

**TOPRAKTAN ANTİBİYOTİK ÜRETEN
BACILLUS SP.' LERİN TARANMASI, ANTİBİYOTİK
ÜRETİMİ ÜZERİNE BAZI PARAMETRELERİN
ETKİSİ VE SPORULASYONLA İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Alev USTA



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPRAKTAN ANTİBİYOTİK ÜRETEEN *BACILLUS SP.*' LERİN TARANMASI,
ANTİBİYOTİK ÜRETİMİ ÜZERİNE BAZI PARAMETRELERİN ETKİSİ VE
SPORULASYONLA İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Alev USTA

Doç. Dr. Elif DEMİRKAN

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2012

TEZ ONAYI

Alev USTA tarafından hazırlanan “ Topraktan antibiyotik üreten *Bacillus* sp.’ lerin taranması, antibiyotik üretimi üzerine bazı parametrelerin etkisi ve sporulasyonla ilişkisinin belirlenmesi ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Elif DEMİRKAN

Başkan:

Üye:

Üye:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Kadri ARSLAN
Enstitü Müdürü

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

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

../.. /....

İmza

Alev USTA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOPRAKTAN ANTİBİYOTİK ÜRETEN *BACILLUS* SP.' LERİN TARANMASI,
ANTİBİYOTİK ÜRETİMİ ÜZERİNE BAZI PARAMETRELERİN ETKİSİ VE
SPORULASYONLA İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ

Alev USTA

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada, Türkiye' nin 25 farklı ilinden alınan toprak örneklerinden 57 adet antibiyotik potent bakteri izole edilmiştir. 57 bakterinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri araştırılmış ve 52 bakteri *Bacillus* cinsi olarak belirlenmiştir. *Bacillus* türleri karşıt-çizgi metodu ile antibiyotik üretimi için taranmıştır. Antibiyotik üretim testleri, 25 *Bacillus* suşunun kullanılan test mikroorganizmaları üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. *Shigella sonnei* ile en büyük inhibisyon zonuna (25 mm) sahip *Bacillus*' un bir suşu seçilmiş ve *Bacillus* sp. EA62 olarak isimlendirilmiştir.

Bacillus sp. EA62' den antibiyotik üretimi 6 farklı ortamda test edilmiş ve antibiyotik üretimi *Shigella sonnei*' ye karşı agar kuyu difüzyon metodu ile tespit edilmiştir. Bir ortam en büyük inhibisyon zonunu (15 mm) göstermiştir ve bu ortam daha sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Seçilen bu ortamda antibiyotik üretimi ile sporulasyon arasındaki ilişki araştırılmıştır. Buna göre, antibiyotik üretimindeki artış ile sporulasyonun paralel olduğu belirlenmiştir.

Bacillus sp. EA62' den antibiyotik üretimi için farklı üretim şartlarının optimizasyonu (inkübasyon zamanı, pH, glukoz ve nitrojen konsantrasyonları) gerçekleştirilmiştir. Seçilen izolattan antibiyotik üretimi için optimum koşullar 72. saat (15 mm), pH 7.5 (23 mm), % 3 glukoz (25 mm) ve % 0.3 yeast ekstrakt (23 mm) olarak bulunmuştur.

Bu yeni izole edilen suş endüstriyel ölçekte büyük bir potansiyele sahip olabilir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, Antibiyotik taraması, Antibiyotik üretimi, Sporulasyon.

2012, xiii + 89 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

SCREENING OF ANTIBIOTIC PRODUCING *BACILLUS* SP. FROM SOIL, EFFECT OF SOME PARAMETERS ON THE PRODUCTION, AND DETERMINATION OF RELATIONSHIP WITH SPORULATION

Alev USTA

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

In this study, 57 antibiotic potent bacteria were isolated from soil samples that provided from 25 different cities of Turkey. Morphological and physiological features of 57 bacteria were investigated, and 52 bacteria were determined as *Bacillus* genus. *Bacillus* species were screened for the production of antibiotic by cross-streak method. Antibiotic producing test indicated that 25 *Bacillus* strains had effect on the used test microorganisms. One strain of *Bacillus* that had the biggest inhibition zone (25 mm) with *Shigella sonnei* was selected, and it was named as *Bacillus* sp. EA62.

Production of antibiotic from *Bacillus* sp. EA62 was tested in six different media, and antibiotic production was determined by agar well diffusion method against *Shigella sonnei*. One medium was observed the biggest inhibition zone (25 mm), and this medium was selected for further studies. In this selected medium relationship between the antibiotic production and the sporulation was investigated. Accordingly, it was determined that the increase of antibiotic production parallel to sporulation.

Optimization of different growth conditions (time of incubation, pH, glucose and nitrogen concentrations) for antibiotic production by *Bacillus* sp. EA62 was performed. Optimum conditions for the production of antibiotic by selected isolate were obtained to be 72 hour (15mm), pH 7.5, % 3 glucose (25 mm), and % 0.3 nitrogen concentration (23 mm).

This newly isolated *Bacillus* strain maybe great potential for antibiotic production at industrial scale.

Key Words: *Bacillus*, Antibiotic screening, Antibiotic production, Sporulation.

2012, xiii + 89 sayfa.

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sűresince engin tecrűbe ve bilgi birikimiyle beni yűnlendiren, çalıŐmalarımın her aŐamasında deneyimlerinden faydalanmama imkan sunan, her konuda ilgi ve desteęini esirgemeyen danıŐmanım Sayın Doç. Dr. Elif DEMİRKAN' a,

ÇalıŐmalarımda kullandıęım test mikroorganizmalarını temin etmemde yardımcı olan Uludaę Üniversitesi Tıp Fakűltesi, Mikrobiyoloji Bűlűmű Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Cűneyt Özakın ve Prof. Dr. Beyza Ener' e,

Hayatımın her alanında beni doğru yűnde etkileyen, her zaman yanımda olduklarını hissettirerek bana gűven veren, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen canım aileme,

Dostluklarını her zaman hissettiren sevgili arkadaşlarıma en içten dileklerle teŐekkűr eder, saygılarımı sunarım.

Alev USTA

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

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Antibiyotiklerin Tarihçesi.....	5
2.2. Mikrobiyal Metabolitler.....	9
2.2.1. Primer metabolitler.....	9
2.2.2. Sekonder metabolitler.....	9
2.3. Antibiyotik Üretim Mekanizmaları.....	11
2.3.1. Ribozomal sentez mekanizması.....	11
2.3.2. Nonribozomal sentez mekanizması.....	15
2.4. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması.....	20
2.4.1. Antibiyotiklerin etki güçlerine göre sınıflandırılması.....	20
2.4.2. Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması.....	21
2.5. Antibiyotik Üreten Mikroorganizmalar.....	22
2.5.1. <i>Bacillus</i> hakkında genel bilgiler.....	22
2.5.2. <i>Bacillus</i> ' larda spor oluşumu.....	24
2.5.2.1. Spor oluşumu ile antibiyotik üretimi arasındaki ilişki.....	26

2.6. <i>Bacillus</i> ' lar Tarafından Üretilen Bazı Antibiyotikler.....	27
2.6.1. Basitrasin.....	28
2.6.2. Gramisidin.....	29
2.6.3. Mikobasilin.....	30
2.6.4. Tirosidin.....	31
2.6.5. Sürfaktin.....	32
2.6.6. Basilisin.....	33
2.6.7. Subtilin.....	33
2.6.8. İturin.....	34
2.6.9. Zwittermisin.....	35
2.6.10. Cerein.....	35
2.6.11. Polimiksinler.....	36
2.7. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları.....	37
2.7.1. Enfeksiyon hastalıkların tedavisinde kullanımı.....	37
2.7.2. Hayvancılıkta kullanımı.....	37
2.7.3. Antibiyotiklerin ziraat alanında kullanımı.....	37
2.7.4. Araştırma materyali olarak kullanımı.....	38
2.8. Antibiyotik Tarama Yöntemleri.....	38
2.8.1. Karşıt-çizgi yöntemi.....	38
2.8.2. Agar kuyu difüzyon yöntemi.....	40
2.8.3. Agar disk difüzyon yöntemi.....	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1. Materyal.....	42
3.2. Yöntem.....	43
3.2.1. Topraktan antibiyotik üreten bakterilerin taranması.....	43
3.2.2. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri.....	43
3.2.3. <i>Bacillus</i> ' un taksonomik sınıflandırılması için morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	44

3.2.3.1. Hareketlilik testi.....	44
3.2.3.2. Katalaz testi.....	45
3.2.3.3. Nişastanın hidrolizi testi.....	45
3.2.3.4. Gram boyama.....	45
3.2.3.5. Spor boyama.....	46
3.2.4. <i>Bacillus</i> sp.' lerde karşıt-çizgi yöntemi ile antibiyotik taranması.....	46
3.2.5. Antibiyotik üretimi için uygun besiyeri seçimi.....	46
3.2.6. Bakteri üretim koşulları.....	48
3.2.7. Bakteri üremesinin ölçülmesi.....	48
3.2.8. Antibiyotik üretiminin tespiti.....	48
3.2.9. Antibiyotik üretiminin, sporulasyon ile ilişkisinin saptanması.....	49
3.2.10. Antibiyotik üretimi üzerine bazı faktörlerin etkisinin belirlenmesi.....	49
3.2.10.1. pH' nın etkisi.....	49
3.2.10.2. Glukoz konsantrasyonunun etkisi.....	49
3.2.10.3. Nitrojen konsantrasyonunun etkisi.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Toprakтан Antibiyotik Potent Bakterilerin Belirlenmesi.....	51
4.2. Biyokimyasal ve Morfolojik Testler.....	52
4.2.1. Biyokimyasal testler.....	52
4.2.1.1. Katalaz testi.....	52
4.2.1.2. Nişasta hidroliz testi.....	53
4.2.2. Morfolojik testler.....	54
4.2.2.1. Hareketlilik testi.....	54
4.2.2.2. Gram boyama.....	54
4.2.2.3. Spor boyama.....	55
4.3. <i>Bacillus</i> sp.' lerde Karşıt-Çizgi Yöntemi ile Antibiyotik Taraması.....	55
4.4. Antibiyotik Üretimi İçin Uygun Besiyeri Seçimi.....	58
4.5. Antibiyotik Üretimi ile Sporulasyon Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi.....	60

4.6. Antibiyotik Üretimi Üzerine Bazı Faktörlerin Etkisinin Belirlenmesi	60
4.6.1. pH' nın etkisi.....	60
4.6.2. Glukoz konsantrasyonunun etkisi.....	63
4.6.3. Nitrojen konsantrasyonunun etkisi.....	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ.....	89

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde Orantı
°C	Santigrat Derece
α	Alfa
cm	Santimetre
Ca	Kalsiyum
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CaCO ₃	Kalsiyum karbonat
CaCl ₂ .2H ₂ O	Kalsiyum klorür dihidrat
CoCl ₂ .6H ₂ O	Kobalt klorür hekzahidrat
CuCl ₂	Bakır klorür
CuSO ₄ .7H ₂ O	Bakır sülfat heptahidrat
dk	Dakika
FeSO ₄	Demir sülfat
FeSO ₄ .7H ₂ O	Demir sülfat heptahidrat
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum hidrojen fosfat
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
KI	Potasyum İyodür
I	İyot
Mg	Magnezyum
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mN/m	Milnewton/metre
MnCl ₂	Magnezyum klorür
MnCl ₂ .4H ₂ O	Magnezyum klorür tetrahidrat
MgSO ₄	Magnezyum sülfat

MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ HPO ₄	Sodyum hidrojen fosfat
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Sodyum molibdat dihidrat
NH ₄ Cl	Amonyum klorit
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Diamonyum hidrojen fosfat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
UV	Ultraviyole
ZnCl ₂	Çinko klorür
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

Kısaltmalar

Açıklamalar

AMP	Adenozinmonofosfat
ATP	Adenozintirifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
GTP	Guanozintrifosfat
kb	Kilo Baz
kDa	Kilo Dalton
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NRPS	Nonribozomal Peptid Sentetaz
PPi	Prifosfat
RNA	Ribonükleik Asit
tRNA	Transfer Ribonükleik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. 1930 ve 2010 yılları arasında kullanılan antibiyotik sınıfları.....	8
Şekil 2.2. Mikroorganizmalarda üreme eğrisi.....	10
Şekil 2.3. Ribozomal sentez.....	11
Şekil 2.4. Ribozomal peptid sentezinde aminoasitin aktivasyon aşaması.....	12
Şekil 2.5. Ribozomal peptid sentezinde başlama aşaması.....	13
Şekil 2.6. Ribozomal peptid sentezinde uzama aşaması.....	13
Şekil 2.7. Ribozomal peptid sentezinde sonlanma ve ribozomlardan bırakılma aşaması.....	14
Şekil 2.8. Nonribozomal peptid sentetazlarda modüller.....	16
Şekil 2.9. Aminoasitin aktivasyon aşaması.....	17
Şekil 2.10. Başlama ve uzama aşaması.....	18
Şekil 2.11. Sonlanma aşaması.....	18
Şekil 2.12. Nonribozomal sentez mekanizması.....	19
Şekil 2.13. Sporulasyon aşamaları.....	25
Şekil 2.14. Bakterilerde görülen spor tipleri.....	25
Şekil 2.15. Basitrasin.....	29
Şekil 2.16. Gramisidin.....	30
Şekil 2.17. Mikobasilin.....	31
Şekil 2.18. Tirosidin.....	31
Şekil 2.19. Sürfaktin.....	32
Şekil 2.20. Basilisin.....	33
Şekil 2.21. Subtilin.....	34

Şekil 2.22. İturin.....	34
Şekil 2.23. Zwittermisin.....	35
Şekil 2.24. Polimiksin.....	36
Şekil 2.25. Sir Alexander Fleming- karşıt çizgi (cross streak) metodu.....	39
Şekil 2.26. Karşıt-çizgi yöntemi.....	39
Şekil 2.27. Agar kuyu difüzyon yöntemi.....	40
Şekil 2.28. Agar disk difüzyon yöntemi.....	41
Şekil 3.1. Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller	42
Şekil 4.1. Antibiyotik potent bakteri kolonilerinin görünümü.....	51
Şekil 4.2. <i>Bacillus</i> sp. izolatlarının taksonomik özellikleri.....	52
Şekil 4.3. Petri kabında katalaz (+) bakteride serbest oksijenin kabarcıklar halinde görünümü.....	53
Şekil 4.4. Nişasta hidrolizi sonucunda iyotla boyanmış ve boyanmamış bölgeler...	53
Şekil 4.5. Petri kabında agarlı besiyerinde hareketlilik kontrolü.....	54
Şekil 4.6. Işık mikroskopunda Gram (+) bakterilerin görünümü (100X).....	54
Şekil 4.7. Işık mikroskopunda sporların görünümü (100X).....	55
Şekil 4.8. <i>Bacillus</i> ' larda karşıt-çizgi yöntemiyle antibiyotik taraması.....	56
Şekil 4.9. <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin 6 farklı besi ortamında zamana bağlı üreme değerleri.....	59
Şekil 4.10. Farklı üreme ortamında üretilen <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin antibiyotik üretimi üzerine inkübasyon zamanının etkisi.....	59
Şekil 4.11. Farklı pH değerlerine sahip besi ortamlarında <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin zamana bağlı üreme değerleri.....	61
Şekil 4.12. Farklı pH değerlerine sahip besi ortamlarında <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin 72. saatte antibiyotik üretimi.....	62
Şekil 4.13. 72. saatte farklı pH değerlerine sahip besi ortamlarında <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması.....	62

Şekil 4.14. Farklı glukoz konsantrasyonuna sahip besi ortamlarında <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin zamana bağlı üreme değerleri.....	64
Şekil 4.15. 72. saatte farklı glukoz konsantrasyonuna sahip besi ortamlarında <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin antibiyotik üretimi.....	64
Şekil 4.16. 72. saatte farklı glukoz konsantrasyonuna sahip besi ortamlarında <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması.....	65
Şekil 4.17. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonuna sahip besi ortamlarında <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin zamana bağlı üreme değerleri.....	66
Şekil 4.18. 72. saatte farklı yeast ekstrakt konsantrasyonuna sahip besi ortamlarında <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin antibiyotik üretimi.....	67
Şekil 4.19. 72. saatte farklı yeast ekstrakt konsantrasyonuna sahip besi ortamlarında <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Primer metabolitlere örnekler.....	9
Çizelge 2.2. Sekonder metabolitlere örnekler.....	10
Çizelge 2.3. Ribozomal yolla sentezlenen bazı antibiyotikler.....	14
Çizelge 2.4. Nonribozomal yolla sentezlendiği gösterilen bazı antibiyotikler.....	20
Çizelge 2.5. <i>Bacillus</i> ' lar tarafından üretilen bazı antibiyotikler.....	28
Çizelge 3.1. Kullanılan test bakterileri ve katalog numaraları.....	43
Çizelge 3.2. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri.....	43
Çizelge 3.3. Biyokimyasal testlerde kullanılan besiyerleri.....	44
Çizelge 3.4. Antibiyotik üretiminde kullanılan besiyerleri.....	47
Çizelge 4.1. Toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin test bakterilerine karşı inhibisyon zon çapları.....	57
Çizelge 4.2. Farklı besiyerlerinde üretilen <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin üreme ve inhibisyon zonlarının karşılaştırılması.....	58
Çizelge 4.3. <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin üreme, zon çapı ve koloni sayımlarının sonuçları.....	60
Çizelge 4.4. Farklı pH değerlerinin, <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin antibiyotik üretimi ve üremesi üzerine etkileri.....	61
Çizelge 4.5. Farklı glukoz konsantrasyonlarına sahip besi ortamlarının <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin antibiyotik üretimi ve üremesi üzerine etkileri.....	63
Çizelge 4.6. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarına sahip besi ortamlarının <i>Bacillus</i> sp. EA62' nin antibiyotik üretimi ve üremesi üzerine etkileri.....	66

1.GİRİŞ

Antibiyotikler, genellikle bazı bakteri ve mantar gibi canlı mikroorganizmalar tarafından üreme ortamlarında sentezlenen, birçok mikroorganizmanın üremesini durdurucu veya öldürücü etki gösteren ve çoğunlukla enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan maddelerdir.

Kimyasal yapıları belli veya yapay olarak elde edilen maddelere, kemoterapotik; doğal kaynaklı olanlara ise antibiyotik denmesine karşın günümüzde antibiyotiklerin çoğunun sentetik ya da yarisentetik yöntemlerle elde edilmesi mümkün olduğundan, antibiyotik deyimi, tedavide kullanılan kemoterapotik ve antibiyotik niteliğindeki maddeler için genel bir ad olarak kullanılmaktadır.

50 yıldan fazla zamandır, bakteri ve fungus enfeksiyonlarına karşı kullanılmakta olan antibiyotikler, bağışıklık baskılayıcı ajanlar, hipokolesterolemik ajanlar, enzim inhibitörleri ve antiparazitik ajanlar olarak da kullanılmaktadırlar (Demain 1999).

Doğada yaygın olarak bulunan antibiyotikler; toprağın, suyun, kanalizasyon ve kompostun mikrobiyal popülasyonunda düzenleyici rol oynamaktadırlar (Awais ve ark. 2007).

Antibiyotik üretimi, birkaç çeşit toprak bakterileri ve mantarların özelliğidir ve hayatta kalma mekanizması olarak nitelendirilmektedir (Talaro ve Talaro 1996, Jensen ve Wright 1997).

Antibiyotikler, Bacillaceae, Actinomycetales ve Mycophyta' taki bazı cinsler tarafından çok basamaklı biyosentetik yollar ile üretilen sekonder metabolitlerdir. Antibiyotik sentezi için yapısal ve düzenleyici genler rol oynamaktadır ve bir antibiyotik 15-20 genin ortak ürünüdür (Demain ve ark. 1983).

Antibiyotikler ilk olarak penisilin ve sülfonamidlerin kullanımı ile 1940' lı yıllarda yaygın olarak kullanım alanı bulmuştur. İlaç sektörü hızla gelişmiş ve bu ilaçların 100' den fazla çeşidi geliştirilmiştir. 1990' larda mikroorganizmalardan yılda 200-300

yeni biyoaktif ürün elde edilirken, 1997' de bu rakamın 500 olduğu bildirilmektedir (Demain 1999).

Dünyada antibiyotikler oldukça fazla kullanılmaya başlanmış, örneğin sadece Amerika Birleşik Devletleri' nde 1998 yılı içinde 150 milyon reçete yazıldığı bildirilmiştir (Levy 1998). Antibiyotik kullanımındaki bu büyüme bakterilerin bu ajanlar tarafından öldürülmeye dirençli olma yeteneği ile paraleldir ve dolayısıyla etkili antibiyotiklerin sayısında her geçen yıl düşüş gözlenmiştir (Levy 1998). Son yıllarda, çok sayıda patojen mikroorganizma suşlarının ortaya çıkması antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir ve bu da halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Gerçek şu ki, bazı patojen mikroorganizmalar var olan tüm antibiyotiklere karşı dirençli ve tedavi edilememektedir. Bu nedenle tamamen yeni tip antibiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır (Conlon ve ark. 2006).

Birçok ilaç firması, geçmişteki geniş spekturumlu yaklaşım yerine, tek bir bakteri türü veya cinsi ile dar spektrumlu antimikrobiallerin belirlenmesi üzerine odaklanmaktadır (Mincey 2001). Ancak, mikroorganizmalardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin çoğu hayvan deneylerini geçememekte, sadece birkaç tanesi tıbbi olarak faydalı bulunarak ticari olarak üretilmektedir (Eltem ve Uçar 1998, Muhammad ve ark. 2009). Ancak yine de sürekli olarak yeni antibiyotiklerin keşfedilmesi beklenmekte ve bu sebeple de *Streptomyces*, *Bacillus* ve *Penicillium* gibi birkaç cinse ait türler antimikrobiyal madde üretme yetenekleri bakımından doğadan incelenmektedirler. Bunlar arasında yer alan *Bacillus* türleri, antibiyotik üretme kapasitesi yönünden en çok incelenen organizmalar arasına girmiştir (Perez ve ark. 1993, Eltem ve Uçar 1998).

Bacillus' lar, geniş metabolik aktiviteye sahip oluşu, izolasyonunun kolaylığı, üretiminde kompleks besi ortamına ihtiyaç duymaması, kısa sürede gelişimi vb. nedenlerden dolayı araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Rosovitz ve ark. 1998, Wipat ve Harwood 1999). Yapılan araştırmalarda *Bacillus* cinsinin antimikrobiyal madde üretim potansiyelinin yüksek olduğu, antibiyotik üretimiyle biyoteknoloji endüstrisine katkı sağlayabildikleri bildirilmiştir (Eltem ve Uçar 1998, Wipat ve Harwood 1999).

Bacillus' ların birkaç türü polipeptid sınıfından antibiyotikler üretmektedirler. Antibiyotik veya antimikrobiyal madde üreten *Bacillus* türleri arasında *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus circulans* ve *Bacillus cereus* gibi türler yer almaktadır. Birçoğu basitrasın, polimiksin ve subtilin gibi peptid antibiyotikler üretmektedirler (Morikawa ve ark. 1992, Perez ve ark. 1993, Drablos ve ark. 1999).

Kimyasal insektisit ve pestisitlerin yarattığı çevre kirliliği ve doğal bakteriyel antagonist ajanlarla biyolojik kontrol sağlamanın öneminden dolayı *Bacillus* bakterileri bu bakımdan ciddi potansiyele sahiptir ve bitki hastalıklarını baskılayan birçok antibiyotik üretmektedirler (Hiraoka ve ark. 1992, Stabb ve ark. 1994, Milner ve ark. 1996). Bunun yanı sıra, balık üretim merkezlerindeki ciddi ticari kayıplara karşı da, *Bacillus*' ların ürettiği antibiyotikler kullanılıyor (Sugita ve ark. 1998). Ayrıca birçok mantar ve mayanın neden olduğu hastalıklarla, mantarların neden olduğu bazı bitki hastalıklarında mücadelede *Bacillus*' lar tarafından üretilen antibiyotikler kullanılmaktadır. *Bacillus*' ların diğer bir özelliği de çeşitli böceklere karşı etkin bakteriyel kontrol ajanı olmalarıdır. *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus larvae* ve *Bacillus popillae*, Lepidoptera larvalarına patojenik etki göstermektedirler (Rosovitz ve ark. 1998).

Bacillus suşlarının antibakteriyel aktivite gösterdiği Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler arasında *Yersinia enterocolitica*, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus* (Chatterjee ve ark. 1992, Aslım ve ark. 2002), *E. coli* (Perez ve ark. 1992, Aslım ve ark. 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (Perez ve ark. 1992) ve *Micrococcus luteus* (Perez ve ark. 1993) gibi patojen bakterilerin olduğu bildirilmiştir.

Genellikle antibakteriyel ajan olarak kullanılan *Bacillus*' lar ayrıca antifungal (Milner ve ark. 1995, Leifert ve ark. 1995, Kajimura ve ark. 1995), antiviral (Vollenbroich ve ark. 1997, Steller ve ark. 1998), antiamöbitik (Galvez ve ark. 1994) ve anti-mikoplazma (Peypoux ve ark. 1999) ajanı olarak da kullanılabilen geniş bir antimikrobiyal aktiviteye de sahiptirler.

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 (Pollack 2002). Bu nedenle, Birçok *Bacillus* türünün sahip olduğu biyokontrol aktivitesi, ilaç endüstrisi için önem taşımaktadır.

Genel olarak mikroorganizmalardan yüksek oranda antibiyotik üretimi için, üretim ortamlarının değiştirilmesi yoluna gidilmektedir. Özellikle antibiyotik üretiminin besiyeri pH' sına ve besiyerindeki besin maddelerine bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Leifert ve ark. 1995). Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalarda spor oluşumu ve antibiyotik üretimi arasında doğrudan veya dolaylı olarak bir ilgini olduğu ifade edilmektedir (Nam ve Ryu 1985).

