olmayan bileşikler; tetrasiklin, griseofulvin şeklindedir (Denizci, 1996). Antibiyotikler

kimyasal olarak düşük molekül ağırlıkta organik yapıda bileşiklerdir. Genellikle organik maddelerin organik çözümlerde çözüldüğü özelliğine dayanarak etken madde saflaştırılmaya çalışılmıştır. Responce surface modeline göre belirlenen optimum şartlarda yapılan fermentasyon sonucunda elde edilen süpernatantın etil asetat ile ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen ekstrakt etken molekülün saflaştırılması amacıyla kolon kromatografisine alınmıştır. Polar bir bileşik olarak saptanan bu aktif molekül peptid özellik göstermiştir. Bu nedenle 1 gruba girmektedir.

Duitman et al (1999), *B. subtilis* ATCC 6633 suşu antifungal peptid antibiyotik potansiyeli içeren mycosubtilin, Marahiel et al (1993), *B. brevis*'in durgun faz kültür hücreleri siklik dekapeptitlar gramisidin S ve tirosidin ürettiği bildirilmiştir.

Maddelerin çeşitli çözücülerdeki çözünme özelliği kimyasal maddenin karakteristiği hakkında bilgi verir. Saflaştırılan madde kloroform, aseton, su, etanolde çözünürken, dietil eter, toluen ve butanol de çözünmediği çözünürlük testi sonucunda bulunmuştur.

Basitrasin antibiyotiği ise petrol eteri, etanol, iso propanol, ve butanol de çözünürken, kloroform, benzen, aseton, dietil eter ve etil asetat da çözünmediği dolayısıyla elde edilen antibiyotiğin basitrasin olmadığı sonucuna varılmıştır (Glasby, 1979)

İzole edilen maddenin *S.aureus*, MRSA ,*C. glabrata* ya karşı MIC değerleri ve MSC değerleri belirlenmiştir. MIC değerleri *C. glabrata*, MRSA ve *S. aureus* için sırasıyla 44,3µg; 44,3µg; 88,75µg olarak bulunurken, MSC değerlerinin de değişmediği belirlenmiştir. Basitrasin antibiyotiğinin MIC ve MSC değerlerinin üç organizma için 22,18µg olduğu belirlenmiştir.

Azevedo, (1993), yaptıkları çalışmada şeker kamışından izole ettikleri yeni bir strain olan *B.subtilis* C126'nın *Micrococcus flavus*'un gelişmesini inhibe ederek antibiyotik ürettiği gözlemiştir. Bu antibiyotiğin saflaştırılması ve karakterizasyonunda ekstraksiyon, İTK ve mikrobiyolojik testler kullanarak etken maddenin polipeptid antibiyotik olduğunu belirlemiştir.

Aktivite gösterdiği belirlenen izolatlar arasında gram pozitif ve gram negatif bakterilere antibakteriyal etkiye sahip olduğu kadar fungal aktivite gösteren izolatlarda bulunmaktadır. Özellikle günümüzde antifungal ajanlara büyük gereksinim

duyulduğundan her bir izolatın tek tek ele alınması ve etken molekül hakkında bilgi edinilmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın devamı olarak diğer izolatların ele alınması düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adinarayana, K., Eilaiah, P., Srinivasulu, B., Bhavani, Devi. R, Adinarayana G., 2003, Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid state fermentation process Biochemistry, 00,1-8.
- Aranda, E., Sanchez, J., Peferoen, M., Guereca, L., Bravo, A., 1996, Interaction of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of Spodeptera Frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae), Journal of Invertebrate Pathology, 68, 203-212.
- Ay, M., 1998, Organik kimyada araştırma teknikleri, A.Ü. F.F. Döner sermaye İşletmesi yayınları, No ,53.
- Azevedo, E.C., Rios, E.M., Fusushima, K., Campos-Takaki, G.M., 1993, Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 42, 1-5.
- Balow, A., Jruper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schieifer, K.H., 1992, The prokaryotes Second Edition, New York, 2140p.
- Başer, K.H.C., Demirci, F., Pauii, A., 2002, Antikandidal etkili uçucu yağlar ve aroma bileşikleri, Candida mikrobiyolojisi ve infeksiyonları simpozyumu, Eskişehir 21-22 Haziran, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 43, 145-160.
- Bayar, D., 2001, Sulu çözeltilerden adsorbsiyonla bor giderimi ve Deney tasarımı, Yüksek Lisans Tezi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı.
- Berdy, I., 1974, Recent developments in antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure, Adv. Appl. Microbiol, 18, 309.
- Bernal, G., Illanes, A., Ciampi, L., 2002, Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents, Electronic Journal of Biotechnology, 5, 1.