Bu çalışmada kendi doğal kaynaklarımızdan anitibiyotik potent bakterilerin izole edilmesi, bunlar içinden *Bacillus* sp.' lerin saptanması ve en büyük inhibisyon zonu gösteren bir adet *Bacillus* sp. bakterisinin 6 farklı sıvı üreme ortamında üretilerek antibiyotik üretim kapasitesinin ve antibiyotik üretimi ile sporulasyon arasındaki ilişkinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Seçilen üreme ortamında farklı pH değerlerinin, karbon kaynağı olarak kullanılan glukoz ve azot kaynağı olarak kullanılan yeast ekstraktın farklı konsantrasyonlarının antibiyotik üretimi üzerine etkileri araştırılacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Antibiyotiklerin Tarihçesi

Yunanca’ da anti=karşı, biyos=yaşam anlamına gelen ve 1889 yılında Lous Pasteur’ un öğrencisi Paul Vuillemin tarafından bu kelimeler birleştirilerek türetilen antibiyotik kelimesi, yaşama karşı anlamına gelmektedir (Awais ve ark. 2007).

Eski Mısırlılar, Çinliler ve Orta Amerika yerlileri enfekte yaraların tedavisinde küfleri kullanmışlardır, fakat onlar küflerin antibakteriyel özellikleri ve hastalıkların tedavisi arasındaki ilişkiyi o zamanlar anlayamamışlardır. Yapılan araştırmalar 2500 yıl önce Çinlilerin, küflü soya fasülyesinden yapılan ilaçları tedavi amacıyla kullandıklarını göstermektedir.

1800’ lü yılların sonlarına doğru antibiyotik araştırmaları yapılmaya ve hastalığa sebebiyet veren bakterileri yok etmek için ilaçlar geliştirmeye başlanmıştır.

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

1890’ lı yıllarda Alman doktorlar Rudolf Emmerich ve Oscar Löw, *Pseudomonas aeruginosa*’ dan elde ettikleri ve Pyocynase olarak adlandırdıkları ilk etkili ilacı yapan araştırmacılarıdır. Bu ilaç, hastanelerde kullanılan ilk antibiyotik olmuştur, fakat genellikle istenilen etkiyi gösterememiştir (Emmerich ve Löw 1899).

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

1928 yılında Sir Alexander Fleming *Staphylococcus aureus* kolonilerinin, bir küf olan *Penicillium notatum* tarafından üremelerinin engellendiğini gözlemlemiştir. Bu mantarın kültür filtratları, deneysel enfeksiyonlarda birçok bakteriye karşı güçlü biçimde etkin bulunmuş ve Fleming, üreyen küf mantarlarının *Penicillium* türünden oluşundan esinlenerek etkili maddeye penisilin adını vermiştir (Derderian 2007).

1932 yılında Klarer ve Mietzsch adlı araştırmacılar birçok azo boyasının patentini almış, içlerinde Prontosil' in de bulunduğu bu maddelerin *in vitro* deneylerde antibakteriyel özellik göstermediklerini bildirmişlerdir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Prontosil>, 2012).

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

1940 yılında Oxford Üniversitesi Tıp Fakültesinden Florey, Chain ve Abraham penisilin konusu ile yeniden ilgilenmeye başlamış, bu antibiyotığın farelerde oluşturulan streptokok enfeksiyonlardaki yüksek etkinliğini deneysel olarak kanıtlamış ve sonuçlarını 1940'da yayınlamışlardır (Manson ve Pollocmk 1953).

1942 yılında penisilinler klinikte denenmeye başlanmıştır ve bu yıla kadar sülfonamidler antibakteriyel kemoterapinin en etkili ilacı olarak yaygın biçimde kullanılmıştır. Diğer yandan aynı yıl içerisinde, Penisilin G Procaine üretim işlemi Howard Walter Florey ve Ernst Chain tarafından keşfedilmiştir ve günümüzde ilaç olarak kullanılmaktadır. Fleming, Florey ve Chain, 1945 yılında penisilin üzerindeki çalışmalarından dolayı tıp alanında Nobel ödülünü paylaşmışlardır (<http://en.wikipedia.org/wiki/Penicillin>, 2012)

1943 yılında Amerikan mikrobiyolog Selman Abraham Waksman, *Streptomyces griseus* kültürlerinden, aminoglikozidler olarak adlandırılan ilaçların yeni bir sınıfı olan streptomisini elde etmiştir. Streptomisin, yan etkileri fazla olmasına rağmen tüberküloz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Kresge ve ark. 1942).

Diğer yandan, ikinci dünya savaşını izleyen yıllarda, geniş insan kitlelerine yayılan tüberküloz hastalığının denetim altına alınmasında büyük katkısı olan streptomisin,

özellikle gram negatif mikroorganizmalarda ve *Mycobacterium*' larda giderek artan direnç gelişmelerine yol açmıştır ve böylece daha dar alanlarda daha bilinçli olarak kullanılmaya başlanmıştır.

1947 yılında Amerika' da *Bacillus polymyxa* kültürlerinden, Polimyxin adı verilen ve daha çok gram-negatif mikroorganizmalara etkili olduğu bilinen bir madde elde edilmiştir (Stansly ve ark. 1947). Aynı madde İngiltere'de Aerosporin adıyla yayımlanmıştır (Ainsworth ve ark. 1947).

1950 yılında Japonya'da *Bacillus colistinus* kültürlerinden elde edilen ve Colistin adı verilen yeni bir madde elde edildiği bildirilmiştir ve Gram-negatif bakterilere karşı etkili bir ilaç olarak klinikte kullanılmaya başlanmıştır (Kumazawa ve Yagisawa 2002).

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

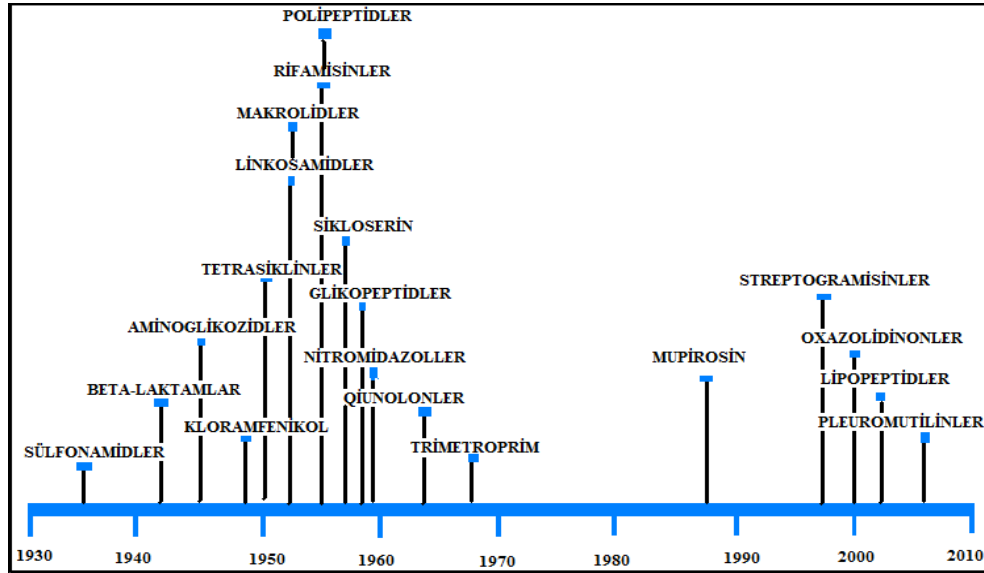
1957 yılında Umezawa ve arkadaşları *Streptomyces kanamyceticus* kültürlerinden kanamycin adını verdikleri bir aminoglikozidi elde etmişlerdir (Umezawa 1958). Bu aminoglikozid *Pseudomonas* ve *Bacteroides* grupları dışında kalan diğer gram-negatif bakterilere karşı çok etkili, *Staphylococcus aureus* dışındaki gram-pozitif bakterilere karşı etkisiz, *Mycobacterium tuberculosis*' e karşı etkili olduğu ifade edilmektedir (Kumazawa ve Yagisawa 2002). Diğer yandan aynı yıl içerisinde Nystatin adlı antibiyotiğin patenti alınmış ve birçok fungal enfeksiyonlara karşı kullanıldığı ifade edilmiştir.

1963 yılında Weinstein ve arkadaşları *Micromonospora purpurea* kültürlerinden, aminoglikozid grubuna ait yeni bir antibiyotik olan Gentamicini izole etmişlerdir (Weinstein ve ark. 1963). Gentamisin uzun yıllardır gram-negatif bakteri enfeksiyonlarına karşı kullanılmaktadır. 1970 yılında Preston ve Wick, *Streptomyces tenebrarius* kültürlerinden Nebramisin diğer adıyla tobramisin adı verilen aminoglikozid grubuna ait yeni bir antibiyotik izole etmişlerdir. 1974 yılında kullanım alanına giren bu antibiyotiğin etki spektrumunun Gentamicin' e benzediği bildirilmektedir (Preston ve Wick 1971).

1972 yılında Kawaguchi ve arkadaşları aminoglikozid grubundan ilk sentetik ürün olan Amikacin' i tıp dünyasına tanıtmışlardır. Kanamycin A'dan üretilen ve 1977 yılında genel kullanıma giren Amikacin, *Pseudomonas*, *Providencia* ve indol pozitif *Proteuslar*' ı da içine alan geniş bir gram-negatif mikroorganizma spektrumuna karşı en etkili aminoglikozid olarak tanımlanmıştır. Amikacin' in adenilat, asetat ve fosforilat gibi, aminoglikozidleri inaktive eden enzimlere dayanıklı olduğu için, gentamycin ve tobramycin'e direnç kazanmış gram-negatif bakterilere karşı da çok etkili olduğu ifade edilmektedir (Kwaguchi ve Nakagawa 1978).

1981 yılında Smith Kline Beecham, semisentetik antibiyotik olan Amoxicillin ya da amoxicillin/clavulanate potasyum tabletlerinin patentinin alındığı ve ilk olarak 1998 yılında Amoxicillin, Amoxil ve Trimox ticari adı altında satışa sunulduğu bildirilmektedir (<http://en.wikipedia.org/wiki/GlaxoSmithKline#History>, 2012).

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



Şekil 2.1. 1930 ve 2010 yılları arasında kullanılan antibiyotik sınıfları (www.rff.org/RFF/Documents/ETC-06.pdf, 2008)

2.2. Mikrobiyal Metabolitler

Canlı mikroorganizmalarda gerçekleşen metabolizma sonucunda ortaya çıkan ürünler mikrobiyal metabolitler olarak adlandırılmaktadır. Bu metabolitler primer (birincil) ve sekonder (ikincil) olmak üzere iki grupta incelenmektedir.

2.2.1. Primer metabolitler

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

Primer Metabolitler
Etanol
Sitrik asit
Aseton ve bütanol
Amino asitler
Vitaminler

Çizelge 2.1. Primer metabolitlere örnekler

2.2.2. Sekonder metabolitler

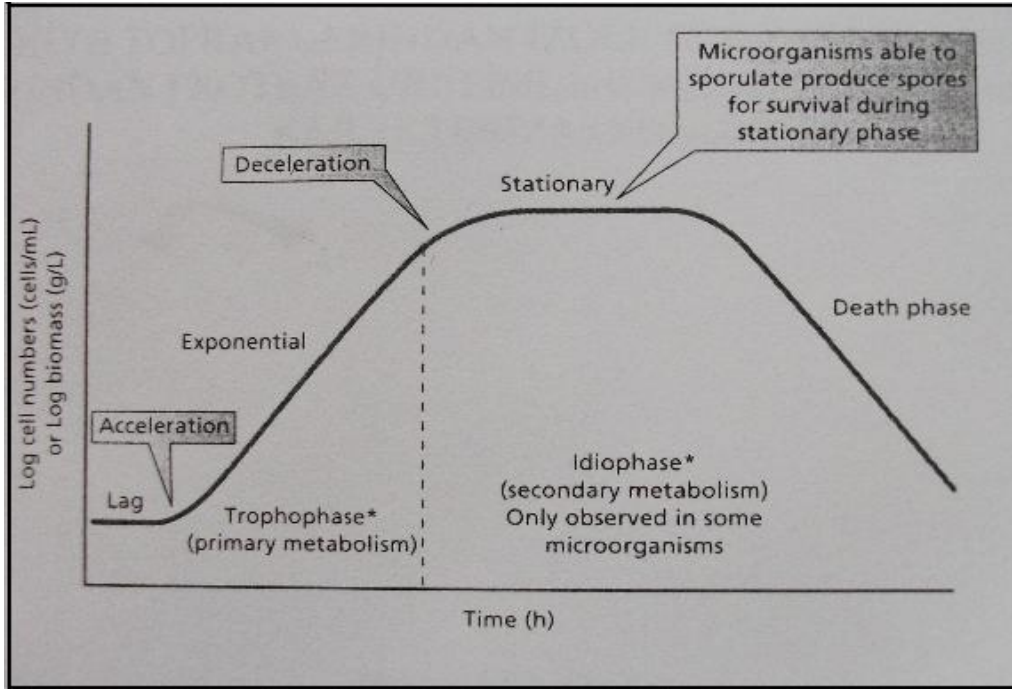
Ortamda bulunan bir veya daha çok esas nutrientin tüketilmesi ile büyüme durduğunda, mikroorganizma idiofaz denen üretim periyoduna (bkz. Şekil 2.2) girmekte ve bu fazda üretilen ürünler sekonder metabolitler olarak adlandırılmaktadır (bkz. Çizelge 2.2). Sekonder metabolitlerin sentezinde hem yapısal hem de düzenleyici genler hizmet etmektedir (http://www.ensymm.com/pdf/ensymm_fermentation_abstract.pdf, 2005).

Sekonder Metabolitler
Antibiyotikler
Enzim inhibitörleri
Toksinler

Çizelge 2.2. Sekonder metabolitlere örnekler

Sekonder metabolitlerin primer metabolitlerden farklı özellikleri bulunmaktadır. Bunlar:

1. Az organizma tarafından sentezlenir.
2. Üreme ya da gelişme için gerekli değildirler.
3. Sentezleri üreme şartlarına bağlıdır, indüklenebilir.
4. Birkaç ara üründen üretilir.
5. Çok miktarlarda üretilmesi mümkündür.



Şekil 2.2. Mikroorganizmalarda üreme eğrisi (Waites 2006).

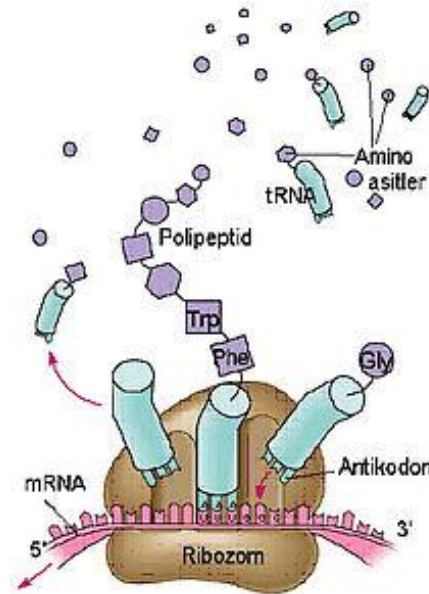
2.3. Antibiyotik Üretim Mekanizmaları

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

2.3.1. Ribozomal sentez mekanizması

Biyolojik aktiviteye sahip oligo ve polipeptid yapısındaki antibiyotiklerden bir kısmı ribozomal sentez mekanizması tarafından üretilmektedir. Bu sentez normal protein sentezidir ve ribozomal mekanizma yardımıyla antibiyotiklerin üretilmesidir (bkz. Şekil 2.3).

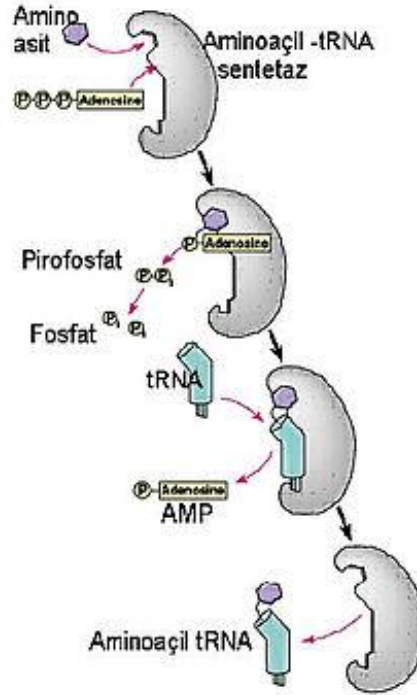
Ribozom, protein sentezinin yapıldığı mRNA ile tRNA' lar arasındaki bağlantının kurulduğu organeldir. Büyük ve küçük alt birim olmak üzere iki kısımdan meydana gelmekte ve protein sentezi sırasında birleşmektedirler. Her bir ribozomda bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Polipeptide eklenmek için bekleyen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



Şekil 2.3. Ribozomal sentez (http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_biyosentezi, 2012)

Ribozomlarda protein sentezi birkaç aşamada gerçekleşir;

1. Aktivasyon aşaması: Her bir amino asidi tRNA' ya bağlayan 20 çeşit aminoasıl-tRNA sentetaz enzimi bulunmaktadır. Bu enzimin aktif yüzeylerinden birine önce amino asit ardından ATP, AMP' ye dönüşerek amino aside ve sonra enzime bağlanır. Daha sonra amino aside özgü tRNA enzime bağlanır ve amino asitle tRNA arasında bir bağ oluşur. Bu sırada AMP de açığa çıkar. tRNA ile birleşen amino asit, enzimden serbest bırakılarak sitoplazmaya geçer (bkz. Şekil 2.4).

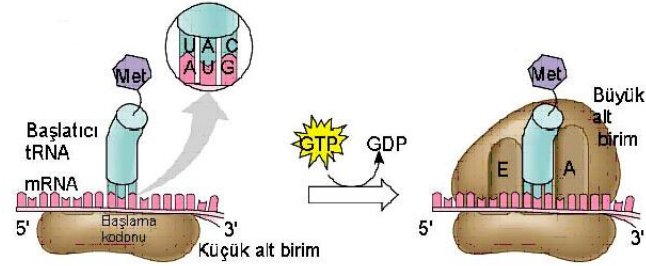


Şekil 2.4. Ribozomal peptid sentezinde aminoasitin aktivasyon aşaması

(http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_biyosentezi, 2012)

2. Başlama aşaması: DNA' yı kaynak olarak kullanan RNA polimeraz enzimi tarafından üretilen mRNA molekülü, IF (Initiation Factors) proteinlerinin yardımıyla önce ribozomun küçük alt birimine bağlanır. Daha sonra mRNA 5' ucundan okunmaya başlar. AUG kodonu protein sentezini başlatıcı kodondur. Bu kodona Met-tRNA (bakterilerde fMet-tRNA) molekülü bağlanır. Daha sonra ribozomun büyük alt birimi

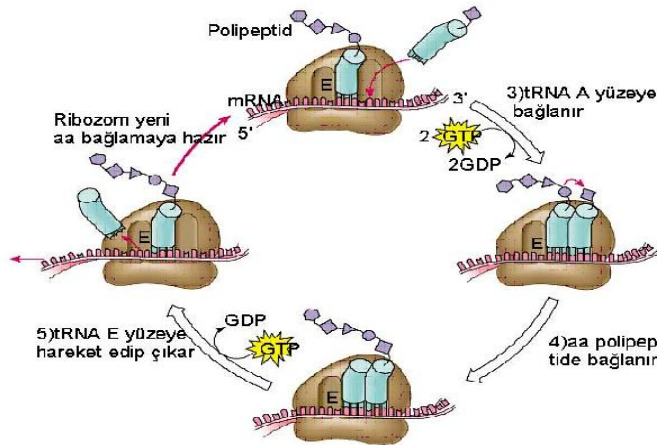
ile küçük alt birimi birleşir ve protein sentezi ilerler. Gerekli olan enerji GTP'den sağlanır. Başlatıcı kodona uyan tRNA, ribozomun P bölgesine yerleşerek A bölgesine kodona uygun yeni bir aminoasit-tRNA gelmesi beklenir (bkz. Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Ribozomal peptid sentezinde başlama aşaması

(http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_biyosentezi, 2012)

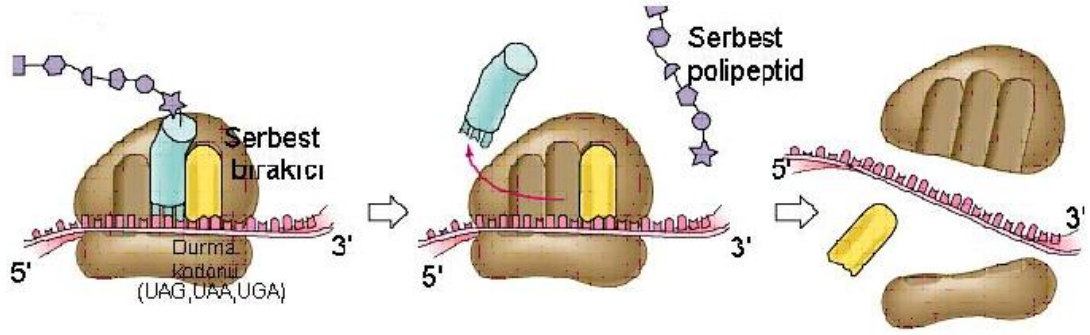
3. Uzama aşaması: Ribozomun A yüzeyine uygun antikodona sahip tRNA gelir ve hidrojen bağlarıyla kodona bağlanır. Bu sırada 2 molekül GTP harcanır. İkinci basamakta P yüzeyde bulunan polipeptid, A yüzeyine gelen amino asit ile birleşecek biçimde ortama aktarılır. Ribozom, mRNA üzerinde 3' yönüne doğru hareket ederek A yüzeyinde bulunan tRNA ile birlikte polipeptidi P yüzeyine aktarır. P yüzeyinde bulunan tRNA ise E yüzeyine geçerek ribozomdan uzaklaştırılır. Enerji GTP'den sağlanır. Ribozom, mRNA üzerinde 5'→3' yönünde hareket eder (Translokasyon) (bkz. Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Ribozomal peptid sentezinde uzama aşaması

(http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_biyosentezi, 2012)

4. Sonlanma ve ribozomlardan bırakılma aşaması: Uzama, mRNA üzerinde durma kodonlarına kadar devam eder. A yüzeyine serbest bırakıcı faktörler geldiğinde okuma sonlanır. Bu faktörlerin A yüzeyine gelebilmesi için mRNA'daki kodonun UAG, UAA veya UGA şeklinde olması gerekir. Hidroliz enzimleri yardımıyla P yüzeyinde bulunan polipeptit serbest bırakılır. Böylece protein sentezi sonlanmış olur (bkz. Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Ribozomal peptid sentezinde sonlanma ve ribozomlardan bırakılma aşaması (http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_biyosentezi, 2012)

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 oluşmaktadır (Nelson 2000). Ribozomal yolla sentezlenen antibiyotiklere örnekler Çizelge 2.3' te dir.

Antibiyotik	Mikroorganizma
Subtilin	<i>Bacillus subtilis</i>
Ericin	<i>Bacillus subtilis</i>
Mersacidin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Sublancin	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisin	<i>Bacillus subtilis</i>

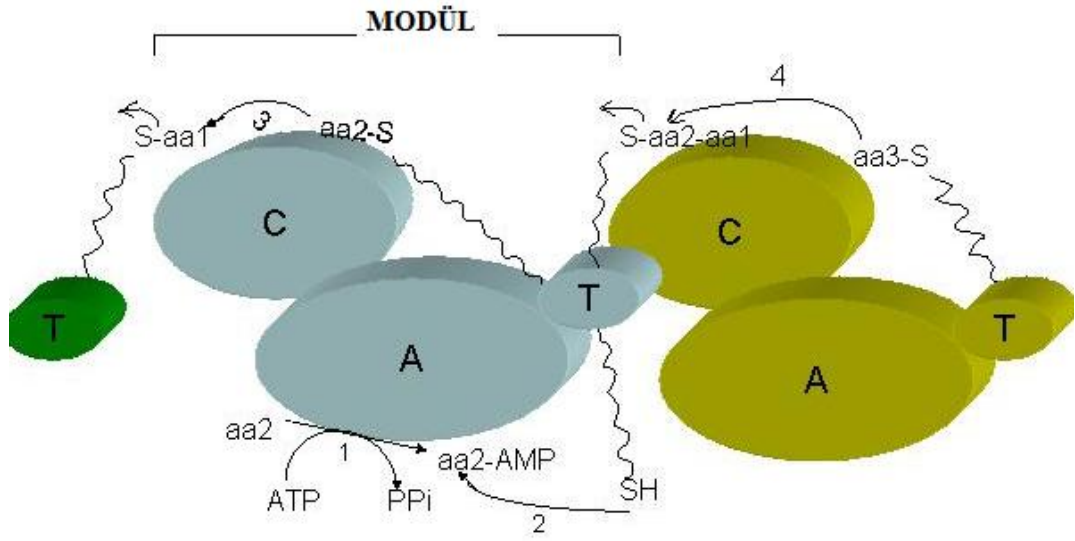
Çizelge 2.3. Ribozomal yolla sentezlenen bazı antibiyotikler (Stein 2005)

2.3.2. Nonribozomal sentez mekanizması

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

Nonribozomal Peptid Sentetazlar domainlerden oluşmuş büyük multi-fonksiyonel enzimlerdir ve bu domainler; Adenilasyon (A), Tiyolasyon (T) ya da peptidil taşıyıcı protein (PCP) ve Kondensasyon (C) olarak adlandırılmıştır. Bunların dışında Nonribozomal Peptid Sentetazlar, yeni sentezlenen peptidin salınmasında görev yapmakta olan Tiyoesteraz (TE) ve L-’yi D-amino asite çevirme görevini üstlenen Epimeraz (E) domaini de içerebilmektedirler.

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

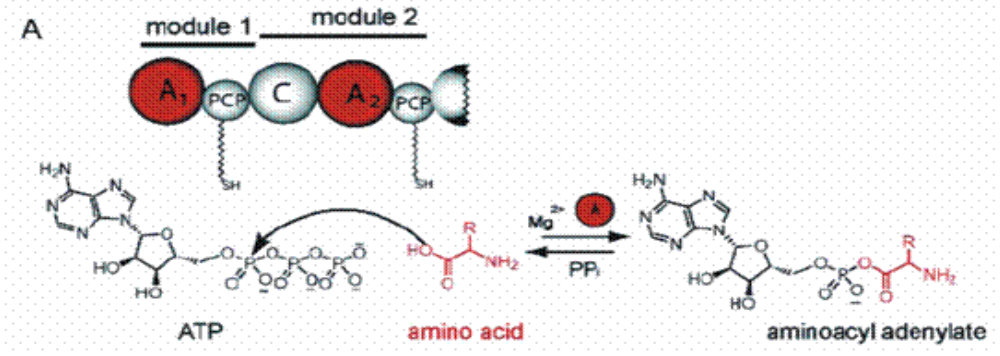


Şekil 2.8. Nonribozomal peptid sentetazlarda modüller (<http://linux1.nii.res.in/~zeeshan/nrps.html>, 2012)

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

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

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

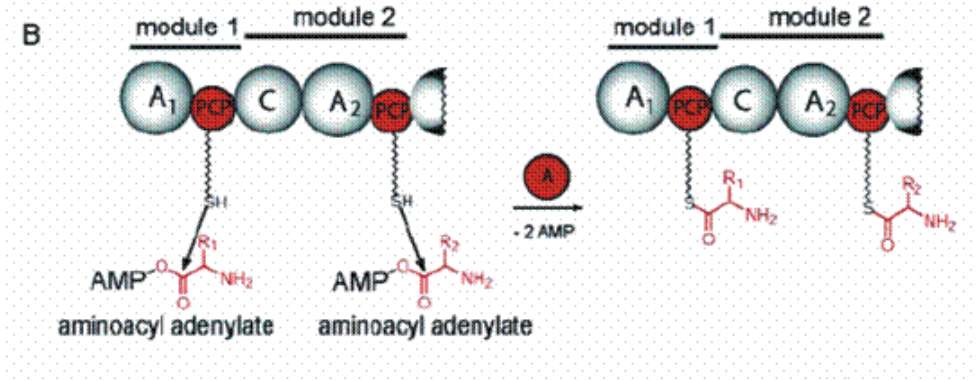


Şekil 2.9. Aminoasitin aktivasyon aşaması (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/koumoutsis-alexandra-2006-12-04/HTML/chapter1.html>, 2012)

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

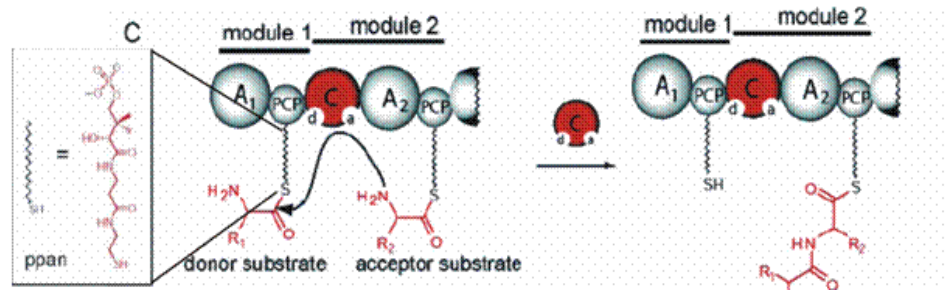
Peptid bağı oluşumu kondensasyon (C) bölgesinde gerçekleşmektedir. Aminoasit, fosfopantotein grubunun ileri geri salınım yapan kolu yardımıyla bir kondensasyon bölgesindeki alıcı konumuna taşınmakta ve bir önceki modülün fosfopantotein taşıyıcısı tarafından verici konumuna yerleştirilmiş olan aminoasit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

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

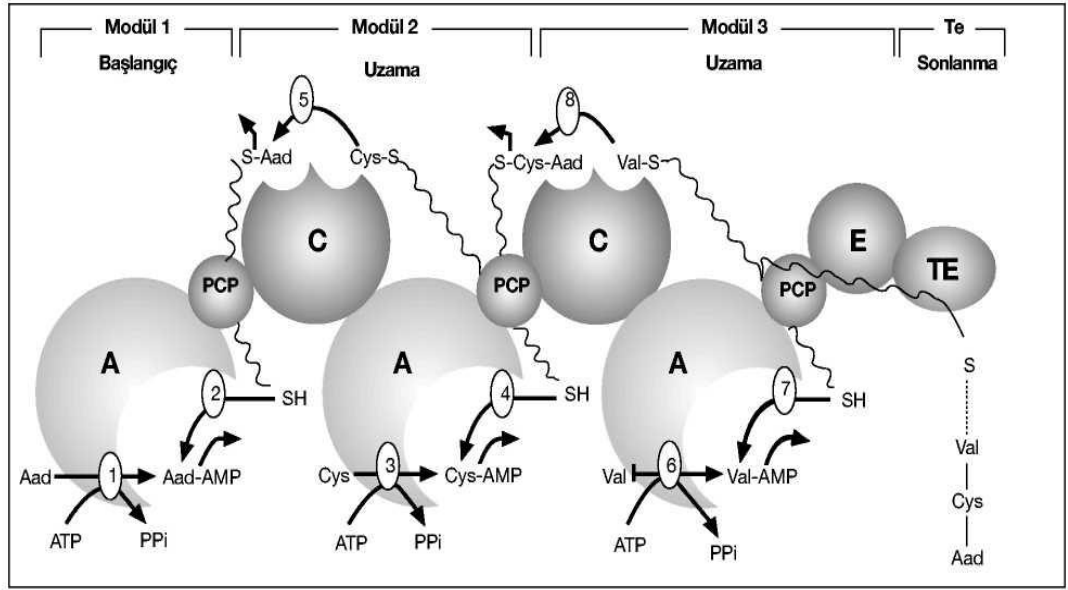


Şekil 2.10. Başlama ve uzama aşaması (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/koumoutsis-alexandra-2006-12-04/HTML/chapter1.html>, 2012)

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



Şekil 2.11. Sonlanma aşaması (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/koumoutsis-alexandra-2006-12-04/HTML/chapter1.html>, 2012)



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

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

Nonribozomal yolla sentezde işlev gören multi enzimleri kodlayan genler, besinsel strese yanıt olarak transkripsiyonel seviyede düzenlenmektedir. Sporulasyonda görev alan *Spo0A* geninin ürünü olan Spo0A regülatör proteini tarafından kontrol edilmektedir. Ayrıca logaritmik fazın sonuna doğru üç regülatör (Spo0H, ComA, DegU) proteinin de antibiyotik üretimini etkilediği ifade edilmektedir (Marahiel ve ark. 1993).

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

Çizelge 2.4. Nonribozomal yolla sentezlendiği gösterilen bazı antibiyotikler (Büber ve Açıan 2004)

2.4. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

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

2.4.1. Antibiyotiklerin etki güçlerine göre sınıflandırılması

Antibiyotikler mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre iki farklı gruba ayrılmaktadırlar. Bunlardan birincisi statik (durdurucu) etkili olanlardır (bakteriyostatik/fungostatik vb.). Bunlar mikroorganizmaların üremelerini

durdurmaktadır. Tetrasiklinler, sülfonamidler ve makrolidler bu sınıfa girmektedirler. Bunların ikinci grubu ise sidal (öldürücü) etkili olanlardır (bakteriyosidal/fungusidal vb.) ve mikroorganizmaları öldürerek yok etmektedirler. Penisilin, Sefalosporin gibi beta-laktamlar, Vankomisin ve Rifamisinler bu gruba girmektedirler.

2.4.2. Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre 5 farklı şekilde sınıflandırılmaktadır.

1. Bakteri hücre duvar sentezini inhibe ederek ve otolitik (bakteri hücrelerini parçalayan) enzimleri aktive ederek etki gösteren antibiyotikler: Penisilinler, Basitrasinler, Sefalosporinler ve Vankomisinler bu grup içerisinde yer almaktadırlar.

2. Hücre zarı işlevini bozarak etki eden antibiyotikler: Bunlar hücre zarının geçirgenliğini arttırıp sitoplazma içindeki genellikle aminoasit, nükleotitler gibi bileşiklerin dışarı çıkmasına ve dolayısıyla mikroorganizmanın ölümüne sebep olurlar. Polimiksinler, Amfoterisin B ve Gramisidin bu grupta yer almaktadırlar.

3. Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek etki gösteren antibiyotikler: Aminoglikozidler ve Tetrasiklinler ribozomların protein sentezi sırasında kullandıkları 30S bölgelerine tutunarak; Eritromisin, Klindamisin ve Kloramfenikolün ribozomların protein sentezi sırasında kullandıkları 50S bölgelerine tutunarak protein sentezini durdurmaktadırlar.

4. Bakterilerin DNA ve RNA sentezini (nükleik asit sentezini) bozarak etki eden antibiyotikler: Bu grupta yer alan Rifamisinler, DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enziminin β alt birimine bağlanarak mRNA sentezini engellemektedirler. Rifamisin dışında, Kinolonlar, Metronidazoller ve Nitrofurantoinler de bu grupta bulunmaktadır.

5. Bakteriyel antimetabolitler denilen ve intermedier metabolizmayı bozan antibiyotikler: Bunlar yapıcı substratlara benzerler ve enzimlerin üzerindeki etkin yerler için onlarla yarışarak bakterilerin metabolizması için gerekli bazı maddelerin yapısını bozarlar. Sülfonamidler, Sülfonlar, İzoniazid, Trimetoprim ve Ethambutoller bu grupta yer almaktadırlar.

2.5. Antibiyotik Üreten Mikroorganizmalar

Antibiyotikler daha çok Bacillaceae, Actinomycetales ve Mycophyta grubundaki canlılar tarafından üretilmektedir. 1990' larda mikroorganizmalardan yılda 200-300 yeni biyoaktif ürün elde edilirken, 1997' de bu rakamın 500 olduğu bildirilmektedir (Demain 1999). Buna rağmen, sürekli olarak yeni antibiyotiklerin keşfedilmesi beklenmekte ve bu sebeple de *Streptomyces*, *Bacillus*, *Tolypocladium*, *Fusarium*, *Mycobacterium*, *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi birkaç cinse ait türler antimikrobiyal madde üretme yetenekleri bakımından doğadan incelenmektedirler. Bunlar arasında yer alan *Bacillus* türleri, antibiyotik üretme kapasitesi yönünden en çok incelenen organizmalar arasına girmiştir (Perez ve ark. 1993, Eltem ve Uçar 1998).

2.5.1. *Bacillus* Hakkında Genel Bilgiler

Bacillaceae familyası içerisinde *Bacillus* ve *Clostridium* olmak üzere iki ana alt grup bulunmaktadır (Garrity 2004). Başlangıçta *Bacillus* türleri arasında yer alan bazı bakteriler, DNA yapılarındaki G+C oranlarına göre ayrı cinsler olarak tanımlanmıştır. Bunlar; *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus* ve *Halobacillus* cinsleridir. Son sınıflandırma ile *Bacillus* grubu içerisinde 50 geçerli tür kalmıştır. Burada en iyi bilinen türler ise *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. sphaericus* ve *B. thuringiensis*' tir. Bunların rRNA dizilişlerine bakılarak üç tür *Bacillus* ana grubu belirlenmiştir. Bunlar; “*B. subtilis*” grubu, “*B. cereus*” grubu ve “*B. circulans*” grubudur (Logan ve Turnbull 1999).

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

Bacillus hücreleri çubuk şeklinde ve düz, 0,5-2,5 µm eninde 1,2-10 µm boyundadırlar, uçları yuvarlak ya da kare şeklindedir ve ortamda bazen çiftler ya da zincirler halinde bulunurlar. Hepsi Gram (+) olmakla beraber, yaşlı kültürlerde Gram (-) olarak da görülebilirler. *Bacillus*' lar peritriköz kamçıya sahip ve hareketlidirler. Hepsi endospor oluşturmaktadırlar. Endosporlar bazen oval, bazen yuvarlak ya da silindirik şekilde olabilirler. Birçok zorlu koşula karşı dirençlidirler. Bu cinste yer alan bakteriler hem aerobik hem de fakültatif anaerobik koşullarda üreyebilmektedirler. Sıcaklık, pH ve tuzluluğa karşı yüksek fizyolojik yetenekleri nedeniyle bunlara karşı toleransları vardır. Gelişebildikleri minimum sıcaklık derecesi 25°C ila 75°C arasındadır. Üreyebildikleri minimum pH bazı asidofilik karakterli türler için 7,5 ila 8,0' e kadar çıkmaktadır. Katalaz pozitif ve fermentatif ya da oksijenli solunum gösteren bir metabolizmaya sahip organotrofturlar. Kolayca kültüre alınabilirler ve yapılarında heterojenlik bulunmamaktadır (Holt ve ark. 1994). Bu grupta bulunan türlerin çoğu nutrient agarda kolayca üreyebilmektedirler (Ayhan 2000). *Bacillus*' ların, rutin besi yerlerindeki koloni morfolojisi bakteri türüne göre farklılıklar göstermektedir.

Koloniler genellikle 1-6 mm arasında dalgalı veya saçaklı kenarlı olmaktadır. *Bacillus*' ların alt tür düzeyinde tanımlanmaları, ancak bakteri morfolojisinin belirlenmesi, biyokimyasal ve fizyolojik testlerin yapılması ile mümkün olabilmektedir.

Bacillus cinsi bakteriler; antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri sebebiyle, bakteriler arasında dikkat çeken mikroorganizmalardır (Rosovitz ve ark. 1998, Wipat ve Harwood 1999).

Bacillus' lar çok çeşitli metabolik özelliklerinin yanı sıra geniş fizyolojik yetenekleri ile de psikrofilikten termofiliğe; asidofilikten alkalifiliğe; halotoleranttan halofiliğe geniş bir yelpazeye sahiptir ve bu nedenle endüstriyel uygulamalarda kullanılma potansiyelleri yüksektir. Ayrıca sporlanma kabiliyetleri ve metabolizmal faaliyetlerinin çeşitliliğinin, geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağladığı da belirtilmektedir (Sneath 1986, Rosovitz ve ark. 1998).

Birçok biyoteknolojik çalışmada kullanılan *Bacillus*' lar, ürettikleri proteinler nedeniyle ticari öneme sahiptirler. *Bacillus*' ların ürettiği endüstriyel enzimlerden olan subtilisin,

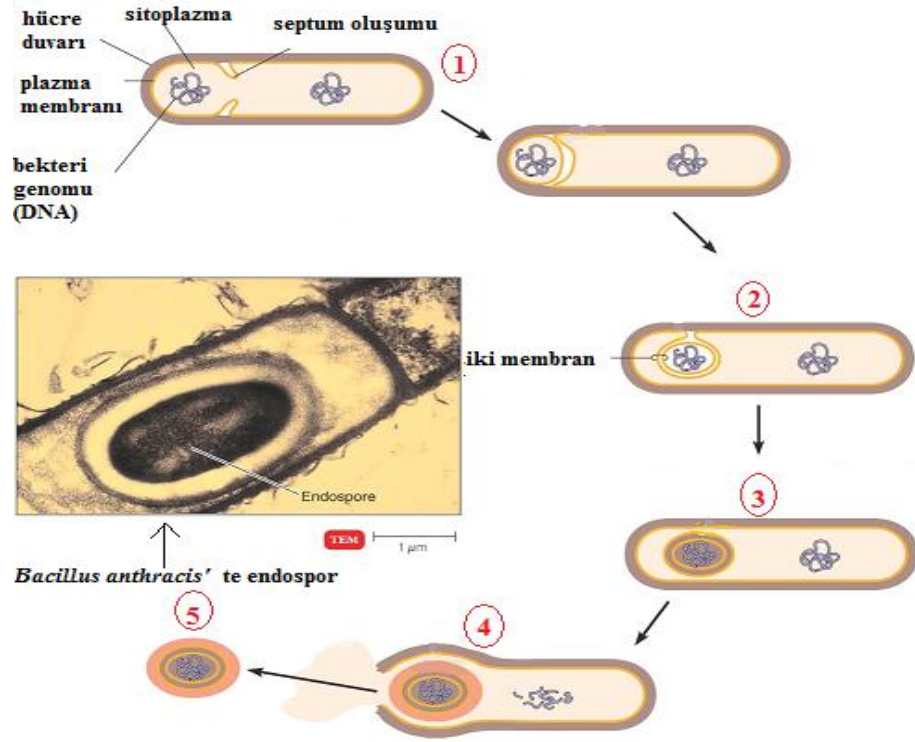
selulaz ve amilazlar deterjan endüstrisinde, nötral proteazlar süt endüstrisinde, farklı amilaz ve pullulanazlar besin ve meyve suyu endüstrisinde kullanılmaktadır. Bazı *Bacillus* türleri ise proteolitik, sakkarolitik ve lipolitik enzimleri nedeniyle besin endüstrisinde önem taşımaktadır (Rosovitz ve ark. 1998).

2.5.2. *Bacillus*' larda spor oluşumu

Endospor, *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinde meydana gelen metabolik aktivitelerinin durduğu ve geçici bir süre uykuya yattıkları form olarak tanımlanmaktadır. Optimum ortam koşulları kaybolduğunda dış etkenlere karşı daha dirençli form olan endosporlar oluşmakta ve uygun ortam koşulları tekrar sağlandığında spor çimlenerek vejetatif hücreyi meydana getirmektedir. Bacillaceae familyasında yer alan *Bacillus* türlerinin en önemli özelliklerinden biri büyüme evresinin durgun fazında besin maddelerinin azalmasına bağlı olarak kaybolan optimum ortam şartlarında endospor oluşturmalarıdır (Tunail 2009).

Spor oluşumu karmaşık, yaklaşık 10 saatlik bir değişim sürecidir ve bu süreçte birbirini izleyen evreler şu şekilde sıranabilmektedir (bkz. Şekil 2.13);

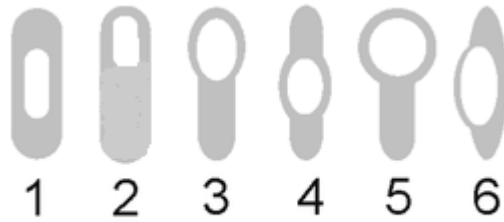
1. Vejetatif hücrenin protoplazma membranı, içeriye doğru karşılıklı girinti yapar ve bir septum oluşur. Hücre DNA' sının bir kısmı bu yeni oluşum (ön spor) içinde kalır.
2. Hücre protoplazması ön sporu sararak içine alır ve ikinci membranı oluşturur.
3. İki membran arasında spor duvarı ve korteks gelişir.
4. Ana hücre tarafından korteksin dışında bir protein ceket oluşturulur.
5. Lizis ile olgun spor serbest kalır.



Şekil 2.13. Sporulasyon aşamaları

(<http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap04/lecture8.htm>, 2012)

Endospor oluşturan *Bacillus* cinsindeki endospor formları ve pozisyonları çeşitlilik göstermektedir. Silindirik, elipsoidal, oval veya yuvarlak şekillerde olabilmektedir. Ayrıca, sporlar hücre içerisinde sentral (ortada) ya da terminal (uçta) olarak yerleşebilir (bkz. Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Bakterilerde görülen spor tipleri. 1-4 Merkezi, 2-3-5 Terminal, 6 Lateral endosporlar (<http://en.wikipedia.org/wiki/Endospore>, 2012)

Bacillus sporları sıcaklığa vejetatif hücrelerden 10^5 kez, UV ışımaya 7-50 kez daha dayanıklıdır. Aynı zamanda, sporu çevreleyen membranlar, korteks ve spor paltosu gibi yapılarla çeşitli kimyasal ajanlara karşı direnç de geliştirilmiştir (Rosovitz ve ark. 1998).

2.5.2.1. Spor oluşumu ile antibiyotik üretimi arasındaki ilişki

Bacillus türlerinde besinsel stresler (açlık) hayatta kalma yeteneğini arttırmada birçok işlemlerin aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu aktivasyonlar genetik yetkinliğin gelişmesini, sporulasyonu, bazı parçalayıcı enzimlerin sentezlenmesini ve antibiyotik üretimini kapsamaktadır. Bu işlemlerdeki fonksiyonel genler logaritmik fazdan durağan faza geçiş sırasında aktive edilmekte ve bu genlerin transkripsiyonu başlangıç seviyesinde bazı mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir.

Sporulasyon veya çimlenme ile ilişkili olan, hormon veya sinyal moleküllerinin antibiyotik üretme aktivitesine neden olabileceği de ifade edilmektedir (Yılmaz ve Beyatlı 2003). Çünkü quorum sensing mekanizmasını kullanan canlılar, bu mekanizma ile sporulasyon (Miller ve Bassler 2001), biyofilm oluşumu, antibiyotik üretimi, patojenite faktörlerinin salgılanması gibi birçok fenotip QS mekanizmasıyla kontrol edilen davranışlar göstermektedir. Bu mekanizma ortamdaki hücre konsantrasyonuyla doğrudan ilişkilidir (Pierson ve ark. 1994, Wood ve ark.1997).

Birçok araştırma, peptid antibiyotik üreten *Bacillus* suşlarında sporulasyon sırasında meydana gelen fizyolojik değişikliklerin, antibiyotik üretimini düzenlediğini göstermektedir. Moleküler genetik çalışmalar, *Bacillus*' larda bazı peptid antibiyotik biyosentez genlerinin, endospor oluşumu olayını aktive eden operonda yer aldığını (Nam ve Ryu 1985, Marahiel 1992), polisistronik transkripsiyonel birimlerde yerleştiğini ve *Bacillus* hücreleri durağan faza ulaştıklarında gen ekspresyonunu yönlendiren tek bir düzenleyici sistem tarafından kontrol edildiğini göstermektedir (Klein ve ark. 1992, Mannanov ve Safiyazov 1996).

Bacillus türlerinin, geç logaritmik faz veya erken durağan fazda sekonder (ikincil) metabolit olarak antibiyotik üretme kapasitesinde olduğu ve sporulasyon olayı başladığında, antimikrobiyal madde üretimine de başladıkları ifade edilmektedir (Galvez ve ark. 1994, Milner ve ark. 1995, Wipat ve Harwood 1999).

Peptid antibiyotiklerin biyolojik rolleriyle ilgili bir çalışmada sporulasyon sırasında çoğu durumda antibiyotiklerin, bakteriyel üreme döngüsünün aynı noktasında ve sporlanmanın başladığı koşullar altında üretilmekte olduğunu göstermektedir (Nakano ve Zuber 1990). Başka bir çalışma, sporulasyon mutanti suşlarda antibiyotik aktivitesi olmadığını göstermiştir (Schaeffer 1969). Bu durum, paralel düzenleyici metabolik yolların varlığını açıklamaktadır. Fakat bu hipotez bazı bilim adamları tarafından kabul görmemiştir (Modest ve ark. 1984).

Peptid antibiyotik biyosentez genleri erken sporulasyon gen ürünleri olan Spo0A, geçiş-durum regülatörü AbrB ve yetkinlik gen ürünleri olan ComA, ComP ve ComQ gibi çeşitli faktörler tarafından düzenlenmektedir.

Spo0A, sporulasyonu düzenleyici (regülatör) proteinlerdir ve *Spo0A* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gen olumsuz çevresel koşullarda bir uyarıcının gelmesi ile aktive edilmektedir.

AbrB geni tarafından üretilen AbrB proteini sporulasyon ile durağan faz ve logaritmik faz arasındaki geçiş durumu boyunca sentezlenen genlerin represörüdür.

Hücre içindeki AbrB proteinlerinin konsantrasyonu, Spo0A proteini tarafından kontrol edilmektedir ve *AbrB* genleri çevresel koşullarda hücrel bir cevap olarak ifade edilmektedir.

AbrB vejetatif hücrelerde transkripsiyon regülatör genidir. Antibiyotik üretimi *AbrB* genlerinin negatif kontrolü altındadır. Spo0A'nın yokluğunda AbrB çok fazla üretilmekte ve birçok durağan faz genlerinin ifadesi inhibe edilmektedir.

2.6. *Bacillus*' lar Tarafından Üretilen Bazı Antibiyotikler

Bacillus antimikrobiyal aktivite açısından araştırılmış ilginç cinslerdendir, çünkü *Bacillus* türleri biyolojik aktiviteleri ile çok sayıda peptid üretmektedirler. *Bacillus subtilis* ve *Bacillus brevis*' ten 167 adet peptid antibiyotiğin üretildiği ifade edilmiştir. Bunlardan, 66 farklı peptid antibiyotik *Bacillus subtilis* suşlarından, 23 tanesi ise *Bacillus brevis*' ten elde edilmiştir (Berdy 1974). *Bacillus*' lar tarafından üretilen antibiyotiklerden bazıları Çizelge 2.5' te verilmiştir.