KAYNAKLAR (devam)

- Beşe, M., 1989, Mikrobiyolojide kullanılan antibiyotik duyarlılık ve deneme yöntemleri, 45-47.
- Bilgehan, H., 1995, *Bacillus* cinsi Klinik mikrobiyoloji tanı, Fakülteler Kitabevi, Barış yayınları, 529-532, İzmir.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., 1974, Bergey's Manual of alterminative bacteriology, 8 th. Edition, The Wiliams and Wilkins Company, 1246 p. Maltimore.
- Buchner, P., 1965, Endosymbiosis of animals with plant microorganisms Viley, London.
- Burgess, J., M., Jordan, E.M., Bregu, M., Mearns-Spragg, A., Boyd, K.G., 1999, Microbial antagonism a negleted avenue of natural products research, Journal of Biotechnology, 70, 27,37.
- Büber, E., Ačan, N.L., 2004, Ribozom dışı yolla sentezlenen biyoaktif peptidler . Hacettepe Tıp Dergisi, 35,1. 43-48.
- Chevanet, C., Besson, F., Michel, G., 1986, Effect of various growth conditions on spore formation and bacilomycin L production.Canadian Journal of Microbiology, 32, 254-258.
- Cross, T., 1982, Invitational ONR Lecture. *Actinomycetes*: A continuning source of new metabolites, Dev. Ind. Microbiol., 23,1, 1-182.
- Dal-Soo, K., Cheol-Yong, B., Jae-Jin, J., Sam-Jae, C., Hyun Woo, O., Soon Gyu, H., Keun-Sik, B., Eun Young, M., Kyung Sook, B., 2004, *Paenibacillus elgii* spp. Nov, with broad antimicrobiai activity, Int J Syst Evol Microbiol, 54 2031-2035.
- Demain, A.L., J.E, Davies., 1999, Manual of industrial microbiology and Biotechnology 2 nd Edition, 392-416.

KAYNAKLAR (devam)

- Denizci, A.A., 1996, Ege ve doğu Karadeniz bölgesi topraklarından izole edilen Aktinomisetler'den antibakteriyaî antibiyotiklerin aranması ve üretimi üzerine bir araştırma Biyoloji doktora tezi, s,149 Ege Üniversitesi İzmir.
- Duitman, E.H., Hamoen, L., Rembold, M., 199, The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an aminotransferase, and a fatty acid synthetase, *Genetics*, 96, 23, 13294-13299.
- Dülger, B., Gücin, F., Aslan, A., 1998, *Cetraria isiandica* (L.) Ach. Likeninin antimikrobiyal aktivitesi *Tr. J. Of Biology* 22, 111-118.
- Eltem, R., 1999, Mikrobiyal Fizyoloji Ders Notları Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir
- Eltem, R., Uçar, F., 1999, Pharmaceutically active sekondary metabolites of microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 52, 455-463
- Erdik, E., Obah, M., Yüksekışık, N., Öktemer, A., Pekel, T., İhsanoğlu, E., 1997, Denel Organik Kimya A.Ü.F.F. Döner Sermaye İşletmesi yayınları No, 44 Ankara.
- Faulkner, D.J., 2000, Highlights of marine natural products chemistry, *Nat. Prod. Rep.* 17, 1-6.
- Fredenhagen, A., Tamura, S., Kenny, P.T.M., Komura, H., Naya, Y., Nakanishi, K., 1987, Adrimid, a newpeptide antibiotic produced by an intracelluler bacterial symbiont isolated from a Brown planthopper, *J. Am. Chem. Soc*, 109, 4409-4411.

KAYNAKLAR (devam)

- Földes, T., Banhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L., Szigeti, J., 2000, Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food borne pathogenic and spoilage microorganisms, Journal of Applied Microbiology 89, 840-846
- Galvez, A., Maqueda, M., Martinez- Bueno, M., Lebdi, M., Valdivia, E., 1993, Isolation and physico-chemical characterisation of an antifungal and antibacterial peptide produced by *Bacillus licheniformis* A-12, Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 438-442.
- Gebhardt, K., Schimana, J., Wand, J., Fiedler, H.P, Kallenborn, G.H., Holzenkampfer, M., Krastel, P., Zeeck, A., Vater, J., Hölzel, A., Schmid, G.D., Rheinheimer, J., Dettner, K., 2002, Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. Fems Microbiology Letters, 217,199-205.
- Germida J. J., Siciliano, S.D., 2001, Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars, Biol Fertil. Soils, 33, 410-415.
- Glasby, J.S, 1979, Encyclopaedia of Antibiotics Second Edition, ICI Limited, Hexagon House, Blacley, Manchester.
- Gordon, R.E., 1981, One hundred and seven years of the cins *Bacillus*. In R.C. Berkeley and M. Goodfeliow (ed), The aerobic endospore forming bacteria, Academic pres, London.
- Gözükara, E:M, 1997, Biyokimya,Nobel tıp kitabevleri
- Gündüz, T., 1997, İnrümentel Analiz A.Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü Bilge yayıncılık Ankara.

KAYNAKLAR (devam)

- Güven, U., Kaanoğlu, M., Türkmen, L., 2002, Değişik Tuz Konsantrasyonlarında *Bacillus* türlerinin *Staphylococcus aureus* Türü Üzerine İnhibitör Etkilerinin Araştırılması İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9, 2 109-112.
- Haiyin, H., Shen, B., Korshaila, J., Carter, G., 2001, Circuiosin, new antibacterial lipopeptidesw from *Bacillus circulans* J2I54, Tetrahedron 57 2001, 1189-1195.
- Hentschel, U., Schnid, M., Wagner, M., Fieseier, L., Gernert, C., Hacker, J., 2001, Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aptysina aerophoba* and *Apfysina cavernicola*, FEMS Microbiology Ecology, 35, 305-312.
- Ichikawa, T., Date, M., Ishikura, T., Ozaki, A., 1971, Improvement of kasugamycin-producing strain by the piece agar method and the prototroph method, Folia Microbiol (Praha), 16, 3, 218-24.
- Kelman, D., Kashman, Y., Rosenberg, E., Han, M., Ifrach, I., Loya, Y., 2001, Antimicrobial activity of the reef sponge *Amphimedon viridis* from the Red Sea: evidence for selective toxicity, Aquatic Microbial Ecolog, 24, 9-16.
- Keynan, A., N, Sandler., 1983, Spore research in historical perspective in A Hurst and G. W. Gouid (ed), The bacterial spore, vol.2, p. 1-48, AcademicPress, New York.
- Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Töre, O., Göral, G., Helvacı, S., Gediklioğlu, S., 1994, Klinik Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 370-372.
- Kıvçak, B., Mert, T., Öztürk, H., 2001, Antimicrobial and cytotoxic activities of *Ceratonia siliqua* L. extracts, Tür. J. Biol. 26, 197-200
- Kloepper, I.W., Mıcinroy, J.A., Bowen, K.L., 1992, Comparative identification by fatty acid analysis of soil, rhizosphere, and geocarposphere bacteria of peanut (*Arachis hypogea* L.), Plant and soil, 139, 85-90

KAYNAKLAR (devam)

- Koch, A., 1960, Intracellular symbiosis in insects, *Annu. Rev. Microbiol*, 14, 121-140.
- Koç, A.N., 2002, Tıbbi bakımdan önemli *Candida* türlerinin mikolojik özellikleri, *Candida Mikrobiyolojisi ve enfeksiyonları Simpozyumu*, Eskişehir 21-22 Haziran, Türk Mikrobiyolojisi Cemiyeti, 43, 37-46.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C., 1997, *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Lippincott-Raven Pub, 5th. Edition, Philadelphia, USA, 86-856
- Lancini, G., Lorenzetti, R., 1993, *Biotechnology of Antibiotics and other bioactive microbial metabolites*, Plenum pres, New York and London.
- Lancini, G., Parenti, F., Gailo, G.G., 1995, *Antibiotics: A Multidisciplinary Approach*. Plenum Pres, New York and London.
- Lee, J.C., Coval, S.J, Clardy. J., 1996, A cholesteryl ester protein inhibitor from an insect associated fungus, *J. Antibiot*, 49, 693-696.
- Levy, S.B. 1984, *The antibiotic paradox how miracle drugs are destroying the miracle*. Plenum Pres. New York
- Logan, N.A., 1998, *Bacillus* species of medical and veterinary importance, *J. Med. Microbiol*, 25, 157-165.
- Marahiel, M.A., Nakona, M.M., Zuber, P., 1993 , Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*, *Molecular Microbiology*, 7,5,6631-636.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M., Parker, J., 2006, *Brock: Biology of Microorganisms* (eds. Prescott, Harley, Klein) Prentice Hall,

KAYNAKLAR (devam)

- Martini, N.D., 2001, The isolation and charecterisation of antibacterial compounds from *Combretum Erythrophyllum* (Burch), Sond, Phd. Thesis Pretoria University.
- Moita, C., Feiso, S.S., Nunes, L., Curto, M.J.M., Roseiro, J.C., 2005, Optimisation of pyysical factors on the production of active metabolites by *Bacilhis subtilis* 355 aganist wood surface contaminant fungi. *International Biodeterioration Biodegradation* 55, 261-269.
- Nakagawa, A., Konda, Y., Hatano, A., Harigaya, Y., Onda, M, M., Omura, S., 1988, Structure and biosynthesis of novel antibiotics, Aurentinins A and B produced by *Bacillus aurentinus*, *J. Org. Chem*, 53, 2660-2661.
- 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.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, (NCCLS) 1990, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard (M2-A4), National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, (NCCLS) 1990, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard (M7-A2), National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, (NCCLS) 2002, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard (M38-A), National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.