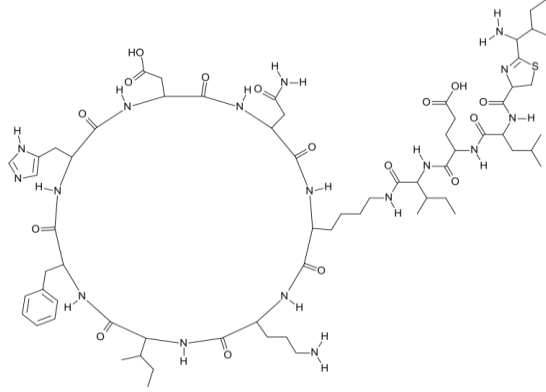
<u>BAKTERİLER</u>	<u>ANTİBİYOTİKLER</u>
<i>Bacillus cereus</i>	cererin, zwittermisin
<i>Bacillus thuringiensis</i>	tochisin
<i>Bacillus brevis</i>	gramisidin, tirosidin
<i>Bacillus circulans</i>	circulin
<i>Bacillus laterosporus</i>	laterosporin
<i>Bacillus licheniformis</i>	basitrasin
<i>Bacillus polymyxa</i>	polimiksin
<i>Bacillus subtilis</i>	subtilin, mikobacilin, bacilin, difficidin, fengisin
<i>Bacillus megaterium</i>	megasin
<i>Bacillus coagulans</i>	coagulin

Çizelge 2.5. *Bacillus*’ lar tarafından üretilen bazı antibiyotikler

2.6.1. Basitrasin

Basitrasin (bkz. Şekil 2.15), *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen siklik polipeptidlerin bir karışımıdır (Laland ve Zimmer 1984, Hughes ve Poole 1989, Azevedo ve ark. 1993). 12 aminoasitten oluşan peptid antibiyotik Basitrasin (Ishihara ve Shimura 1988), multifonksiyonel thiotemplate mekanizması ile nonribozomal olarak sentezlenmektedir. BA1, BA2 ve BA3 olmak üzere üç multifonksiyonel enzim Basitrasin sentezini katalizlemektedir.

Basitrasin özellikle gram pozitif bakterilerin hücre duvarı üzerine etkili olmaktadır. Hücre duvarı sentezi sırasında peptidoglikanın polimerizasyonunu inhibe etmektedirler. Bazı Gram pozitif ve basillere karşı etkili olan Basitrasin, *Enterobacter*’ ler ve *Pseudomonas*’ lara karşı etkisiz olmasına karşın, A grubu beta-hemolitik streptokoklar bu antibiyotiğe çok duyarlıdır ve bu bakterilerin identifikasyonunda Basitrasine duyarlılık aranmaktadır (Yücel ve ark. 1998, Drablos ve ark. 1999).



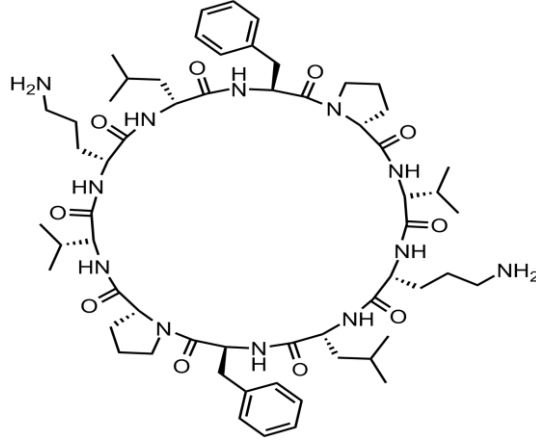
Şekil 2.15. Basitrasin (<http://www.fi.wikipedia.org/wiki/Tiedosto:Bacitracin.png>, 2012)

2.6.2. Gramisidin

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

B. brevis tarafından üretilen, küçük siklik peptidler olan Gramisidin (bkz. Şekil 2.16), thiotemplate mekanizması dediğimiz multienzimler aracılığıyla nonribozomal olarak sentezlenmektedir. Gramisidin' nin sentezi gramisidin sentetaz 1 (GS1) ve gramisin sentetaz 2 (GS2) olmak üzere iki enzimden oluşan çok fonksiyonlu enzim kompleksi olan gramisidin sentetaz tarafından katalizlenmektedir (Lipmann ve ark. 1986).

15 aminoasitten oluşan bu antibiyotiğin, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu bildirilmektedir (Agathos ve Demain 1988, Tunç 1995). Bakterilerin hücre duvarına karşı etkilidirler ve hücreleri hemolize uğratmaktadırlar. Özellikle bel soğukluğu (Gonore) hastalığına sebep olan *Neisseria* cinsine karşı etkili olduğu bildirilmektedir. Gramisidin, cerrahide yaraların temizlenmesinde ve jinekolojide de yaygın olarak kullanılmaktadır (Sarışeker 1983, Tunç 1995).



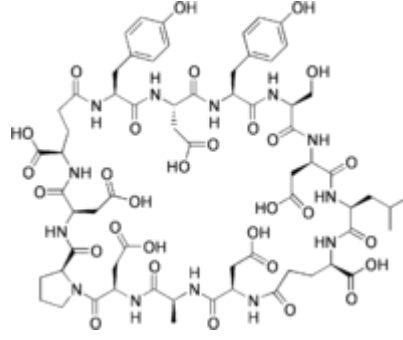
Şekil 2.16. Gramisidin (<http://www.usermeds.com/medications/gramicidin>, 2012)

2.6.3. Mikobasilin

1958 yılında ilk defa *B. subtilis* bakterisinden izole edilmiştir. 13 aminoasitlik antibiyotik olan Mikobasilin (bkz. Şekil 2.17) thiotemplate mekanizması dediğimiz multienzimler aracılığıyla nonribozomal olarak sentezlenmektedir. Mikobasilin sentezini katalizleyen enzim kompleksi üç bölümden oluşmaktadır:

1. A, ilk pentapeptidin sentezi sırasında düzenleyen,
2. B, nonapeptid sentezini katalizleyen ve
3. C, son ürünün sentezini katalizleyen.

Mikobasillin antifungal aktiviteye sahip olmakla beraber, hemolitik aktiviteye de sahip olduğu bildirilmektedir (Banarjee 1977).



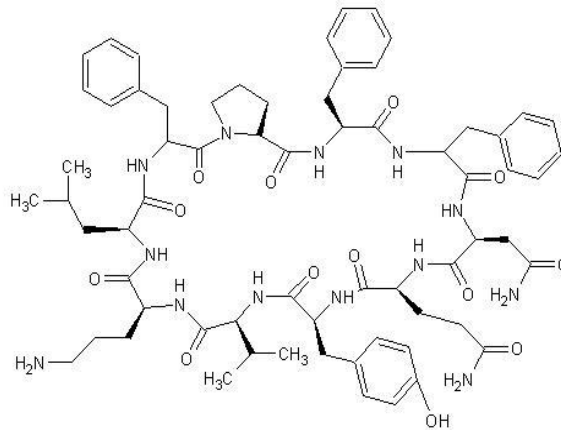
Şekil 2.17. Mikobasilin (<http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacillin>, 2012)

2.6.4. Tirosidin

Tirosidin, ilk defa 1939 yılında, *Bacillus brevis* kültüründen elde edilen, 10 aminoasitlik bir antibiyotiktir (bkz. Şekil 2.18).

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

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



Şekil 2.18. Tirosidin (<http://chem257.pbworks.com/w/page/15645836/Tyrocidine>, 2012)

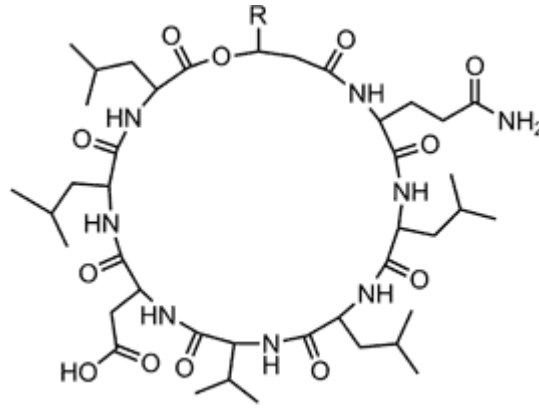
2.6.5. Sürfaktin

Sürfaktin, ilk olarak *B. subtilis* ATCC 1332 kültüründen izole edilen (Cooper 1981) ve 7 aminoasitten oluşan bir antibiyotiktir (bkz. Şekil 2.19). Nonribozomal sentez mekanizmasıyla sentezlenmektedir.

Sürfaktin güçlü bir biyosümfaktan olarak bilinir ve deterjan etkisi göstererek hücre membranının geçirgenliğini bozmaktadır. Sürfaktinin, suyun yüzey tansiyonunu 72' den 27,9 mN/m değerine düşürdüğü ifade edilmektedir (Desai ve Banat 1997).

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

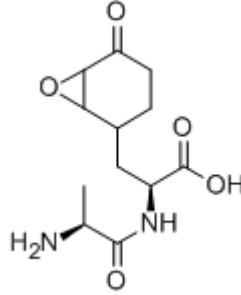
Sürfaktine ek olarak, *B. licheniformis*' den üretilen Lichenysin A, BL-86 ve *B. brevis* ve *B. polymyxa* tarafından oluşturulan biyosümfaktanlar olan, Gramisidinler ile Polimiksinlerin de dikkate değer yüzey aktif özellikleri olan moleküller olduğu ifade edilmiştir (Desai ve Banat 1997).



Şekil 2.19. Sürfaktin (http://www.acschemtox.org/inside/Pages/newsletter_12-09.aspx, 2012)

2.6.6. Basilisin

Basilisin, basit yapılı ve ribozomal yolla sentezlenen peptid yapılı antifungal bir antibiyotiktir (bkz. Şekil 2.20). *B. subtilis* Marburg 168 suşu tarafından üretildiği ve L-alanine ve sıra dışı bir aminoasit olan L-anticapsine içeren bir dipeptid olduğu ifade edilmektedir (Walker ve Abraham 1970).

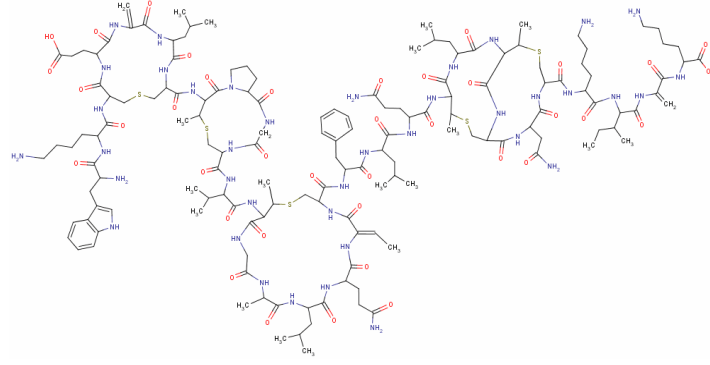


Şekil 2.20. Basilisin (<http://www.guidechem.com/dictionary/1395-22-8.html>, 2012)

2.6.7. Subtilin

Subtilin iyi bilinen ribozomal orjinli bir antibiyotiktir (bkz. Şekil 2.21). Subtilin öncülü, ribozomlarda sentezlenir ve threonin ve serin dehidrasyonu gibi translasyon sonrası modifikasyonlarla dehidroformuna dönüşür. Bunlar Subtilin polipeptit zincirinde sistin birimlerine katılır ve sonuç olarak 32 aminoasitlik Subtilin oluşur (Klein ve ark. 1992).

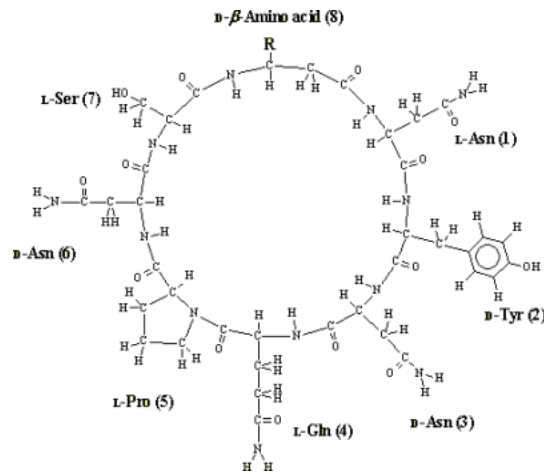
Gram pozitif bakterilerden özellikle *Neisseria catarrhalis* ve *Neisseria gonorrhoeae* ve çeşitli patojen mantarlara karşı etkili olduğu bildirilmektedir. Subtilinin yüksek sıcaklık ve düşük pH değerlerinde stabil olduğu ve otoklav edilse dahi tamamen antibakteriyel aktivitesi korumakta olduğu bildirilmektedir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



Şekil 2.21. Subtilin (<http://www.guidechem.com/cas-139/1393-38-0.html>, 2012)

2.6.8. İturin

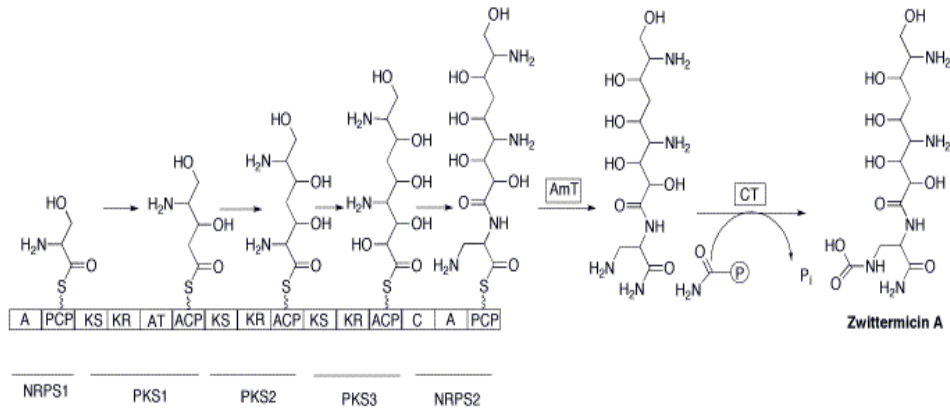
Bacillus subtilis tarafından nonribozomal yolla üretilen iturin, 7 aminoasitten oluşmaktadır (bkz. Şekil 2.22). İturin, hücre membranının geçirgenliğini bozarak, nükleotit, protein, polisakkarit ve lipitlerin hücre dışına çıkmasına neden olmaktadır. Özellikle birçok mantar ve mayanın neden olduğu hastalıklarla mücadelede kullanılmaktadır. Bitkilerde külleme denilen hastalığa sebebiyet veren *Podospheera fusca* mantarına karşı kullanılan bir antibiyotik olduğu bildirilmektedir (Romero ve ark. 2007). Diğer yandan, *Saccharomyces cerevisiae*' ya (Latoud ve ark. 1987) ve *Penicillium notatum*' a karşı da etkili olduğu da bildirilmektedir (Xianqing ve ark. 2010).



Şekil 2.22. İturin (<http://blogs.princeton.edu>, 2012)

2.6.9. Zwittermisin

Bacillus cereus tarafından nonribozomal olarak sentezlenen Zwittermisin, 5 aminoasitten oluşan bir antibiyotiktir (bkz. Şekil 2.23). Mantarların neden olduğu bazı bitki hastalıklarında etkili olduğundan dolayı tarım endüstrisi için önemli bir antibiyotik olduğu bildirilmektedir (Rosovitz ve ark. 1998). Bir çalışmada, *Phytophthora medicaginis*' in gelişimini inhibe ederek sebep olduğu hastalığın engellendiği ifade edilmektedir (Sılo-Suh ve ark. 1994).



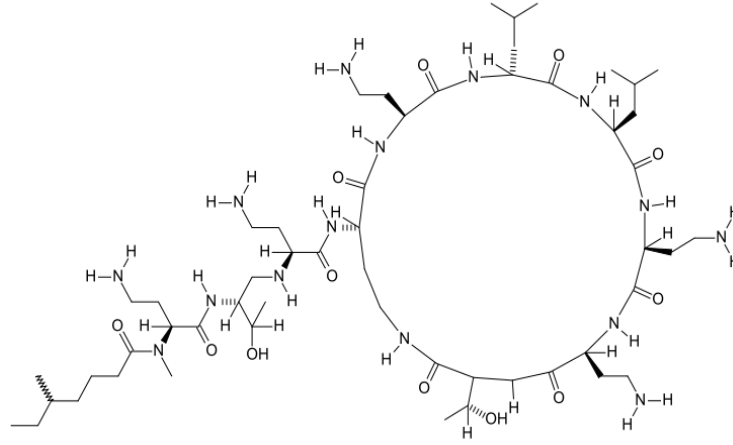
Şekil 2.23. Zwittermisin (http://en.wikipedia.org/wiki/Zwittermisin_A, 2012)

2.6.10. Cerein

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

2.6.11. Polimiksinler

Bacillus cluster ve özellikle *Bacillus polymyxa*' dan elde edilen, polipeptid antibiyotiklerden olan polimiksinler, A, B, C, D, E olmak üzere beş çeşitten oluşan 10 aminoasitlik nonribozomal orjinli bir antibiyotiktir (bkz. Şekil 2.24). Katyonik sürfaktanlar gibi etki eden ve hücre zarının yapısını bozan polimiksinlerin, tedavide daha çok B ve E tipinin kullanıldığı bildirilmektedir. Gram pozitif bakterilere ve anaeroblara etkisiz olan polimiksinler, Gram negatif bakterilere, özellikle *Pseudomonas aeruginosa* 'ya karşı etkilidir.



Şekil 2.24. Polimiksin (<http://www.antibioticslist.com/polymyxin-m.html>, 2012)

Bunların yanı sıra, Tochisin, Thuricin ve Entomocidus antibiyotikleri de *Bacillus* cinsi üyeleri tarafından üretilmektedir (Cherif ve ark. 2001). *Bacillus thuringiensis* tarafından üretilen Tochisin' in, diğer *Bacillus* suşlarına karşı etki gösteren bir antibiyotik olduğu bildirilmektedir (Paik ve ark. 1997). Thuricin ve Entomocidus, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojen bakterilere karşı aktif olduğu bildirilmektedir. Diğer yandan, Kanosamine antibiyotiği, *Bacillus cereus* tarafından üretilmekte ve bu antibiyotiğin Oomycetes grubuna ait küflere karşı inhibisyon etkisinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *Bacillus subtilis*, Fengymycin ve Eumycin gibi antifungal peptid antibiyotikler de üretmektedir.

2.7. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları

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

2.7.1. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanımı

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi, mikrobiyal kaynaklı hastalıkların iyileştirilmesi için antibiyotiklerin düzenli bir şekilde verilmesi olarak ifade edilmektedir (Lancini ve ark. 1995). Antibiyotikler bu amaçla günümüzde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

2.7.2. Hayvancılıkta kullanımı

Hayvanların çeşitli enfeksiyon hastalıklarında tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin hayvancılıkta kullanılmaya başlamasının ilk yıllarında medikal amaçlı olarak Penicilin, Tetrasiklin, Eritromisin, Streptomisin gibi antibiyotikler birçok ülkede kullanılmıştır. Besin değeri olan hayvanlarda pek çok antibiyotiğin kullanımına sınırlandırmalar getirilmiştir. Hayvancılıkta kullanılan antibiyotiklere örnek Monensin, Rumensin ve Salinomisin verilebilir (Berdy 1986).

2.7.3. Antibiyotiklerin ziraat alanında kullanımı

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

Antibiyotiklerin ziraat alanındaki uygulamaları şu şekilde sıralanabilir (Lancini ve ark. 1995).

- 1-Bakteriyal enfeksiyonların kontrolü amacıyla, özellikle, *Erwina sp.* ve *Xhantomonas sp.* enfeksiyonlarına karşı Streptomisin kullanılmaktadır.
- 2-Fungal enfeksiyonların kontrolünde Blastisidin S, Siklohegzimid ve Kasugamisin gibi

antibiyotikler kullanılmaktadır.

3-Antibiyotik özellik gösteren çok sayıda sentetik bileşiklerin bazıları bitki zararlılarının kontrolünde herbisit olarak kullanılmaktadırlar.

2.7.4. Araştırma materyali olarak kullanımı

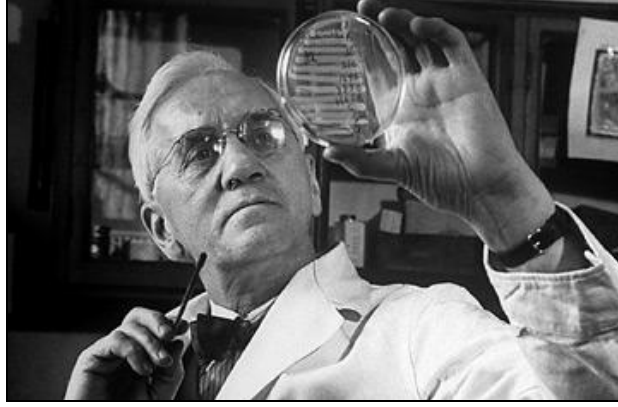
Bazı bilimsel araştırmalarda tedavi edici olmayan fakat biyokimyasal araçlar olarak birçok antibiyotik kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklerden bazıları enzim inhibitörü olarak kullanılıp hücrel metabolizmada görev alan bir molekülün işlevinin saptanmasında kullanılmaktadır. Örneğin, protein sentezinde birçok bilgi, Kloramfenikol ve Siklohegzimidin inhibitör olarak kullanılması ile ortaya çıkarılmıştır (Waksman 1967, Umezawa ve ark. 1972, Lancini ve ark. 1995). Diğer yandan, prokaryot ve ökaryotlarda RNA polimeraz arasındaki farklılık Rifamisin kullanılarak belirlenmiştir. Bunların yanında antibiyotikler, markırlar olarak veya konjugasyon denemelerinde verilen karakterlerdeki mikroorganizmaları seçmek amacı ile ve hedef enzim inhibisyonu sonucunda, hedef enzimin genetik haritada gen pozisyonunun belirlenmesinde, bir veya daha çok antibiyotik direnç genleri taşıyan vektörlerin gen transferi için kullanıldığı genetik mühendisliğinin bütün işlemlerinde, rekombinant klonların seçiminde kullanılmaktadır (Lancini ve ark. 1995). 1948 yılında Leben ve Keitt tarafından bulunan ve *Streptomyces* cinsine ait türler tarafından üretilen Antimisin, solunumun elektron taşıma çalışmalarında, oksidatif inhibitör olarak kullanılmaktadır (Berdy 1986).

2.8. Antibiyotik Tarama Yöntemleri

2.8.1. Karşıt-çizgi yöntemi

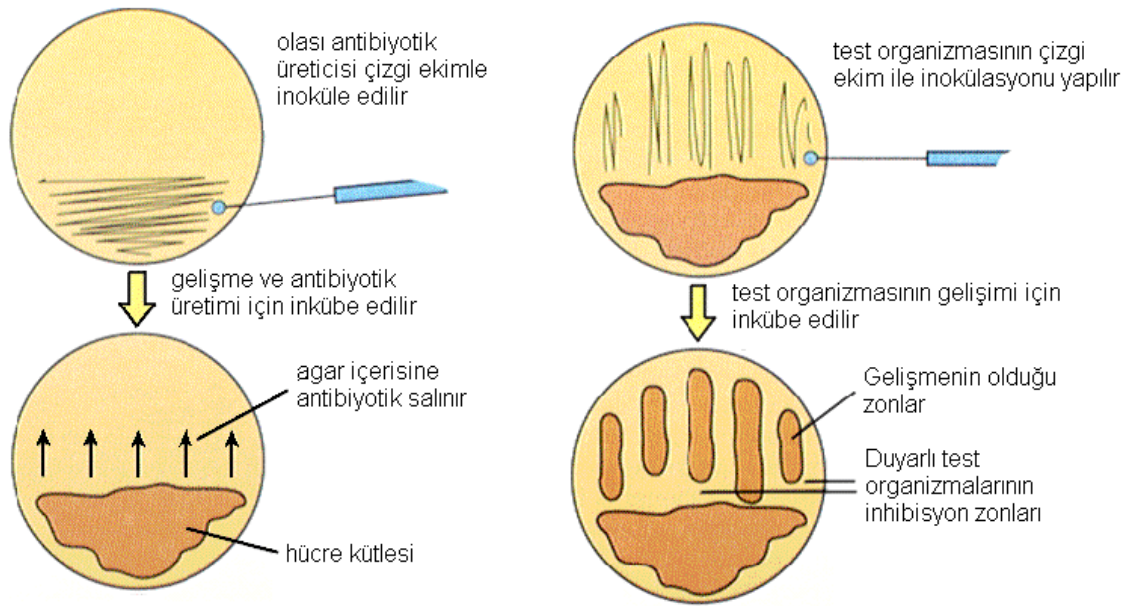
Yeni mikrobiyal izolatlardan antibiyotik taramak amacıyla, ilk defa Sir Alexander Fleming tarafından kullanılmış olan karşıt-çizgi (cross-streak) metodu uygulanabilmektedir (bkz Şekil 2.25 ve Şekil 2.26). Bu yöntemde göre olası antibiyotik üreticisi olan organizma, petrinin üçte birlik kısmını kaplayacak şekilde bir köşesine ekilir ve uygun sıcaklıkta inkübe edilir. İyi bir büyüme elde edildikten sonra sıvı besi yerinde geliştirilmiş olan test bakterileri, olası antibiyotik üreticisi olan bakteri hücre

kütlesine dikey olacak şekilde öze ile çizgi ekim yapılarak inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda ortaya çıkan inhibisyon zonları, test bakterilerinin üreyemediğini ve bu da bakterinin etkili bir antibiyotik ürettiğini göstermektedir (Madigan ve ark. 2000).



Şekil 2.25. Sir Alexander Fleming-karşıt çizgi (cross streak) metodu

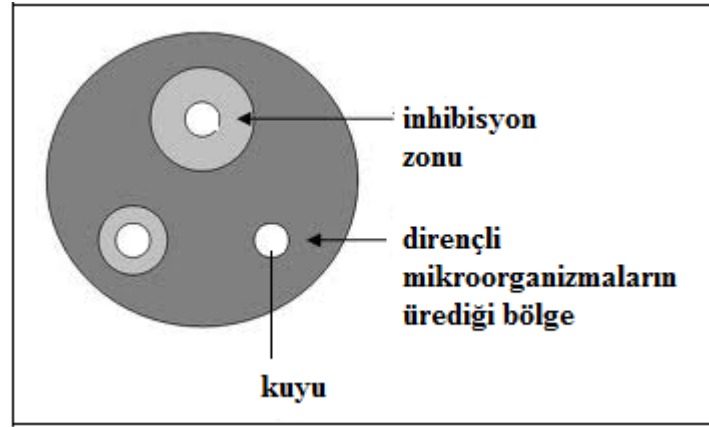
(<http://biologyonline.us/Microbiology/Fall08WhiteEarth/MicroLabManual/Lab2/4.htm>, 2012)



Şekil 2.26. Karşıt-çizgi yöntemi (Madigan ve ark. 2000)

2.8.2. Agar kuyu difüzyon yöntemi

Agar kuyu difüzyon yönteminde, test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine steril koşullarda kuyucuklar açılır. Daha sonra antibiyotik örneği kuyucuklara belirli miktarda doldurulur. Böylelikle, kuyucuklardaki antibiyotik, agar içerisine yayılır ve test bakterisine etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda, Şekil 2.27’ de görüldüğü gibi kuyucukların çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur (Nathan ve ark. 1978).

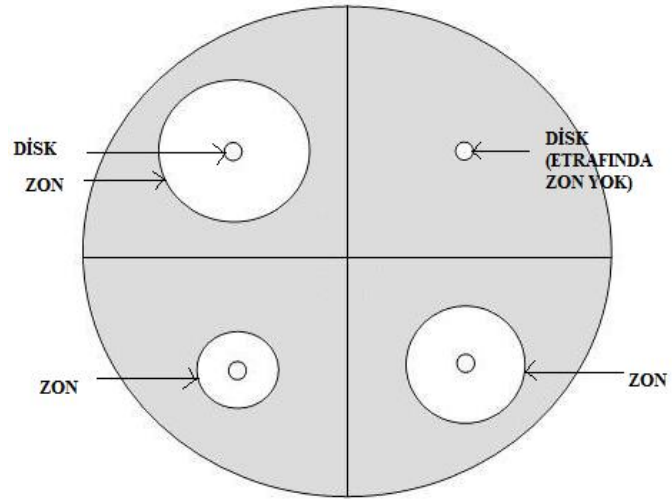


Şekil 2.27. Agar kuyu difüzyon yöntemi

(<http://archive.microbelibrary.org/edzine/details.asp?id=1796&Lang=>, 2012)

2.8.3. Agar disk difüzyon yöntemi

Agar disk difüzyon yöntemi, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi olarak bilinmektedir. Belirli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Böylelikle, diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve etkili olduğu düzeylerde test bakterilerinin üremesini engeller. Bunun sonucunda, Şekil 2.28’ da görüldüğü gibi disk çevresinde bakterilerin üreyemediği dairesel bir inhibisyon zonları oluşur (Kirby ve ark. 1957, Bauer ve ark. 1959).



Şekil 2.28. Agar disk difüzyon yöntemi

(<http://www.kmle.co.kr/search.php?Search=disk+diffusion+method&Page=2>, 2012)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, 25 farklı ilden alınan toprak örnekleri antibiyotik potent *Bacillus* sp.'leri saptamak için kullanılmıştır. *Bacillus* sp.'lerde karşı-çizgi yöntemiyle antibiyotik taraması yapıldı ve en büyük inhibisyon zonu gösteren 1 adet *Bacillus* sp. seçilerek daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere kültür saklama besiyerinde korunmuştur.

Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller; Adana, Amasya, Ankara, Antalya, Ardahan, Balıkesir, Bilecik, Burdur, Edirne, Hatay, İstanbul, İzmir, Kastamonu, Kayseri, Kütahya, Malatya, Manisa, Mersin, Muğla, Niğde, Ordu, Sakarya, Sivas, Trabzon ve Tunceli' dir (bkz. Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller

(<http://www.turkeywrestling.com/haber-23-ıl-temsilcilerimiz.html>, 2012)

Antibiyotiklerin taranmasında kullanılacak olan 5 adet test bakterisi Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Bölümü' nden temin edilmiştir (bkz. Çizelge 3.1).

Test Bakterileri	Katalog Numaraları
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 9290
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923

Çizelge 3.1. Kullanılan test bakterileri ve katalog numaraları

3.2. Yöntem

3.2.1. Toprakta antibiyotik üreten bakterilerin taranması

25 adet toprak örneğinin her biri Nutrient agarlı ortama ekilen her bir test mikroorganizması üzerine serpilmiş ve 37°C' de 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda petri kapları bakteri kolonilerinin etrafındaki inhibisyon zonlarının varlığına göre antibiyotik üretimleri kontrol edilmiştir.

3.2.2. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri

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

İçerik	Kültür Saklama Besiyeri (%g)	Bakteri Geliştirme Besiyeri (%g)
Nutrient Broth	0.8	0.8
NaCl	0.8	-
Agar	2.0	-
pH	7.0	7.0

Çizelge 3.2. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri

3.2.3. *Bacillus*' un taksonomik sınıflandırılması için morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Saf kültürlerin morfolojik ve fizyolojik özellikleri incelenerek, Bergey's Manual of Systematic Microbiology' den alınan tayin anahtarına göre *Bacillus*' lar belirlenmiştir (Buchanan ve Gibbons 1974). *Bacillus* cinsini tanımlamak için katalaz, hareketlilik, nişastanın hidrolizi, gram boyama ve spor boyama testleri yapılmıştır. Biyokimyasal testlerde kullanılan besiyerlerinin hazırlanmasında Çizelge 3.3' de belirtilen maddeler erlende karıştırılmış ve bu şekilde 121°C' de 15 dakika süre otoklavlanmıştır. Otoklav işlemi bittikten sonra 50-55°C' ye kadar soğutulan besiyeri, 180°C' de 1 saat pastör fırınında steril edilen petri kaplarına 15' er ml dökülerek soğumaya bırakılmıştır.

İçerik	Hareketlilik Testi (% g)	Nişastanın Hidrolizi Testi (% g)	Katalaz Testi (% g)	Spor Boyama (% g)	Gram Boyama (% g)
Nişasta	-	0.5	-	-	-
Nutrient Broth	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Agar	1	2	2	1	1
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

Çizelge 3.3. Biyokimyasal testlerde kullanılan besiyerleri (Çotuk 2003)

3.2.3.1. Hareketlilik testi

Hareketlilik testi için agar ve Nutrient Broth kullanılarak ortam hazırlanmıştır (bkz. Çizelge 3.3). Steril petriyerler, alt tarafından kalemle çizilerek ikiye bölünmüş ve bakteri ekilecek kısım işaretlenmiştir. Belirlenen bölgeye 0.1 ml pipetlenen üremiş sıvı kültür, çizgiyi geçmeyecek şekilde, dragalski özesi ile iyice yayıldıktan sonra 37°C' de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Temiz 1994).

3.2.3.2. Katalaz testi

Katalaz testinde katı ve sıvı ortamlar kullanılarak, farklı yöntemlerle test yapılabilmektedir. Çalışmamızda, Çizelge 3.3' de belirtilen ortama ekilmiş bakteriler, 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler üzerine 1-2 damla %3' lük H₂O₂ damlatılmış ve gaz çıkışı olup olmamasına göre değerlendirme yapılmıştır (Çotuk 2003).

3.2.3.3. Nişastanın hidrolizi testi

Bacillus türleri α -amilaz enzimi üretimi açısından önemlidir ve birçoğu nişastayı parçalayabilme yeteneğindedir (Priest 1977). Çizelge 3.3' de gösterilen nişastanın hidrolizi testi için kullanılan ortama, fizyolojik tuzlu su (FTS) ile seri dilüsyon yapılan bakteriler tek koloni oluşturacak şekilde ekilip, 37°C' de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, besiyerine % 0.5 I (iyot) ve % 5 KI (potasyum iyodür) ile hazırlanmış iyot çözeltisi damlatılarak koloniler etrafında açık renkli bölge oluşumu izlenmiştir (Koneman ve ark. 1992).

3.2.3.4. Gram boyama

Gram boyama işlemi Temiz (1994)' in belirttiği yöntemle göre yapılmıştır. Buna göre; bakterilerin 18 saatlik taze kültürlerinden, steril öze ile alınarak 1 damla steril distile su ile yayma preparat hazırlanmış ve preparatlar havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruma tamamlandıktan sonra lamlar 3 defa alevden geçirilerek tespit işlemi yapılmıştır. Daha sonra lamların üzerine, mikrobiyal film tabakasını kaplayacak şekilde, bol miktarda % 1' lik kristal viyole damlatılarak 1 dakika beklenmiştir. Kristal viyole yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra lamların üzerine % 0.5 I ve % 5 KI ile hazırlanmış gram iyodin (lugol) dökülerek yine 1 dakika beklenmiştir. Boya, suyla uzaklaştırılmış ve lamlar % 95' lik etil alkol ile renk kayboluncaya kadar yıkanmıştır. Ardından, film tabakasının üzerine % 95' lik alkolün 10 ml' si içinde % 0.25 gr olarak hazırlanan safranin eklenecek 45 saniye beklenmiş ve boya yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar, havada kurutulmuş ve immersiyon yağı ile 10x100' lük objektifte, Olympus CX31 marka ışık mikroskopunda incelenmiştir. İyi boyanmış olan örneklerde Gram (+) olan mikroorganizmalar koyu mor (menekşe) renkli, Gram (-) olanlar ise açık pembe renkli görünüşleri ile ayırt edilmiştir.

3.2.3.5. Spor boyama

Endospor boyama işlemi Özkaya ve Durlu (2000)' nun belirttiği yöntemle göre yapılmıştır. Buna göre; taze kültürleri hazırlanan bakteriler, lam üzerine 1 damla steril distile su ile iyice yayılarak havada kurutulmuş ardından 3 kez alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Örnekler % 5' lik malaşit yeşili ile alevde 5 dakika etkiye bırakılmış ve buharlaştıkça boya ilave edilmiştir. Distile su ile yıkanan örnekler 30 saniye safranin ile boyanmış ve distile suyla tekrar yıkanıp havada kurutulduktan sonra bakteri sporlarının morfolojileri, Olympus CX31 marka araştırma mikroskobu kullanılarak incelenmiştir.

3.2.4. *Bacillus* sp.' lerde karşıt-çizgi yöntemi ile antibiyotik taranması

Bacillus sp.' lerin antibiyotik üretim kapasitelerini belirlemek üzere karşıt-çizgi (cross-streak) testi kullanılmıştır (Madigan ve ark. 2000). Her bir *Bacillus* sp. Nutrient agarlı petri kabının bir tarafını kaplayacak şekilde ekilmiş (yatay) ve petri kablari 37°C' de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, Nutrient Broth besi yerinde bir gecelik kültür olarak üretilen test bakterileri (*Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*) olası antibiyotik üreticisi *Bacillus* sp. hücre kitlesine dikey (karşıt) olacak şekilde öze ile çizgi ekim yapılarak, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu meydana gelen inhibisyon zonları cetvel ile ölçülmüştür. En büyük inhibisyon zonunu oluşturan 1 adet *Bacillus* sp. seçilerek deneylere bu suş ile devam edilmiştir.

3.2.5. Antibiyotik üretimi için uygun besiyeri seçimi

Bacillus sp. suşunun antibiyotik üretim kapasitesinin belirlenmesi amacıyla, farklı içerikli 6 adet besi ortamı denenmiş ve en yüksek antibiyotik üretiminin elde edildiği besiyeri tespit edilmiştir. Kullanılan ortamlar Çizelge 3.4' de belirtilmiştir. Tüm besiyerleri pH' ları 7.0' ye ayarlandıktan sonra 121 °C' de 15 dk. süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Besi ortamındaki glukoz ayrı olarak filtrasyon (0.45 µm) ile sterilize edilerek besi ortamına ilave edilmiştir.

İçerik	Besiyeri 1 (g/L) (Carvalho ve ark. 2010)	Besiyeri 2 (g/L) (Haddar ve ark. 2007)	Besiyeri 3 (g/L) (Hanlon ve ark. 1982)	Besiyeri 4 (g/L) (Paulus ve Gray 1964)	Besiyeri 5 (g/L) (Ilić ve ark. 2010)	Besiyeri 6 (g/L) (Awais ve ark. 2010)
Glukoz	10	5	15	10	15	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	-	-	20	-	-
K ₂ HPO ₄	13.6	-	-	2.6	-	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	0.025	0.5	0.2	0.5	0.2
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.42	0.015	0.1	-	-	0.015
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.29	0.00275	0.01	-	-	0.01
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1	0.0025	0.01	-	-	-
ZnCl ₂	0.17	-	-	-	-	-
CuCl ₂	0.03	-	-	-	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.06	-	-	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.06	-	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	3.55	24	-	-	0.5
NH ₄ Cl	-	0.5	10	-	-	-
yeast ekstrakt	-	-	-	5	-	-
NaCl	-	-	-	0.1	3	-
CaCO ₃	-	-	-	-	3	-
Soy bean ¹	-	-	-	-	1	-
L-Glutamikasit ²	-	-	-	-	-	5
Na ₂ HPO ₄	-	10.75	40	-	-	-
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	-	-	-	0.5	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	-	-	0.01
CuSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	-	-	-	0.01
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

Çizelge 3.4. Antibiyotik üretiminde kullanılan besiyerleri

¹ Besiyeri 5' te Soy Bean yerine Yeast Ekstrakt kullanılmıştır.

² Besiyeri 6' ta Glutamik asit yerine Pepton kullanılmıştır.

3.2.6. Bakteri üretim koşulları

Kültür saklama ortamından steril öze ile alınan *Bacillus* sp. suşu, içerisinde 30 ml bakteri geliştirme besiyeri (bkz. Çizelge 3.2) bulunan 100 ml' lik erlene aşılansmış, 37°C' de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 18 saat süre ile üretilmiştir.

Bakterinin 18 saatlik gecelik kültürünün 600 nm' deki optik yoğunluğu (OD) spektrofotometre (Beckman Coulter-DU 700) kullanılarak, bir standart elde edebilmek amacıyla, steril fizyolojik tuzlu su ile 0,3' e ayarlanmıştır. Bu şekilde ayarlanan *Bacillus* sp. kültür çözeltilisinden, içerisinde 100 ml antibiyotik üretim besiyeri (bkz. Çizelge 3.4) bulunan 250 ml' lik erlenlere %10 oranında aşılansmış ve 30°C' de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 96 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bakteri üremesi ve antibiyotik üretim tayini 24, 48, 72 ve 96. saatlerde yapılarak bakterinin gelişme grafiği çıkarılmış ve maksimum antibiyotik üretim zamanı saptanmıştır.

3.2.7. Bakteri üremesinin ölçülmesi

Bakteri üremesinin belirlenmesi amacıyla, besiyerinin bulanıklığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 3.2.6' da belirtildiği üzere inkübasyona bırakılan besiyerlerinden, belirlenen saatlerde (24, 48, 72 ve 96) örnek alınarak, 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Antibiyotik üretiminde kullanılan besiyeri kör olarak kullanılmıştır ve optik yoğunluk (OD) değerlerinin okunmasıyla bakteri üreme miktarı belirlenmiştir.

Elde edilen optik yoğunluk (OD) değişimleri, zamana karşı grafiklenerek gelişme eğrileri çıkarılmıştır.

3.2.8. Antibiyotik üretiminin tespiti

Antibiyotik üretiminin tespiti için Agar Kuyu Difüzyon Metodu (Agar Well Diffusion Method) kullanılmıştır (Sen ve ark. 1995). Öncelikle, antibiyotik üretim besiyerlerinden her 24 saatte alınan örnekler 0.2 µm çapındaki filtreden geçirilerek steril endorff tüplere aktarılmış ve kullanılabileceği kadar +4 °C muhafaza edilmiştir.

Test bakterisi Nutrient Broth' ta 24 saat boyunca üretilmiş ve üretim sonucunda kültürün optik yoğunluğu (OD) spektrofotometre (Beckman Coulter-DU 700)

kullanılarak steril fizyolojik tuzlu su ile OD₆₀₀:0.3'e ayarlanmıştır. Bu kültür Nutrient agarlı petri kabının tamamına steril pamuk uçlu plastik eküvyon çubuk ile yayılmıştır. Petri kaplarında steril şartlarda 7 mm' lik kuyucuklar açılmış ve ependorf tüplerdeki filtre edilmiş örnekten 100 µl olacak şekilde bu kuyucuklara doldurulup, 24 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kuyucuklar etrafında oluşan inhibisyon zonları kontrol edilmiş ve cetvelle ölçülmüştür.

3.2.9. Antibiyotik üretiminin sporulasyon ile ilişkisinin saptanması

Antibiyotik üretiminin sporulasyon ile ilişkisini saptamak için maksimum antibiyotik üretiminin elde edildiği besiyerinde (Besiyeri 5) her 24 saatte (24-96 saat) alınan örnekler 75°C' de 15 dk. su banyosunda bekletilerek vejetatif hücrelerin ölmesi sağlanmıştır. Daha sonra seri dilüsyonlar yapılarak Nutrient agarlı petri kaplarına yayma yöntemiyle ekimler yapılmış ve 37°C' de 18 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Moita ve ark. 2005). Bu süre sonunda petri kapları kontrol edilerek oluşan koloniler sayılır ve koloniler cfu/ml olarak hesaplanır. Deneyler iki kez tekrarlanmış ve ortalaması alınmıştır.

3.2.10. Antibiyotik üretimi üzerine bazı faktörlerin etkisinin belirlenmesi

3.2.10.1. pH' nın etkisi

Farklı pH değerlerinin antibiyotik üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 olarak ayarlanmış besiyerlerinde bakterinin üretimi 3.2.6' da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Bakteri üretimi 96. saate kadar yapılmış ve antibiyotik üretiminin maksimum olduğu 72. saatte agar kuyu difüzyon metodu ile antibiyotik üretime bakılmıştır. Ayrıca 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örneklerden bakteri üreme tayini yapılmıştır.

3.2.10.2. Glukoz konsantrasyonunun etkisi

Glukoz konsantrasyonunun antibiyotik üretimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla besi ortamında karbon kaynağı olarak bulunan glukoz miktarının (%1.5) değişimine gidilmiştir. Bu amaçla, besi ortamında % 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 olmak üzere glukoz konsantrasyonları kullanılmıştır. Bakteri üretimi 96. saate kadar yapılmış ve antibiyotik üretiminin maksimum olduğu 72. saatte agar kuyu difüzyon metodu ile antibiyotik

üretimine bakılmıştır. Ayrıca 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örneklerden bakteri üreme tayini yapılmıştır.

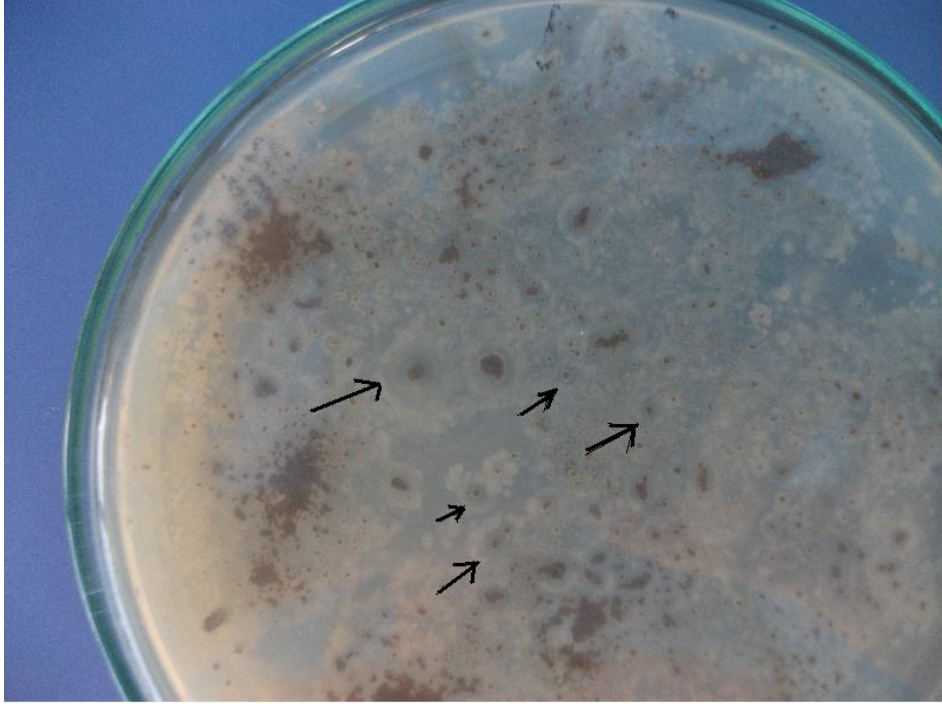
3.2.10.3. Nitrojen konsantrasyonunun etkisi

Besi ortamında nitrojen yani azot kaynağı olarak bulunan Yeast ekstrakt miktarının (% 0.1) değişimine gidilerek besi ortamına % 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 nitrojen konsantrasyonları kullanılarak antibiyotik üretimleri üzerine etkisine bakılmıştır. Bakteri üretimi 96. saate kadar yapılmış ve antibiyotik üretiminin maksimum olduğu 72. saatte agar kuyu difüzyon metodu ile antibiyotik üretimine bakılmıştır. Ayrıca 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örneklerden bakteri üreme tayini yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Toprakta Antibiyotik Potent Bakterilerin Belirlenmesi

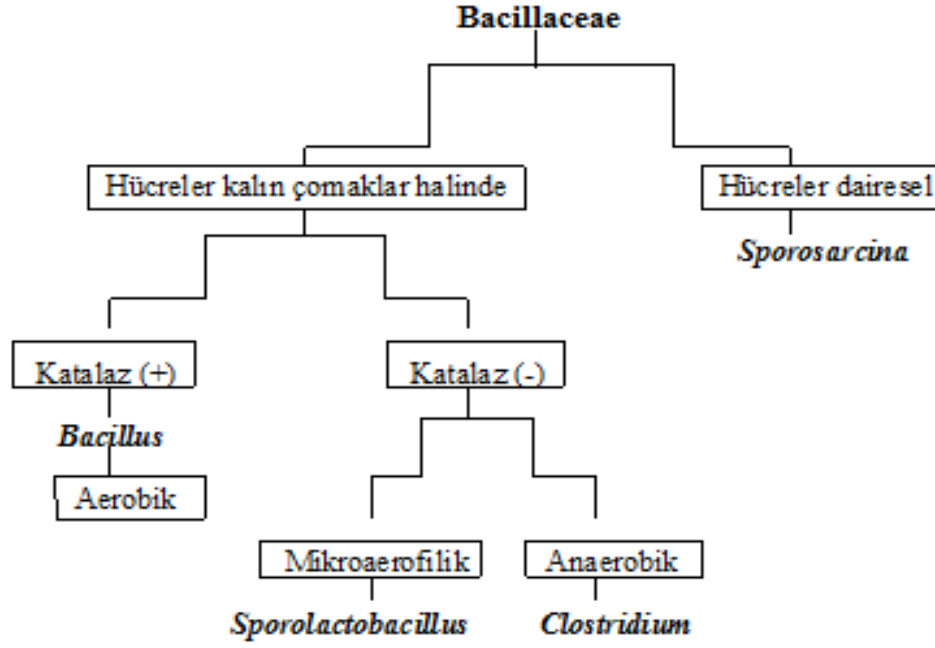
Çalışmada kullanılan 25 adet toprak örneğinin her biri Nutrient agarlı ortama ekilen her bir test mikroorganizması üzerine serpilmiş ve 37°C’ de 24 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda petri kapları bakteri kolonilerinin etrafındaki inhibisyon zonlarının varlığına göre antibiyotik üretimleri kontrol edildi. 25 farklı toprak örneğinden, antibiyotik potent 57 adet bakteri izole edilmiştir. İnhibisyon zonuna sahip koloniler antibiyotik potent özellik gösteren bakteriler olarak değerlendirildi. Kolonilerin besiyerindeki görüntüsü Şekil 4.1’ de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Antibiyotik potent bakteri kolonilerinin görünümü

4.2. Biyokimyasal ve Morfolojik Testler

İnhibisyon zonu oluşturan bakteriler arasından *Bacillus* cinslerini belirlemek amacıyla biyokimyasal ve morfolojik testler yapıldı. Buna göre, *Bacillus* cinsini belirlemek amacıyla aşağıdaki tayin anahtarı kullanılmaktadır (bkz. Şekil 4.2)



Şekil 4.2. *Bacillus* sp. izolatlarının taksonomik özellikleri (Buchanan ve Gibbons 1974)

4.2.1. Biyokimyasal testler

4.2.1.1. Katalaz testi

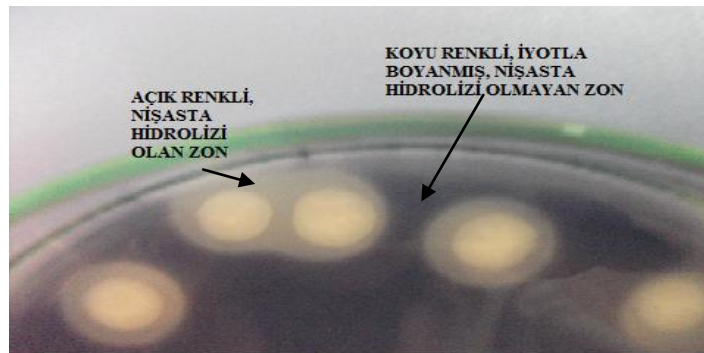
Genellikle aerobik mikroorganizmalar tarafından oluşturulan bir enzim olan katalaz, ortamdaki hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijene ayırmaktadır. 3.2.3.2' ye göre yapılan katalaz testi sonucu, petri kaplarındaki katı bakteri kültürlerine H_2O_2 damlatıldığında, serbest oksijen gaz kabarcıkları halinde gözlemlendi. Bu gözleme göre hidrojen peroksit ayrılmıştır ve bu da katalaz varlığını göstermektedir. Denemeye alınan 57 bakteriden 52' si katalaz (+) olarak değerlendirildi (bkz. Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Petri kabında katalaz (+) bakteride serbest oksijenin kabarcıklar halinde görünümü

4.2.1.2. Nişasta hidroliz testi

İyot varlığında nişasta, besiyerinde mavi siyah bir renk vermektedir. 3.2.3.3' e göre yapılan nişasta hidroliz testinin sonucuna göre, kolonilerin etrafında açık renkli bir zon oluşumunun gözlenmesi pozitif bir sonuç olarak değerlendirildi. Mavi-siyah görülen yerler ise enzimin olmadığı bir göstergesidir. Denenen 57 bakteriden 52 adedinin nişasta hidroliz (+) olduğu görülmüş ve 5 adedi ise etrafında açık zon oluşumu gözlenmediği için nişasta hidroliz (-) olarak değerlendirildi (bkz. Şekil 4.4).