KAYNAKLAR (devam)

- Oscaris, J., Lasa, I., Pisabarro, G., 1999, Detection and charecterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a boroad spectrum of activity, FEMS Microbiology Letters, 178, 337-341.
- Ouhdouch, Y., Barakate, M., Finance, C., 2001, Actinomycetes of Moroccan habitats: İsolation and screening for antifungal activities, Eur. J. Soil Biol, 37, 69-74.
- Oxoid, 1990, Manual Manual. 6th Edition, Anonymous, Unipath Limited, Wade Road, Basingtoke, Hampshire, RG24 0PW, England.
- Öner, M., 1988, İleri Endüstriyel Ders Notlan E. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Böl. Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı, s:28, İzmir.
- Özçelik, S., 1995, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Klavuzu, Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fak. Yayın No:2, Ders kitapları, Isparta.
- Özçelik, S., 1998, Gıda Mikrobiyolojisi Uygulama Klavuzu, Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fak. Yayın no:17 Ders kitapları No.7, Isparta.
- Patel, P.S., Huang, S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., Meyers, E., Fernandes, P., Mayerl, F., 1995, Bacillaene, a novel inhibitör of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis* production, taxonomy, isolation, physochemical charecterization and biological activity, Journal of antibiotics, 48, 9, 997-1003.
- Perez, C., Suarez, C., Castro, G.R., 1993, Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* cluster, Folia, Microbiol, 38, 1, 25-28.
- Peter, T.M., Kenny, S.Y., Tamuraq, A.F., Yoko Naya, K.N., Koushi Nishiyama, M.S., Hiroshi Kita, H.K., 1989, Symbiosis Microorganisms of Insect: a potantial new source for biological active substances, Pestic. Sci. 27, 117-131.

KAYNAKLAR (devam)

- Reichenbach, H., Hofle, G., 1989, The gliding Bacteria: a treasury of secondary metabolites in bioactive metabolites from microorganisms, 79-100. Ed by M.E. busbell U. Grafe, Elsevier Science Pubiishers B.V., Printed in Netherlands.
- Rivas, R., Pedro, F.M., Eustoquio, M.M., Encama, V., 2005, *Paenibacillus phyuosphaerae* sp. Nov a xylanolytic bacterium isoiated from the phyllosphere of Phoenix dactylifera, Int J Syst Evoi Microbiol, 55, 743-746.
- Sasser, M., 1990, Identification of bacteria throught fatty acid analysis.
- Sessitsch, A., F.Y, Kan., U, Pfeifer., 2003, Diversity and commnity structure of culturable *Bacillus* spp. Populations in the rhizospheres of transgenic potatoes expressing the lytic peptide ccropin B, Applied Soil Ecoiogy, 2, 149-158.
- Setlow, P., 1995, Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species, Annual Review of Microbiology, 49, 29-54.
- Shibazaki, M., Suguwara, T., Nagai, K.S.Y., 1996, YM-47522, a novel antifungal antibiotic produced by *Bacillus* spp. Taxonomy,fermentation, isolation and biological properties, The Journal of Antibiotics, 49, 4340-344.
- Smith, N.R., Gordon, RE., Clark, F.E., 1952, Aerobic spore forming Bacteria, US Dept of Acric, Washington, 16p.
- Sneath, P.H.A., 1986, Endospore forming gram positive rods and cocci. Bergeys manuel of systematic bacteriology, Vol. 2. Williams Wilkins Baltimore.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., Deguchi., 1998, Production of the antibacterial substance by *Bacillus* spp. Strain MN12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish, Aquaculture 165, 269,280.