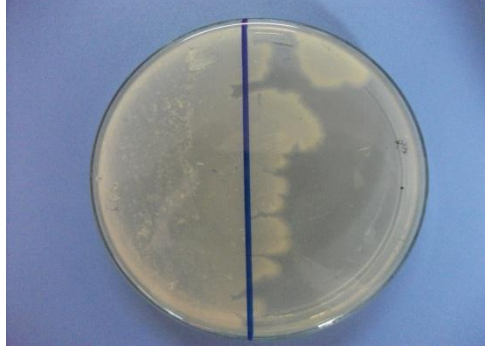


Şekil 4.4. Nişasta hidrolizi sonucunda iyotla boyanmış ve boyanmamış bölgeler

4.2.2. Morfolojik testler

4.2.2.1. Hareketlilik testi

3.2.3.1'e göre yapılan hareketlilik testi sonucunda 52 adet bakterinin hareketli olduğu gözlenirken 5 adet bakterinin ise hareketsiz olduğu gözlemlendi (bkz. Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Petri kabında agarlı besiyerinde hareketlilik kontrolü

4.2.2.2. Gram boyama

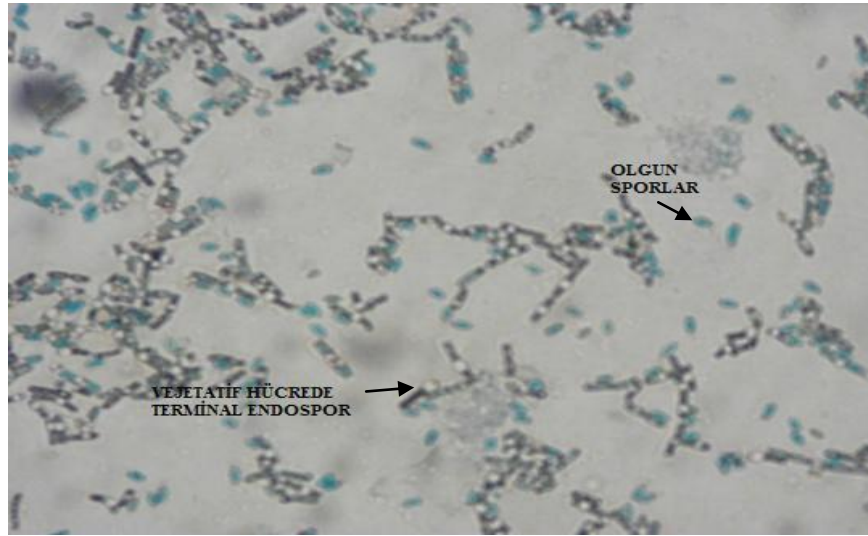
Gram boyama 3.2.3.4' e göre yapılmıştır. İlk boya olarak kullanılan kristal viyoleyi hücre içinde tutabilen bakteriler Gram (+) olarak kabul edildi. Denemeye alınan bakterilerden 52 adedi mor menekşe bir renk göstererek Gram (+) olarak değerlendirildi. İncelemeler Olympus CX31 marka ışık mikroskopunda, 100X objektifle immersiyon yağı ile yapıldı. Boyama sonucu elde edilen görüntüler Şekil 4.6 ' dadır.



Şekil 4.6. Işık mikroskopunda Gram (+) bakterilerin görünümü (100X)

4.2.2.3. Spor boyama

Spor oluşumu Bacillaceae familyasının tipik özelliğidir. Endospor oluşumu bu familyanın üyeleri olan *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakterilerde görülmektedir. Denemeye alınan bakterilerde spor boyama 3.2.3.5' e göre yapıldı ve bakterilerin hepsinin sporlu oldukları saptandı. İncelemeler Olympus CX31 marka ışık mikroskopunda, 100X objektifle immersiyon yağı ile yapıldı. Boyama sonucu elde edilen görüntüler Şekil 4.7' dedir.

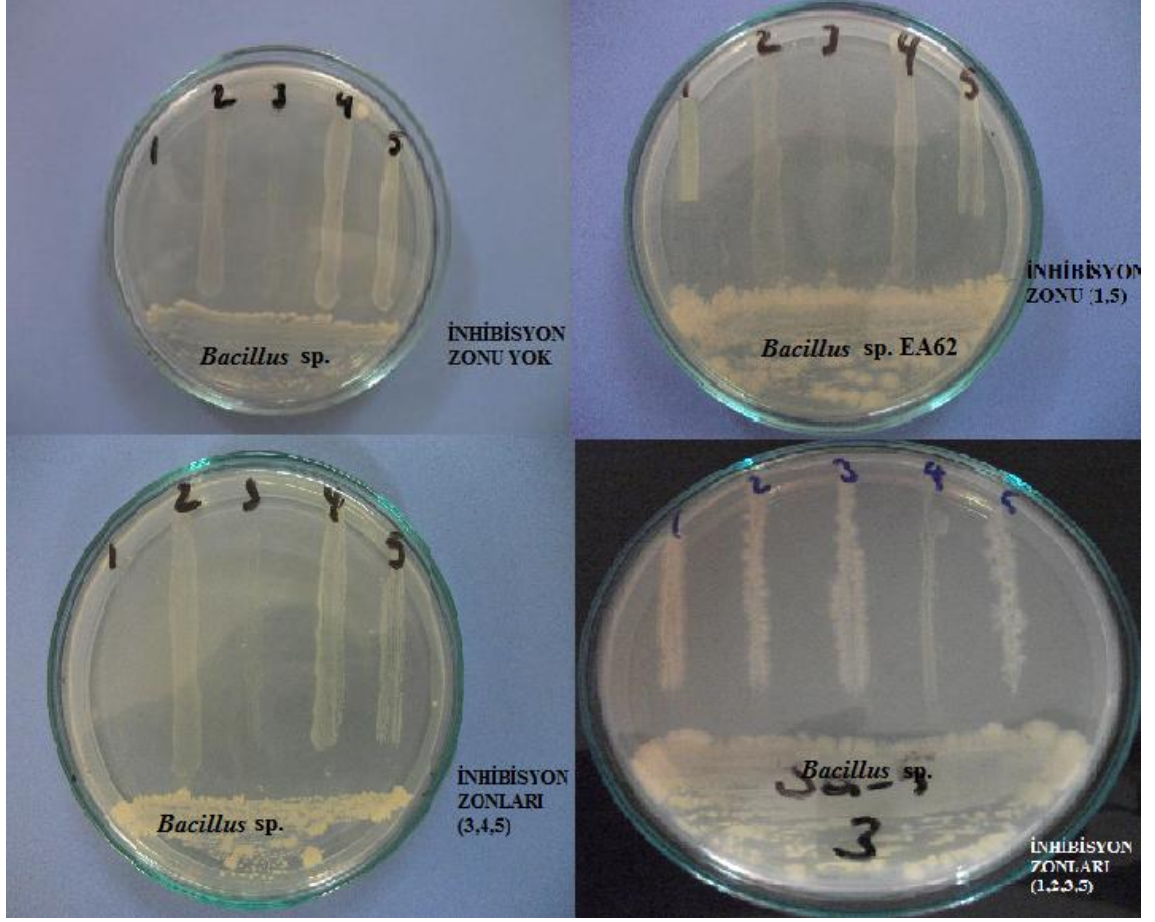


Şekil 4.7. Işık mikroskopunda sporların görünümü (100X)

Yapılan biyokimyasal ve morfolojik testler sonucunda elde edilen 57 bakteriden 52 tanesinin *Bacillus* olduğu tespit edildi. Tespit edilen *Bacillus*' lar karşıt-çizgi metodu ile antibiyotik taraması için denemeye alındı.

4.3. *Bacillus* sp.' lerde Karşıt-Çizgi Yöntemi ile Antibiyotik Taraması

Karşıt-çizgi yöntemiyle antibiyotik taraması 3.2.4' e göre yapıldı. Denemeye alınan 52 adet *Bacillus*' tan 25 tanesi çalışmada kullanılan farklı test bakterilerine karşı inhibisyon zonları göstermiştir. Çizelge 4.1' de görüldüğü üzere Balıkesir ilinden alınan topraktan izole edilen ve *Bacillus* sp. EA62 olarak adlandırılan bakteri, en büyük inhibisyon zonunu *Shigella sonnei*' ye karşı göstermiştir (bkz. Şekil 4.8). Bundan sonraki çalışmalara antibiyotik potent olan *Bacillus* sp. EA62 ve test bakterisi olan *Shigella sonnei* ile devam edildi.



Şekil 4.8. *Bacillus*' larda karşıt-çizgi yöntemiyle antibiyotik taraması

1. *Shigella sonnei*
2. *Salmonella typhimurium*
3. *Yersinia enterocolitica*
4. *Klebsiella pneumoniae*
5. *Staphylococcus aureus*

Karşıt-Çizgi Yöntemiyle Antibiyotik Taranması Sonucu Elde Edilen İnhibisyon Zonları (mm)					
Bakteri No.	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Klebsiella enterolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1 (Kütahya)	11 mm	12 mm	12 mm	-	10 mm
2 (Ordu)	-	4 mm	8 mm	-	-
3 (İstanbul)	7 mm	9 mm	8 mm	-	5 mm
4 (İstanbul)	3 mm	4 mm	5 mm	-	4 mm
5 (Balıkesir)	10 mm	12 mm	12 mm	-	11 mm
Bacillus sp. EA62 (Balıkesir)	25mm	-	-	-	20 mm
7 (Amasya)	-	5 mm	20 mm	-	4 mm
8 (Ankara)	-	-	-	-	20 mm
9 (Ankara)	11 mm	12 mm	12 mm	-	10 mm
10 (Sakarya)	-	4 mm	8 mm	-	-
11(Bilecik)	7 mm	9 mm	8 mm	-	5 mm
12 (İzmir)	3 mm	4 mm	5 mm	-	4 mm
13 (İzmir)	-	-	-	-	20 mm
14 (İzmir)	10 mm	12 mm	12 mm	-	11 mm
15 (Malatya)	-	5 mm	20 mm	-	4 mm
16 (Edirne)	-	-	-	-	24 mm
17 (Edirne)	-	-	-	10 mm	11 mm
18 (Trabzon)	-	-	-	-	18 mm
19 (Sivas)	-	-	-	-	15 mm
20 (Niğde)	-	-	5 mm	-	4 mm
21 (Niğde)	-	3 mm	2 mm	4 mm	2 mm
22 (Adana)	-	4 mm	4 mm	-	3 mm
23 (Adana)	-	-	2 mm	5 mm	-
24 (Hatay)	-	-	2 mm	2 mm	5 mm
25 (Hatay)	-	-	-	-	7 mm

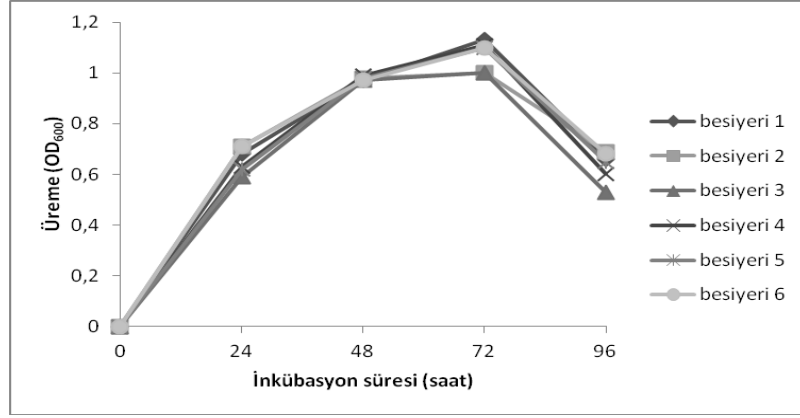
Çizelge 4.1. Toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin, test bakterilerine karşı inhibisyon zon çapları

4.4. Antibiyotik Üretimi İçin Uygun Besiyeri Seçimi

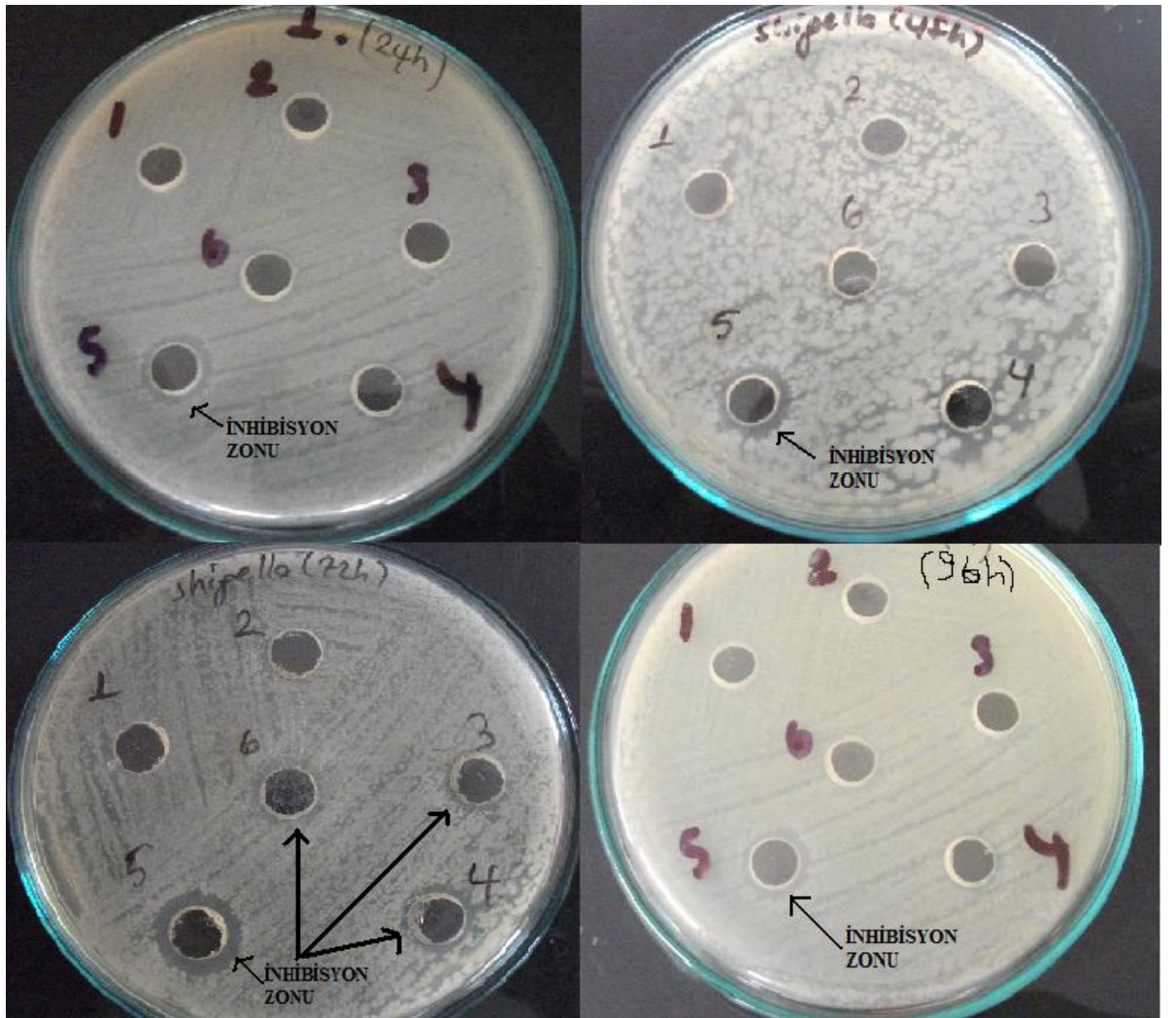
En büyük inhibisyon zonu gösteren *Bacillus* sp. EA62 3.2.5' te belirtilen besiyeri ve kültür şartlarında üretildi. 24, 48, 72 ve 96. saatlerde örnekler alınarak *Shigella sonnei* test bakterisine karşı agar kuyu difüzyon metodu ile antibiyotik taraması yapıldı. Kullanılan besiyerleri arasından Çizelge 3.4' te içeriği verilen Besiyeri 5' te antibiyotik üretiminin diğerlerine göre daha fazla olduğu inhibisyon zon çaplarıyla gösterilmiştir (bkz. Çizelge 4.2. ve Şekil 4.10). Diğer yandan Besiyeri 1 ve 2' de bakteri üremesi gözlenmesine rağmen, antibiyotik üretiminin olmadığı tespit edildi. Besiyeri 3 (10 mm), 4 (12 mm) ve 6 (11 mm)' da sadece 72. saatte inhibisyon zonu gözlenirken, diğer saatlerde hiçbir zon gözlemlenmedi. (bkz. Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Kullanılan Besiyeri 5' te en yüksek inhibisyon zonu (15 mm), bakteri üreme eğrisinin durağan fazı olan 72. saatte elde edildi. 96. saatte ise inhibisyon zonunda bir azalma görüldü. Antibiyotik üretim ortamı olarak Besiyeri 5 seçilmiş ve bundan sonraki çalışmalara bu besiyeri ile devam edildi.

İnkübasyon Süresi	Besiyeri 1		Besiyeri 2		Besiyeri 3		Besiyeri 4		Besiyeri 5		Besiyeri 6	
	OD ₆₀₀	zon çapı (mm)	OD ₆₀₀	zon çapı (mm)	OD ₆₀₀	zon çapı (mm)	OD ₆₀₀	zon çapı (mm)	OD ₆₀₀	zon çapı (mm)	OD ₆₀₀	zon çapı (mm)
24.saat	0,68	-	0,71	-	0,59	-	0,63	-	0,62	12	0,71	-
48.saat	0,97	-	0,98	-	0,97	-	0,99	-	0,98	14	0,97	-
72.saat	1,13	-	1,00	-	1,00	10	1,11	12	1,10	15	1,10	11
96. saat	0,66	-	0,69	-	0,53	-	0,60	-	0,65	12	0,68	-

Çizelge 4.2. Farklı besiyerlerinde üretilen *Bacillus* sp. EA62' nin üreme ve inhibisyon zonlarının karşılaştırılması



Şekil 4.9. *Bacillus* sp. EA62' nin 6 farklı besi ortamında zamana bağlı üreme değerleri



Şekil 4.10. Farklı üreme ortamında üretilen *Bacillus* sp. EA62' nin antibiyotik üretimi üzerine inkübasyon zamanının etkisi

1- Besiyeri 1, 2- Besiyeri 2, 3- Besiyeri 3, 4- Besiyeri 4, 5- Besiyeri 5, 6- Besiyeri 6.

4.5. Antibiyotik Üretimi ile Sporulasyon Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi

Antibiyotik üretimi ile sporulasyon arasındaki ilişki 3.2.9' a göre yapılmıştır. 24, 48 ve 72. saatlerde üremenin artışı ve sporulasyonun da kısmen artışına paralel olarak antibiyotik üretiminde bir artış saptandı. 96. saatte antibiyotik üretiminde düşüş, sporulasyonda ise artış olduğu belirlendi (bkz. Çizelge 4.3).

İnkübasyon Süresi (saat)	OD ₆₀₀	İnhibisyon Zon Çapı (mm)	Koloni Sayımı (cfu/ml)
24	0.72	12	7,65x10 ⁵
48	0.97	14	9,33x10 ⁵
72	1.10	15	10,9x10 ⁵
96	0.65	12	12,6x10 ⁵

Çizelge 4.3. *Bacillus* sp. EA62' nin üreme, zon çapı ve koloni sayımlarının sonuçları

4.6. Antibiyotik Üretimi Üzerine Bazı Faktörlerin Etkisinin Belirlenmesi

Bakterilerin antibiyotik üretimleri buldukları ortama bağlı olduğundan, ortam şartlarının değiştirilmesi antibiyotik üretim miktarına etki etmektedir. Bu nedenle çalışmamızda pH, glukoz ve nitrojen konsantrasyonları olmak üzere üç parametrenin antibiyotik üretimi üzerine etkileri araştırıldı.

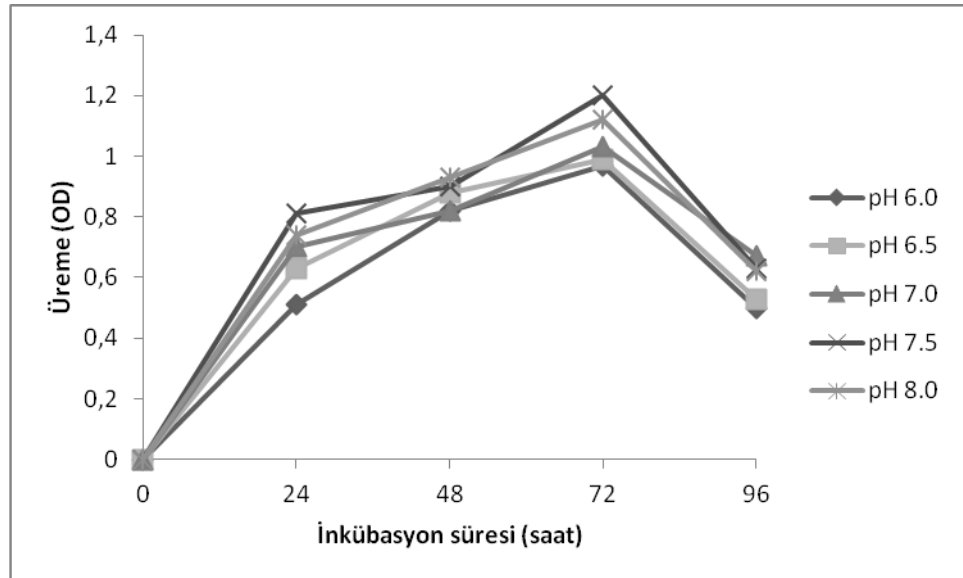
4.6.1. pH' nın etkisi

Bakteri gelişmesi ve antibiyotik üretimi üzerine etkilerini araştırmak üzere en iyi antibiyotik üretiminin sağlandığı Besiyeri 5 ortamının pH' sı 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 olarak ayarlandı. Maksimum antibiyotik sentezinin sağlandığı 72. saatte agar kuyu difüzyon metodu ile farklı pH' ların antibiyotik üretimi üzerine etkisi araştırıldı (bkz. Şekil 4.12). Ayrıca 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örneklerde üreme tayini yapıldı (bkz. Çizelge 4.4).

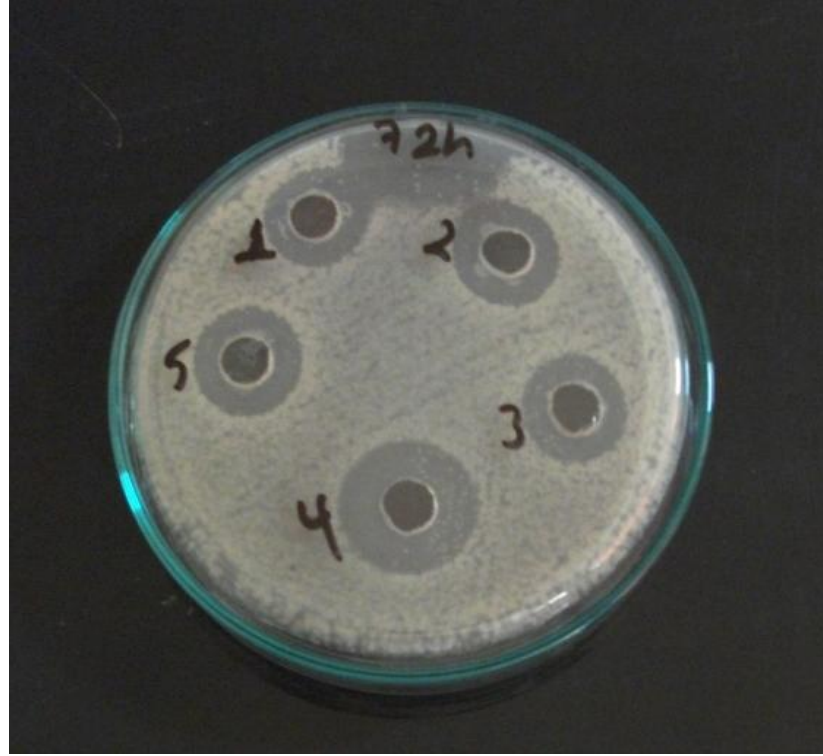
Elde edilen sonuçlara göre, bakteri üremesi denenen her bir pH’ da 72. saatte maksimuma ulaşmıştır (bkz. Şekil 4.11). Farklı pH ortamlarında antibiyotik üretimleri karşılaştırıldığında ise maksimum inhibisyon zonu 72. saatte 23 mm ile pH 7.5’ te ölçülmüştür. pH 6.0 ve 8.0’ de ise 17 mm olarak bulunarak, asidik ve bazik ortamlarda antibiyotik üretiminin fazla düşük olmadığı saptanmıştır (bkz. Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).