KAYNAKLAR (devam)

- Tamer, A.Ü., Karaboz, I., Uçar, F., Bursahoğlu, M., Oğultekin, R., Ünver, E., 1989, Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu, T.C. Anadolu Üniv. Eğ. Sağ. ve Araş. Ça. Vakfı yayınları, 74, Eskişehir, 260s.
- Tüba-Tübitak –TTGV, 1995, Biyoteknoloji alanına yönelik politikalar çalışma grubu raporu, Ankara.
- Tübitak, 1985, Temel Bilimler Araştırma Grubu Biyoteknoloji ihtisas Komisyonu. Biyoteknoloji alanında Türkiye Araştırma ve Geliştirme Politikası, TÜGAM matbası.
- Ustaçelebi, Ş., 1999, Temel ve klinik mikrobiyoloji Güneş Kitabevi ,Ankara
- Uthede, R.S., Sholberg, P.L., 1986 In vitro inhibition of plant pathogens by *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* and *in vivo* control of two postharvest cherry diseases, Canadian Journal of Microbiology, 32, 963-967.
- Uzun, Ö., 2002, Nazokomiyal Hematojen Kandyazis, *Candida* Mikrobiyolojisi ve infeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir21-22 Haziran, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 43, 117-124.
- Ünlütürk, A., Turantaş, F., 1996, Gıda mikrobiyolojisi uygulamaları, Ege Meslek Yüksek Okulu yayınları No, 19, E.Ü. Basımevi, İzmir, 140s.
- Vlietinck, A.J., Van Hoof, T., Lasure, A., Van den Berghe, D., Rwangabo, P.C. Mvukiyumwami, J., 1995, Screening of hundred rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties, Journal of Ethnopharmacology, 46, 31-47.
- Waksman, S.A., 1967, *Actinomycetes*, The Ronald Pres Company, New York.

KAYNAKLAR (devam)

- Wallhauser, K.H., 1969, Antibiotics in thin layer Chromotography, A Laboratory Handbook, 566-577, Ed. By E. Stahl. Taranslated by M.R.F. Ashworth, Springer-Verlag Berlin.
- Wedge, D.E., Nagle, D.G., 2000, A new 2D-TLC Bioautography method for the discovery of novel antifungal agents to control plant pathogens, J. Nat. Prod. 63, 1050-1054.
- Yıldız, M.T., 2003, Yeni sentezlenmiş bazı benzazol türevlerinin antimikrobiyal aktivite ve toksisitelerinin belirlenmesi, Osmangazi Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi.
- Yılmaz, M., Beyatlı, Y., 2003, *Bacillus* cinsi bakterilerde antimikrobiyal aktivite ve antibiyotik üretimi Orlab on line Mikrobiyoloji dergisi, 01, 35-49.
- Yılmaz, M., Soran, H., Beyatlı, Y., 2005, Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil, Microbiological Research,
- Yüce, K., 1988, Antibiyotikler ve infeksiyon hastalıklarında Tedavi Prensipleri. Bilgehan Basımevi, Bornova- İzmir.
- Zuber, P., Nakona, M.M., Marahiei, M.A., 1993, Peptide antibiotics in Sonenhein, *Bacillus subtilis* and other gram pozitif bacteria, American Society for Microbiology, Washington, DC, p, 997.
- Zimmerman, S:B., Schwartz, C:D., Monaghan, R:L., Pelak, B:A., Weisberger, B., Gilfillan, E.C., Mochales, S., Hernandez, S., Currie, S.S., Tejera, E., Stabley, E.O., 1986, Difficidin and oxidifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis* Production, Taxonomy and Antibacterial activity, J. Antibiotic, XL, 12, 1677-1681.

ÖZGEÇMİŞ

Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olan aday 10.07.1976 yılında Kahramanmaraş ilinde doğmuştur. İlkokulu Albayrak İlkokulu'nda, Ortaokulu K. Maraş Kız Meslek Lisesi'nde, Liseyi K. Maraş İbrahim Çalık Lisesi'nde tamamladıktan sonra 1994 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazanmıştır. 1998 yılında "Biyolog" ünvanı ile mezun olmuştur. Aynı yıl KSÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalında yüksek lisans kazanmıştır. 1999 yılında KSÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümüne araştırma görevlisi olarak atanmıştır. 2000 yılında Dumlupınar Üniversitesi Sağlık Yüksek Okuluna Biyoloji öğretim görevlisi göreve başlamıştır. 2001 yılında "Kahramanmaraş yöresinde yaygın olarak kullanılan bazı pestisitlerin toprak mikroorganizmaları üzerine etkisi" adlı yüksek lisansını başarıyla tamamlamıştır. 2001 yılında Osmangazi Üniversitesi'nde doktora eğitimine başlamıştır. 2003 yılında DPÜ Sağlık Yüksek Okulun'a araştırma görevlisi olarak atanmıştır. Aynı yıl Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümüne araştırma görevlisi olarak atanmıştır. Evli ve 1 çocuk sahibidir. Yabancı dili ingilizcedir.