Üretim (saat)	pH 6.0		pH 6.5		pH 7.0		pH 7.5		pH 8.0	
	OD ₆₀₀	İnhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	İnhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	İnhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	İnhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	İnhibisyon zonu (mm)
24	0,51	-	0,63	-	0,7	-	0,81	-	0,74	-
48	0,82	-	0,88	-	0,82	-	0,9	-	0,93	-
72	0,97	17	0,99	18	1,03	18	1,2	23	1,12	17
96	0,5	-	0,53	-	0,67	-	0,63	-	0,62	-

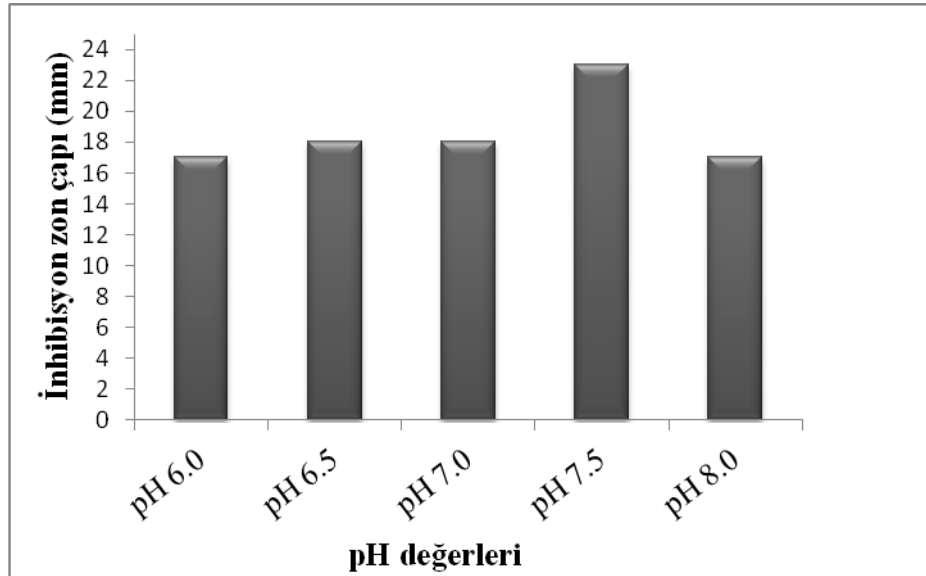
Çizelge 4.4. Farklı pH değerlerinin, *Bacillus* sp. EA62’ nin antibiyotik üretimi ve üremesi üzerine etkileri



Şekil 4.11. Farklı pH değerlerine sahip besi ortamlarında *Bacillus* sp. EA62’ nin zamana bağlı üreme değerleri



Şekil 4.12. Farklı pH değerlerine sahip besi ortamlarında *Bacillus* sp. EA62' nin 72. saatte antibiyotik üretimi (1: pH 6.0, 2: pH 6.5, 3: pH 7.0, 4: pH 7.5, 5: pH 8.0)



Şekil 4.13. 72. saatte farklı pH değerlerine sahip besi ortamlarında *Bacillus* sp. EA62' nin oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması

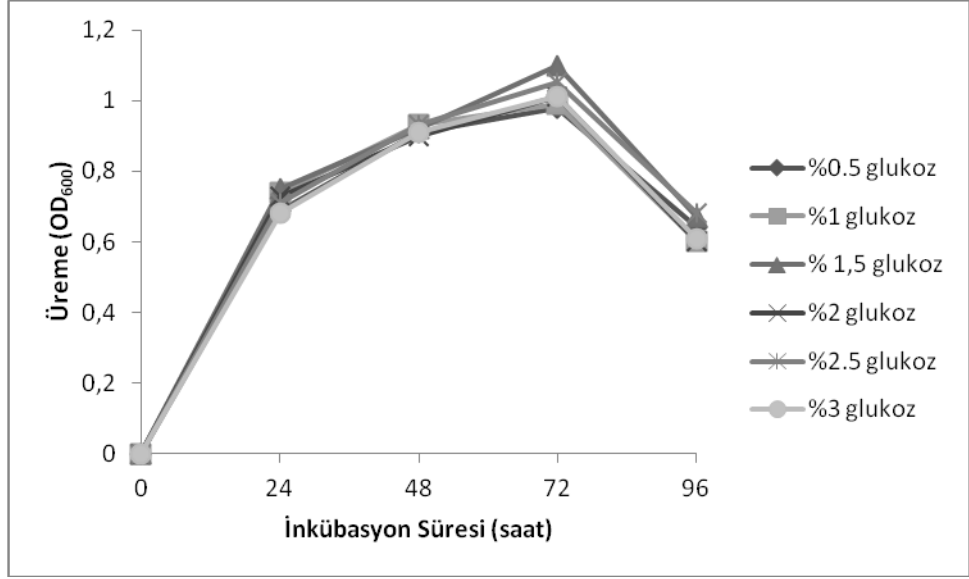
4.6.2. Glukoz konsantrasyonunun etkisi

Besi ortamında karbon kaynağı olarak bulunan Glukoz miktarının değişimine gidilerek besi ortamında % 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 olmak üzere farklı Glukoz konsantrasyonları kullanıldı. Maksimum antibiyotik sentezinin sağlandığı 72. saatte agar kuyu difüzyon metodu ile farklı glukoz konsantrasyonlarının antibiyotik üretimi üzerine etkileri araştırıldı (bkz. Şekil 4.15). Ayrıca 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örneklerde üreme tayini yapıldı (bkz. Çizelge 4.5).

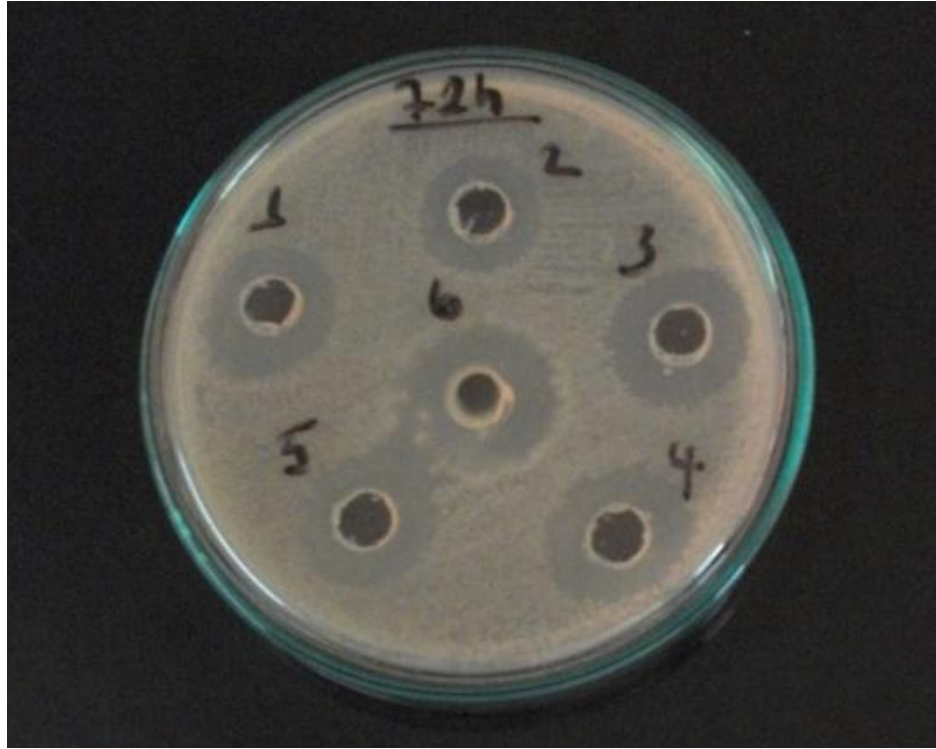
Elde edilen sonuçlara göre, bakteri üremesi denenen her bir glukoz konsantrasyonunda (% 0,5-3) 72. saatte maksimuma ulaşmıştır (bkz. Şekil 4.14). Farklı glukoz konsantrasyonlarında antibiyotik üretimleri karşılaştırıldığında ise maksimum inhibisyon zonu 72. saatte 25 mm ile % 3' lük glukoz konsantrasyonunda ölçüldü (bkz. Şekil 4.15 ve Şekil 4.16). Glukozun % 0,5-2,5 arası konsantrasyonlarındaki inhibisyon zon ölçümlerinde büyük farklılıklar gözlenmedi [%0,5 (19mm), %1 (18 mm), %1,5 (20 mm), %2 (21 mm), %2,5 (20 mm)].

Üretim (saat)	% 0,5 glukoz		% 1 glukoz		% 1,5 glukoz		% 2 glukoz		% 2,5 glukoz		% 3 glukoz	
	OD ₆₀₀	İnhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	İnhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	İnhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	İnhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	İnhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	İnhibisyon zonu (mm)
24	0,69	-	0,74	-	0,75	-	0,73	-	0,71	-	0,68	-
48	0,91	-	0,93	-	0,82	-	0,9	-	0,93	-	0,91	-
72	0,98	19	0,99	18	1,1	20	1,01	21	1,05	20	1,1	25
96	0,64	-	0,6	-	0,67	-	0,6	-	0,68	-	0,61	-

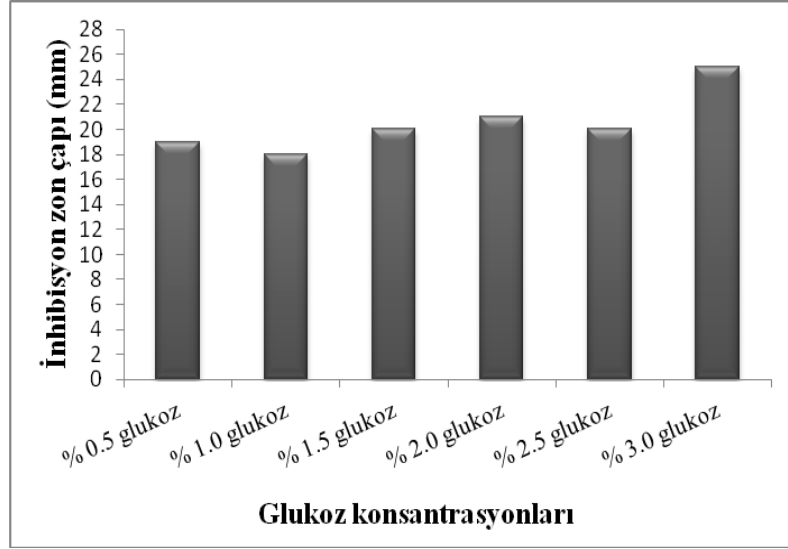
Çizelge 4.5. Farklı glukoz konsantrasyonlarına sahip besi ortamlarının, *Bacillus* sp. EA62' nin antibiyotik üretimi ve üremesi üzerine etkileri



Şekil 4.14. Farklı glukoz konsantrasyonuna sahip besi ortamlarında *Bacillus* sp. EA62' nin zamana bağlı üreme değerleri



Şekil 4.15. 72. saatte farklı glukoz konsantrasyonuna sahip besi ortamlarında *Bacillus* sp. EA62' nin antibiyotik üretimi (1: %0.5 glukoz, 2: %1 glukoz, 3: %1.5 glukoz, 4: %2 glukoz, 5: %2.5 glukoz, 6: %3 glukoz)



Şekil 4.16. 72. saatte farklı glukoz konsantrasyonuna sahip besi ortamlarında *Bacillus* sp. EA62' nin oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması

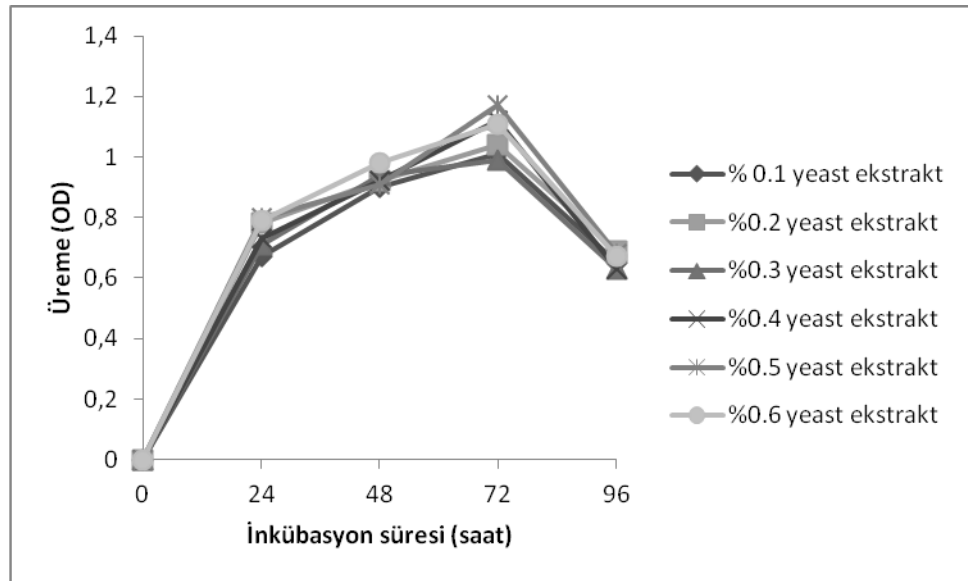
4.6.3. Nitrojen konsantrasyonunun etkisi

Besi ortamında nitrojen kaynağı olarak bulunan Yeast ekstrakt miktarının değişimine gidilerek besi ortamında % 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 olmak üzere farklı konsantrasyonları kullanıldı. Maksimum antibiyotik sentezinin sağlandığı 72. saatte agar kuyu difüzyon metodu ile farklı nitrojen konsantrasyonlarının antibiyotik üretimi üzerine etkileri araştırıldı (bkz. Şekil 4.18). Ayrıca 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örneklerde üreme tayini yapıldı (bkz. Çizelge 4.6).

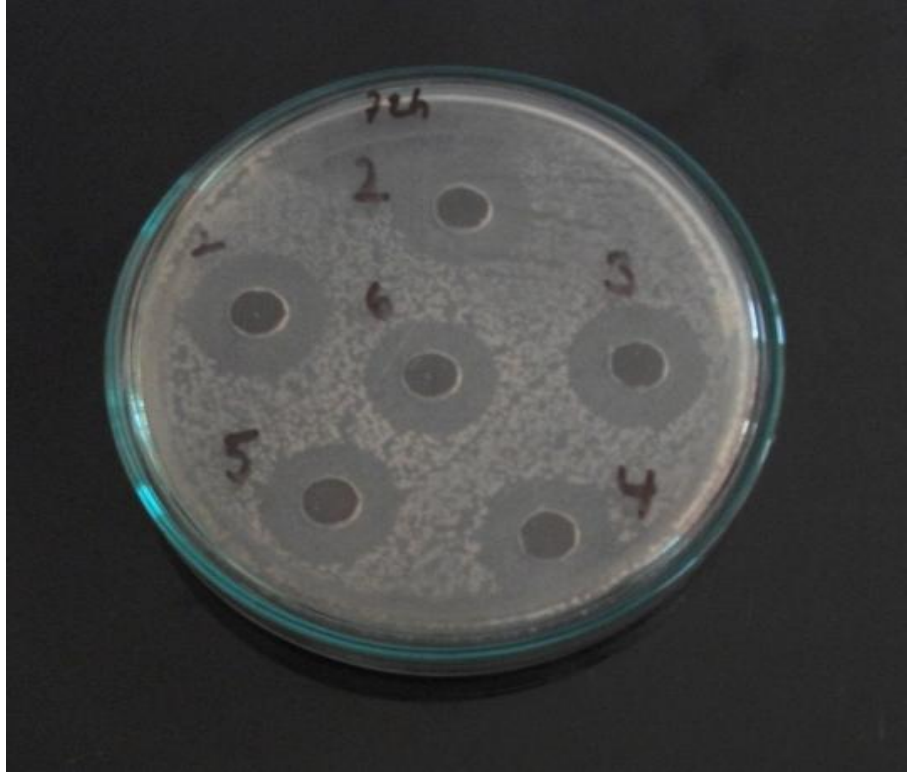
Elde edilen sonuçlara göre, bakteri üremesi denenen her bir yeast ekstrakt konsantrasyonunda (% 0.1-0.6) 72. saatte maksimuma ulaşmıştır (bkz. Şekil 4.17). Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında antibiyotik üretimleri karşılaştırıldığında ise maksimum inhibisyon zonu 72. saatte 23 mm ile % 0.3' lük yeast ekstrakt konsantrasyonunda ölçülmüştür (bkz. Şekil 4.18 ve Şekil 4.19). Yeast ekstraktın düşük ve yüksek konsantrasyonlarında fazla bir etkinin olmadığı saptanmıştır [% 0.1 (21 mm), % 0.2 (21 mm), % 0.3 (23 mm), % 0.4 (22 mm), % 0.5 (22 mm), % 0.6 (21 mm)].

Üretim (saat)	% 0,1 yeast ekstrakt		% 0,2 yeast ekstrakt		% 0,3 yeast ekstrakt		% 0,4 yeast ekstrakt		% 0,5 yeast ekstrakt		% 0,6 yeast ekstrakt	
	OD ₆₀₀	inhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	inhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	inhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	inhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	inhibisyon zonu (mm)	OD ₆₀₀	inhibisyon zonu (mm)
24	0,67	-	0,78	-	0,71	-	0,73	-	0,8	-	0,79	-
48	0,9	-	0,92	-	0,94	-	0,92	-	0,91	-	0,98	-
72	1,01	21	1,04	21	0,99	23	1,12	22	1,17	22	1,11	21
96	0,65	-	0,69	-	0,63	-	0,63	-	0,68	-	0,67	-

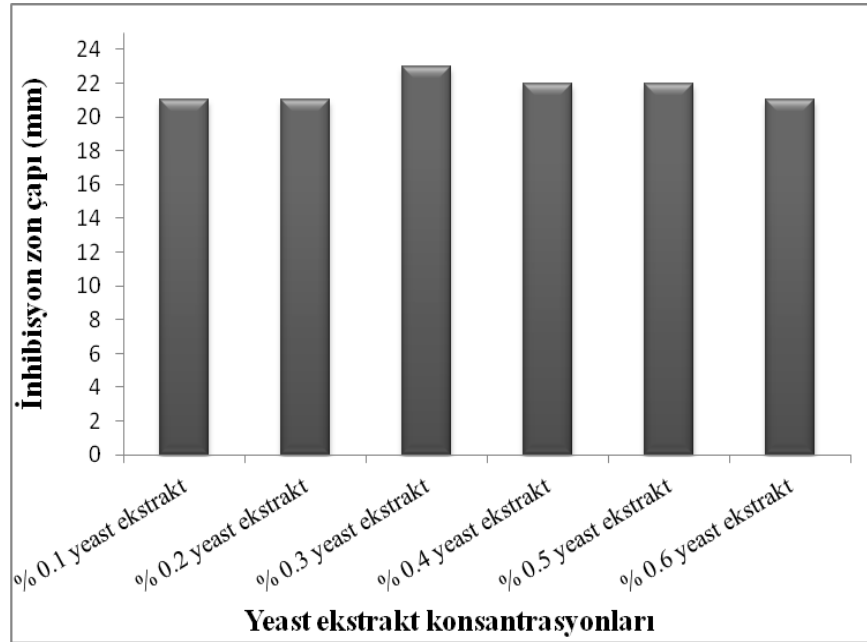
Çizelge 4.6. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarına sahip besi ortamlarının *Bacillus* sp. EA62' nin antibiyotik üretimi ve üremesi üzerine etkileri



Şekil 4.17. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonuna sahip besi ortamlarında *Bacillus* sp. EA62' nin zamana bağlı üreme değerleri



Şekil 4.18. 72. saatte farklı yeast ekstrakt konsantrasyonuna sahip besi ortamlarında *Bacillus* sp. EA62' nin antibiyotik üretimi (1: %0.1 yeast ekstrakt, 2: %0.2 yeast ekstrakt, 3: %0.3 yeast ekstrakt, 4: %0.4 yeast ekstrakt, 5: %0.5 yeast ekstrakt, 6: %0.6 yeast ekstrakt)



Şekil 4.19. 72. saatte farklı yeast ekstrakt konsantrasyonuna sahip besi ortamlarında *Bacillus* sp. EA62' nin oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisindeki en önemli sorun, antibiyotiklerin dünyada gelişigüzel ve yaygın olarak kullanılmasından dolayı, antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların varlığıdır. Bu nedenle, son yıllarda etki alanı geniş ve güçlü antibiyotikler üreten yeni mikroorganizma tiplerinin doğadan araştırılması önem kazanmıştır (Demain 1999).

Antibiyotik üreten mikroorganizmalar daha çok Bacillaceae, Actinomycetales ve Mycophyta grubunda yer almaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, özellikle Bacillaceae familyasından *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların antibiyotik üretme kapasitesinin yüksek olduğu bildirilmektedir.

Yapılan bu çalışmada Türkiye topraklarından antibiyotik potent olarak değerlendirilen toplam 57 bakteri izole edilmiştir. Bu bakterilerin *Bacillus* cinsi olup olmadığını belirlemek üzere yapılan çalışmalarda 52 bakterinin *Bacillus*' un karakteristik özelliklerini gösterdiği, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'e (Buchanan ve Gibbons 1974) göre yapılan morfolojik ve biyokimyasal testler sonucunda tespit edilmiştir. *Bacillus* cinsi olduğunu tespit ettiğimiz bakterilerde antibiyotik taraması yapılmış ve 25 adedinin çalışmada kullanılan farklı test bakterilerine karşı inhibisyon zonu verdiği gözlenmiştir. En büyük inhibisyon zonu *Shigella sonnei* test bakterisine karşı gösteren 1 adet *Bacillus* sp. bakterisi seçilmiş ve Balıkesir toprağından elde ettiğimiz bu bakteri *Bacillus* sp. EA62 olarak adlandırılmıştır.

Bacillus sp. EA62' nin 6 farklı içerikli üreme ortamında antibiyotik üretim kapasitesi araştırılmış ve en iyi sonuç veren 1 adet ortam seçilerek deneylere bu ortam (Besiyeri 5) ile devam edilmiştir. Aynı zamanda antibiyotik üretiminin maksimum olduğu inkübasyon zamanı da saptanmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre bakteri üremesinin ve antibiyotik üretiminin maksimum olduğu zaman 72. saat olarak belirlenmiştir. İnhibisyon zonu *Shigella sonnei*' ye karşı 15 mm olarak ölçülmüştür. Bakterinin antibiyotik üretimi 24. saatte başladığı ancak durağan faz olan 72. saatte maksimuma ulaştığı, 96. saatte ise üretimin azaldığı (12 mm) saptanmıştır. Dolayısıyla 72. saatin bakteri üremesinin durağan ve 96. saatin ise

ölüm fazı olduğu saptanmıştır. Benzer sonuçlar Kalpana ve ark. (2010) *Bacillus laterosporus*' ta ve Hasan ve ark. (2009) *Bacillus pumilus*' te maksimum antibiyotik üretim zamanını 72. saat olarak belirtilmiştir. Kalpana ve ark. (2010), antibakteriyel aktivitenin ilk olarak 24. saatte gözlemlendiğini, 72. saatte maksimuma ulaştığını ve 96-120 saatleri arasında ise bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Hosoya ve ark. (1998), antibiyotik sentezinin logaritmik faz sonu ile durağan faz arasında başladığını belirtmektedir. Hasan ve ark. (2009)' da çalışmalarında 72. saate kadar üretim yapmış ve maksimum antibiyotik üretiminin serbest *Bacillus pumilus* SAF1 hücresinde *M. luteus* (ATCC # 10240)' a karşı 24 mm ve immobilize *Bacillus pumilus* SAF1 hücresinde ise *S. aureus* (ATCC # 6538)' a karşı 22 mm' lik inhibisyon zonu ile 72. saatte olduğunu bildirmişlerdir.

Buna karşın, Awais ve ark. (2007) ise, *Bacillus pumilus*' ta Basitrasin antibiyotiğinin 0-144 saatleri arasında üretimi yaparak inkübasyon zamanının etkisini araştırmışlardır. Çalışmamızdan farklı olarak maksimum inhibisyon zonlarını *Staphylococcus aureus* (19 mm) ve *Micrococcus luteus* (17 mm)' a karşı 24. saatte elde ettiklerini ve 24. saatten 144. saate kadar kademeli bir şekilde giderek düştüğünü belirtmişlerdir. Haavik (1974), *Bacillus licheniformis* ATCC 14580' nin sadece logaritmik faz sırasında basitrasin ürettiğini rapor etmiştir. Buna karşın Egorov ve ark. (1986), basitrasin sentezinde maksimum verimin logaritmik faz sonunda ve sporulasyonun başlangıcında elde edildiğini bildirmişlerdir. 20 saatlik vejetatif *B. licheniformis* kültürü maksimum basitrasin ürünü vermiştir (Yousaf 1997). Diğer yandan, Muhammad ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada termofilik *Bacillus* türlerinde maksimum inhibisyon zonlarını *Staphylococcus aureus* (24 mm) ve *Micrococcus luteus* (22 mm)' a karşı 48. saatte elde ettiklerini ve 48. saatten sonra ise kademeli bir şekilde düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Benzer olarak Muazz ve ark. (2007), *Bacillus subtilis* MZ-7' de inhibitör bileşiklerin konsantrasyonunun 48. saatte maksimuma ulaştığını bildirmişlerdir.

Genel olarak *Bacillus*' larda antibiyotik üretim zamanı 24-72 saatlerde olmaktadır. Maksimum antibiyotik üretim zamanlarının farklı saatlerde bulunması *Bacillus* türüne göre değişmektedir. Bu da metabolik yollarının farklı oluşu ile ifade edilebilir.

Üretim ortamının içeriği ve ortam pH'ının antibiyotik üretimi üzerine etkili olduğu bilinmektedir (Leifert ve ark. 1995). Özellikle besiyeri içeriğinde karbon ve azot kaynakları antibiyotik üretiminde önemli kaynaklardır (Gupte ve Kulkarni 2002). Antibiyotik üretimi genellikle üretim ortamındaki kolay tüketilen karbon kaynakları ortamda bittiği zaman aktive edilmektedir (Iwai ve Omura 1982). Kolayca parçalanabilen karbon kaynaklarının etkisinin enzimatik süreçlerin katabolit represyonu tarafından kontrol edildiği ve bunların yüksek konsantrasyonlarının polipeptid antibiyotiklerin enzimatik sentezini azalttığı ya da inhibe ettiği bildirilmiştir (Haavik 1974). Bazı mikroorganizmalarda ise, glukozun inhibitör etkisi, pH'ındaki azalma ile ilgili görülmüştür. Bu azalma, organik asitlerin ortamda birikmesi sonucu oluşan asidifikasyondan dolayı meydana geldiği belirtilmiştir (Espeso ve ark. 1993). Karbon kaynağı olarak kullanılan şekerler arasında glukozun antibiyotik üretiminde en iyi kaynak olduğu ifade edilmektedir (Yousaf 1997). Bu amaçla yeni izole ettiğimiz *Bacillus* sp. EA62 bakterisinin antibiyotik üretimi üzerine karbon kaynağının etkisini araştırmak üzere glukozun % 0.5-3 arasında farklı konsantrasyonları denenmiştir. Yapılan çalışmalarda *Shigella sonnei*'ye karşı en büyük inhibisyon zon çapı 25 mm ile %3' lük glukoz konsantrasyonuna sahip besi ortamında gözlenmiştir. Glukozun % 0.5-2.5 arası konsantrasyonlarındaki inhibisyon zon ölçümlerinde büyük farklılıklar gözlenmemiştir [%0.5 (19mm), %1 (18mm), %1.5 (20mm), %2 (21mm), %2.5 (20mm)].

Benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir. Hasan ve ark. (2009), serbest ve immobilize *Bacillus pumilus* tarafından antimikrobiyal bileşiklerin üretimi üzerine farklı glukoz konsantrasyonlarının (%1-5) etkisini incelemiş ve maksimum inhibisyon zonlarının *S. aureus* (32 mm) ve *M. luteus*'a karşı (24 mm) %3' lük glukoz konsantrasyonunda elde ettiklerini bildirmişlerdir. Srinivasulu ve ark. (2003) ise, kalsiyum alginatta immobilize olmuş *Streptomyces marinensis* NUV-5 hücrelerinde neomisin üretiminin %3 maltoz konsantrasyonunda daha fazla olduğunu ifade etmişlerdir.

Bunlardan farklı olarak, Awais ve ark. (2007) tarafından *Bacillus pumilus* ve *B. subtilis*'te basitrasin antibiyotiğinin üretimi üzerine farklı glukoz miktarlarının (%1-5) etkisi

incelenmiştir. En iyi aktivitenin (26 mm) *M. luteus*' a karşı %5' lik glukoz konsantrasyonunda, *S. aureus*' a karşı ise (21 mm) % 4' lük glukoz konsantrasyonunda elde edildiği bildirilmişlerdir. Bunların yanı sıra *B. subtilis*' te, *M. luteus*' a karşı %1' lik glukoz konsantrasyonunda en iyi aktivite (19 mm) elde edilirken, *S. aureus*' a karşı bir inhibisyonun olmadığı bildirilmiştir.

Muhammad ve ark. (2009), termofilik *Bacillus* türlerinde farklı glukoz konsantrasyonlarının (% 0.25-3.0) antibiyotik üretimi üzerine etkisini araştırmıştır. En iyi antimikrobiyal aktivitenin *Staphylococcus aureus* (22 mm) ve *Micrococcus luteus*' a karşı (26 mm) %2 glukoz konsantrasyonunda olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda artan glukoz konsantrasyonlarında antibiyotik üretimi üzerine pozitif bir etkinin olduğunu ifade etmektedirler.

Haddar ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada basitrasın üretimi için gliserol, glukoz, sükroz, sitrik asit ve nişasta gibi farklı karbon kaynakları kullanmıştır. En fazla etkiyi %2 gliserol ile elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Kamat ve ark. (2011), maksimum antibiyotik üretimini, karbon kaynağı olarak dekstroz içeren ortamda elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Karbon kaynağının yanı sıra nitrojen kaynağı da antibiyotik üretiminde önemli bir faktördür. Nitrojen kaynağı olarak Glutamik asit ve Alanin' in antibiyotik üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Amino asitler hızlıca tüketilen kaynaklardır ve mikrobiyal metabolizma için önemlidirler. Çünkü protein ve polipeptidlerin yapı taşlarını oluşturmaktadırlar (Egorov 1985). Amino asit konsantrasyonunun artışı ile antibiyotik üretimi azalmaktadır. Bu da muhtemelen bakteri hücrelerine girebilmek için membran reseptörlerindeki amino asit molekülleri arasındaki rekabetten dolayıdır (Al-Khafaji 1990).

Bu amaçla yeni izole ettiğimiz *Bacillus* sp. EA62 bakterisinin antibiyotik üretimi üzerine nitrojen kaynağının konsantrasyonlarının etkilerini araştırmak üzere besiyeri içeriğindeki yeast ekstraktın (%0.1-0.6) farklı konsantrasyonları denenmiştir. Yapılan çalışmada *Shigella sonnei*' ye karşı en büyük inhibisyon zonununun 23 mm ile % 0.3

Yeast ekstrakt konsantrasyonunda olduğu belirlenmiştir. Yeast ekstraktın düşük ve yüksek konsantrasyonlarında fazla bir etkinin olmadığı saptanmıştır (21-22 mm). Oysaki yapılan bir çalışmada nitrojen konsantrasyonunun antibiyotik üretimini etkilemekte olduğunu ve artan konsantrasyonda antibiyotik üretiminin de arttığı bildirilmiştir (Muhammad ve ark. 2009). Bu bilim adamları, termofilik *Bacillus* türlerinde besi ortamında nitrojen kaynağı olarak kullandığı glutamik asitin farklı konsantrasyonlarının (% 0.25, 0.5, 1, 1.5 ve 2) antibiyotik üretimi üzerine etkisini araştırmıştır ve en iyi aktivitenin %1.5 glutamik asit konsantrasyonunda ve maksimum inhibisyon zonunun *Staphylococcus aureus* (22 mm) ve *Micrococcus luteus* ' a karşı (26 mm) olduğunu gözlemlemişlerdir.

Hanlon ve Hodges (1981), yaptıkları çalışmada *B. licheniformis* ' in 0.01 M glutamik asit konsantrasyonu içeren besi ortamında maksimum antibiyotik ürettiğini bildirirken, Haddar ve ark. (2007) ise maksimum antibiyotik aktivitesini (134.3 units mL⁻¹) % 0.05 glutamik asit konsantrasyonunda elde etmişlerdir.

Farklı glukoz ve nitrojen konsantrasyonlarının antibiyotik üretimi üzerine etkisini araştıran çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesi, kullanılan mikroorganizma çeşidine ve ortamdaki diğer bileşenlerin etkileşimlerine bağlı olarak değişmektedir. Dolayısıyla bu da göstermektedir ki, mikroorganizmaların kullandığı metabolik yollar farklı olabilmektedir. Çünkü, biyosentetik yollardaki farklılık antibiyotik üretimini etkileyebilir.

Mikroorganizmalardan antibiyotik üretimi üzerine ortam pH'sının etkisi önemlidir. pH' daki değişiklikler sekonder metabolitlerin biyosentezinin düzenlenmesi gibi çoğu hücresel işlemleri etkileyebilmektedir (Solé ve ark. 1997).

Çalışmamızda, pH değerinin antibiyotik üretimini ne yönde etkilediğini belirlemek amacıyla farklı pH değerlerinde (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0) ortamlar hazırlanmış ve elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek antibiyotik üretimi *Shigella sonnei* ' ye karşı 23 mm inhibisyon zonu ile pH 7.5' de gözlenmiştir. Asidik ve bazik koşulların antibiyotik üretimi üzerine negatif bir etki etmediği gözlenmektedir. pH 6.0 ve pH 8.0' de inhibisyon zonlarının aynı olması (17 mm), mikroorganizmanın her iki ortamda da

üretim yapabildiğini göstermektedir. Sonuçlarımıza benzer olarak Chiba ve ark. (1999), antibiyotik üretiminin genel olarak 6.0-7.5 pH aralığında gerçekleştiğini ve alkali ortamın asidik ortama nazaran daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Buna karşın, Hasan ve ark. (2009), serbest ve immobilize *Bacillus pumilus* SAF1 tarafından antimikrobiyal bileşiklerin üretimi üzerine farklı pH değerlerinin etkisini araştırmıştır. Maksimum inhibisyon zonunu *M. luteus* (30 mm) ve *S. aureus* (32 mm) karşı pH 7.0' de elde ettiklerini bildirmişlerdir. Benzer olarak Yousaf (1997)' da *B. licheniformis*' ten maksimum basitrasın üretiminin pH 7.0' de olduğunu bildirmişlerdir.

Diğer yandan, Anker ve ark. (1947), maksimum basitrasın üretimin pH 7.8 ve 8.0 olduğunu belirtirken, Iglewski ve Gerhardt (1978), *Bacillus subtilis*' te *Proteus vulgaris*' e karşı 5.7 ile 6.8 pH aralıklarında antimikrobiyal aktivite elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Farklı bir sonuç olarak, Kalpana ve ark. (2010), pH' nın antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkilerini araştırmak üzere 5.5-8.0 pH aralıklarını kullanmıştır. Antibiyotik üretimi için optimum pH' nın 7.0-7.5' te 32 mm' lik inhibisyon zonu ile *Staphylococcus aureus*' a karşı gözlemlemişlerdir.

pH 4.0-9.0 aralıklarında antibiyotik üretimi yapan Muhammad ve ark. (2009) ise, en iyi aktivitenin sırasıyla pH 5.0 ve 4.0' te olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra, pH' nın artmasıyla beraber aktivitede düşüş olduğunu ve minimum aktiviteyi pH 9.0' da elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Başka bir çalışmada, *Bacillus pumilis*, *M. luteus*' a karşı pH 8.0' de maksimum aktivite gösterirken (18 mm) ve *Bacillus subtilis*' in ise pH 9.0 değerinde (15 mm) gösterdiği bildirilmektedir (Awais ve ark. 2007).

Bacillus antibiyotikleri genel olarak sporulasyonun erken basamağında üretilmektedirler (Hasan ve ark. 2009). Antibiyotik üretimi ile sporulasyon arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yaptığımız araştırmalarda 24, 48 ve 72. saatlerde üremenin artışı ve sporulasyonun da kısmen artışına paralel olarak antibiyotik üretiminde bir artış saptanmıştır. 96. saatte antibiyotik üretiminde düşüş, sporulasyonda ise artış olduğu

belirlenmiştir. 96. saat ölüm fazı olarak değerlendirilmiş ve bu fazda sporulasyon doğal olarak artacaktır. Yaptığımız çalışmada da antibiyotik üretimi ile sporulasyonun erken safhasında antibiyotik üretiminin fazla olması sporulasyon ile antibiyotik üretimi arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamıza benzer olarak Katz ve Demain (1977) yaptıkları çalışmalarda sporulasyon gibi antibiyotik üretiminde logaritmik faz sonu ya da durağan fazda gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Peptid antibiyotiklerin biyolojik rolleriyle ilgili bir çalışmada sporulasyon sırasında çoğu durumda antibiyotiklerin, bakteriyel üreme döngüsünün aynı noktasında ve sporlanmanın başladığı koşullar altında üretilmekte olduğunu göstermektedir (Majumdar ve ark. 1986, Nakano ve Zuber 1990).

Nam ve Ryu (1985), çalışmalarında *Bacillus circulans*' ta Butirosin üretimi ile sporulasyon arasında ilişki olduğunu belirlemiş ve sporulasyon mutanti suşlarda antibiyotik aktivitesi olmadığını göstermişlerdir. Bu gözlemlerin antibiyotik üretimi ile sporulasyon arasındaki ilişkiyi desteklediğini ifade etmektedirler. Bu durum, paralel düzenleyici metabolik yolların varlığını açıklamaktadır. Fakat bu hipotez bazı bilim adamları tarafından kabul görmemiştir (Modest ve ark. 1984). Moita ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada antifungal metabolit üretimi ile sporulasyon arasında bir korelasyon olmadığını ve spor üretimi için optimum inkübasyon koşullarının, antibiyotik üretimini teşvik eden koşullarla aynı olmadığını rapor etmişlerdir. Buna benzer olarak Chevanet ve ark. (1986) ve Hanlon ve ark. (1981) da benzer sonuçları elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi literatürlerde *Bacillus* türlerinden elde edilen antibiyotikler ile ilgili çok çeşitli sonuçlar bildirilmektedir ve bu da bize *Bacillus* türlerinin çok çeşitli özelliklerde antibiyotiklere sahip olduklarını göstermektedir.

Bu çalışmada; Türkiye' nin 25 farklı ilinden alınan toprak örneklerinden 57 adet antibiyotik üreten bakteri izole edilmiştir. 57 bakterinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri araştırılmış ve 52 bakteri *Bacillus* cinsi olarak belirlenmiştir.

Bacillus türleri antibiyotik üretimi için taranmış ve 25 test mikroorganizmaları üzerinde etkili olduğunu görülmüştür. *Shigella sonnei* ile en büyük inhibisyon zonuna (25 mm)

sahip *Bacillus*' un bir suşu seçilmiş ve *Bacillus* sp. EA62 olarak isimlendirilmiştir. Bu bakteri 6 farklı antibiyotik üretim ortamında üretilerek en iyi üretimin sağlandığı zaman ve besiyeri belirlenmiştir.

Antibiyotik üretimi üzerine bazı parametrelerin etkisine bakılmış bu amaçla, inkübasyon zamanı, pH, glukoz ve nitrojen konsantrasyonları denenmiştir. Seçilen izolattan antibiyotik üretimi için optimum koşullar 72. saat (15 mm), pH 7.5 (23 mm), % 3 glukoz (25 mm) ve % 0.3 yeast ekstrakt (23 mm) olarak bulunmuştur.

Antibiyotik üretimi ile sporulasyon arasındaki ilişki araştırılmıştır. Buna göre, antibiyotik üretimindeki artış ile sporulasyonun paralel olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, yapılan yüksek lisans tezinde yeni izole edilmiş bir izolatan yüksek oranda antibiyotik üretim kapasitesi saptanmıştır. Bu çalışma ilaç endüstrisine ışık tutacak katkılar sağlayabilir. Bu konuda ülkemizde yeterli çalışma olmadığından antibiyotik üreten yeni izolatların keşfi çalışmalara öncülük edebilir.

KAYNAKLAR

- Agathos, S.N., Demain, A.L. 1988.** The In Vivo Longevity of Antibiotic Synthetases, Horizons of Biochemical Engineering, edited by S. Aiba, Oxford University Press, Oxford.
- Ainsworth, G.C., Brown, A.M. and Brownlee, G. 1947.** Aerosporin, an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* Greer, *Nature*, 160:263.
- Al-Khafaji, Z.M. 1990.** Growth and nutritional requirements for industrially important microorganisms in biotechnology. University of Baghdad.
- Anker, H.S., Johnson, B.A., Goldberg, J. and Meleney, F.L. 1947.** Bacitracin: methods of production, concentration, and partial purification. *Bacteriology*, 55: 251-249.
- Anonim, 2005.** Fermentation technology, http://www.ensymm.com/pdf/ensymm_fermentation_abstract.pdf- (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2008.** The antibiotic pipeline, www.rff.org/RFF/Documents/ETC-06.pdf- Erişim Tarihi: 2008).
- Anonim, 2012.** Protein biyosentezi, http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_biyosentezi- (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Prontosil, <http://en.wikipedia.org/wiki/Prontosil>- (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Penicillin, <http://en.wikipedia.org/wiki/Penicillin>-(Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Hall of Fame, http://www.invent.org/hall_of_fame/32.html- (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** GlaxoSmithKline, <http://en.wikipedia.org/wiki/GlaxoSmithKline#History>- (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Nonribosomal Peptide Synthetases, <http://linux1.nii.res.in/~zeeshan/nrps.html>- (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Functional genome analysis of the plant-growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42; characterizing its production and regulation of nonribosomal peptide synthetases, <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/koumoutsis-alexandra-2006-12-04/HTML/chapter1.html>- (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Sporulasyon aşamaları. <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap04/lecture8.htm>- (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Endospore, <http://en.wikipedia.org/wiki/Endospore>- (Erişim Tarihi: 2012).

- Anonim, 2012.** Tiedosto:Bacitracin, <http://www.fi.wikipedia.org/wiki/Tiedosto:Bacitracin.png>- (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Gramicidin, <http://www.usermeds.com/medications/gramicidin->(Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Mycobacillin, <http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacillin-> (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Tyrocidine,<http://chem257.pbworks.com/w/page/15645836/Tyrocidine->(Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Quarterly Chemical Report: Lichenysin A and Surfactin http://www.acschemtox.org/inside/Pages/newsletter_12-09.aspx- (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Bacilycin, <http://www.guidechem.com/dictionary/1395-22-8.html->(Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Subtilin, <http://www.guidechem.com/cas-139/1393-38-0.html-> (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** İturins, <http://blogs.princeton.edu> - (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Zwittermicin, http://en.wikipedia.org/wiki/Zwittermicin_A - (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Bactibase, <http://bactibase.pfba-lab-tun.org-> (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Polymyxin, <http://www.antibioticslist.com/polymyxin-m.html> - (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Antibiotic Sensitivity, <http://biologyonline.us/Microbiology->(Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** <http://archive.microbelibrary.org/edzine/details.asp?id=1796&Lang=-> (Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Disc Diffusion method, <http://www.kmle.co.kr/search.php?Search=disk+diffusion+method&Page=2->(Erişim Tarihi: 2012).
- Anonim, 2012.** Türkiye İl Haritası. <http://www.turkeywrestling.com/haber-23-il-temsilcilerimiz.html-> (Erişim Tarihi: 2012)
- Arai, T., Kuroda, S and Mikami, Y. 1976.** Classification of Actinomycetes with Reference to Antibiotics Production In Actinomycetes. The Boundary Microorganisms. Editors: T. Arai, Toppan Company Limited, Tokyo-Singapor, P:543-651.
- Aslım, B., Sağlam, N. and Beyath, Y. 2002.** Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil, *Turkish Journal of Biology*, 26:41-48.

Awais, M., Shah, A.A., Hameed, A. and Hasan, F. 2007. Isolation, Identification and Optimization of Bacitracin Produced by *Bacillus* sp. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 39(4): 1303-1312.

Awais, M., Pervez, A., Yaqub, A. and Shah, M.M. 2010. Production of Antimicrobial Metabolites by *Bacillus subtilis* Immobilized in Polyacrylamide Gel. *Pakistan J. Zool.*, 42(3):267-275.

Ayhan, K. 2000. Gıdalarda Bulunana Mikroorganizmalar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendiliği Bölüm Yayını Sim Matbacılık Ltd., Ankara. S:43-44.

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

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

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

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

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

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

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

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

Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. (Eighth edition), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, P:747-842.78.

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

Carvalho, A.L.U., Oliveira, F.H.P.C., Mariano, R.L.R., Gouveia, E.R. and Souto-Maior, A.M. 2010. Growth, Sporulation and Production of Bioactive Compounds by *Bacillus subtilis* R14. *Recife - PE – Brasil* 53(3):643-652.

Chatterjee, S., Phansalker, S., Mahesh, S., Rupa, R.H. and Ganguly, B.N. 1992. Mersacidin a new antibiotic from *Bacillus* fermentation, isolation, purification and chemical characterization. *J. Antibiot.* 45: 832-838.

Chatterjee, S., Chatterjee, D.K.,Jani, R.H., Blumbach, J., Ganguli, B.N., Klesel, N., Limbert, M. and Seibert, G. 1992. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. In vitro and in vivo antibacterial activity, *The Journal of Antibiotics*,45(6):839-845.

Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Salama, K., Hassen, A., Jaoua, S. and Boudabous, A. 2001. Thuricin 7: a novel bacteriosin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Applied Microbiology*, 32:243-247.

Chevanet, C., Besson, F., and Michel, G. 1986. Effect of various growth conditions on spore formation and bacillomycin L production in *Bacillus subtilis*. *Canadian Journal of Microbiology* 32, 254–258.

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

Conlon, J.M., Al-Ghaferi, N., Abraham, B., Sonnevend, A., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., Vaudry, H. and Iwamuro, S. 2006. Antimicrobial peptides from the skin of the Tsushima brown frog *Rana tsushimensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 143: 42-49.

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

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

Çotuk, A. 2003. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri. Nobel Tıp Kitapevleri LTD.ST_. 79-92.

Demain, A.L., Aharonowitz, Y. and Martin, J.F. 1983. Metabolite control of secondary biosynthetic pathways. *In: Vining LC (Ed.), Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics.* Addison-Wesley, London, P:49-67.

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

Derderian, S.L. 2007. Alexander Fleming's Miraculous Discovery of Penicillin Undergraduate Student, B.A. in Mathematics Program, Rivier College Rivier *Academic Journal*, 3(2).

Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1):47-64.

- Domagh, G. 1935.** Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln. *Dtsch Med Wochenschr* 829: 61.
- Drablos, F., Nicholson, D. and Ronning, M. 1999.** EXAFS study of zinc coordination in Bacitracin A, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1431, 433-442.
- Drautz, H., Reuschenbach, P. and Zahner, H. 1985.** Metabolic Products of Microorganisms. 225 Elloramycin. A new anthracyclin-like antibiotic from *Streptomyces olivaceus*. Isolation Characterization Structure and Biological Properties. *The Journal of Antibiotics*. 38:1291-1301.
- Egorov, N.S. 1985.** Antibiotics: A Scientific Approach. Mir Publishers. Moscow.
- Egorov, N.S., Z. Loria, S.N. Vybornykh and Khamrun, R. 1986.** Effect of culture medium composition on bacitracin synthesis and sporulation in *Bacillus licheniformis* 28 KA. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 22: 107-111.
- Eltem, R. Ve Uçar, F. 1998.** Bir soda gölü olan Denizli Acıgöl'den izole edilmiş 23 *Bacillus* suşunun antimikrobiyal aktivite spektrumlarının saptanması, *KÜKEM Dergisi*, 21, 1, S:57-64.
- Espeso, E.A., J. Tilburn, H.N. Arts and Peñalva, M.A. 1993.** pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.*, 12: 3947-3956.
- Emmerich, R. and Löw, O. 1899.** Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. *Zeitschr. F. Hygiene* 31:1-65.
- Galvez, A., Maqueda, M., Cordovilla, P., Martinez-Bueno, M., Lebbadi, M. and Valdivia, E. 1994.** Characterization and biological activity against *Naegleria fowleri* of amonebicins produced by *Bacillus licheniformis* D-13, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(6):1314-1319.
- Garrity, G.M. 2004.** Taxonomic Outline of the prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic bacteriology. Second Edition, Release 5.0, *Springer-Verlag*, New York. P:529-531.
- Gesheva, V., Ivanova, V. and Gesheva, R. 2005.** Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol.Reds.*, 160: 243-248.
- Gevers, W., Kleinkauf, H. and Lipmann, F. 1969.** Peptidyl transfers in gramicidin S biosynthesis from enzyme bound thioester intermediates. Proceedings of the National Academy of Science USA 63:35-42.
- Gupte, M.D. and Kulkarni, P.L. 2002.** A study of antifungal antibiotic production by *Streptomyces chattanoogensis* MTCC 3423 using full factorial design. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35:22-26.

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

Hanlon, G. W. and Hodges, N. A. 1981. Requirement for glucose during production of extracellular serine protease by cultures of *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters* 11, 5 1-54.

Hanlon, G.W., Hodges, N.A. and Russell A.D. 1982. The Influence of Glucose, Ammonium and Magnesium Availability on the Production of Protease and Bacitracin by *Bacillus licheniformis*. *Journal of General Microbiology*, 128:845-85.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Jensen M.J. and Wright, D.N. 1997.** Chemotherapeutic agents. In: Microbiology for the health sciences, pp 132-145. Prentice Hall, New York.
- Kajimura, Y., Sugiyama, M. and Kaneda, M. 1995.** Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2, *Journal of Antibiotics*, 48(10):1095-1103.
- Kalpana, S., Bagudo, A.I. and Aliero, A.A. 2010.** Effect of Inhibitory Spectrum and Physical Conditions on the Production of Antibiotic Substance from *Bacillus laterosporus* ST-1. *Nigerian Journal of Microbiology*, vol. 24(1): 2134 – 2139.
- Kamat, T.K., Kiran, S. and Kerkar, S. 2011.** Antimicrobial potential of *Bacillus maiismortui*, a salt pan isolate of cavellosim, goa, India. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. Vol 2, Issue 3, pp 321-328
- Katz, E. and Demain, A.C. 1977.** The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.*, 41, 449.
- Kirby, W.M.M., Yoshihara, G.M., Sundsted, K.S. and Warren, J.H. 1957.** Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. *Antibiotics Annu.* 1956-1957:892.
- Klein, C., Kaletta, N. and Entain, K.D. 1992.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 1, 132.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M. 1992.** Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, ed. 4. Philadelphia: JB Lippincott, P:447, 449, 459, 548.
- Kresge, N., Simoni, R.D. and Hill, R.H. 1942.** Selman Waksman: the Father of Antibiotics The Chemical Nature of Actinomycin, an Anti-microbial Substance Produced by Actinomyces Antibioticus (Waksman, S.A., and Tishler, M.) *J. Biol. Chem.* 142, 519-528.
- Kumazawa, J. and Yagisawa, M. 2002.** The history of antibiotics: The Japanese story *J Infect Chemother* 8:125–133.
- Kwaguchi, H., Naito, T. and Nakagawa, S. 1978.** BBK 8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *J Antibiot* (Tokyo), 25: 925.
- Laland, S.G. and Zimmer, T. 1984.** Synthesis of peptid antibiotics by the thiotemplate mechanism, *Biologically Active Principles of Natural Products*, editors: W. Voelter and D. G. Daves, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Lancini, G., Parenti, F. and Gallo, G.G. 1995.** Antibiotics: A Multidisciplinary Approach. Plenum Pres, New Tork and London.

- Mincey, B.A. and Parkulo, M.A. 2001.** Current Concepts. Antibiotic Prescribing Practices in a Teaching Clinic: Comparison of resident and staff physicians. *Southern Medical Journal* 94:365-369.
- Modest, B., Marahiel, M.A., Pschorn, W. and Ristow, H. 1984.** *J. Gen. Microbiol.*, 130, 747.
- Moita, C., Feio, S.S., Nunes, L., Curto, M.J.M. and Roseiro, J.C. 2005.** Optimisation of physical factors on the production of active metabolites by *Bacillus subtilis* 355 against wood surface contaminant fungi. Lisboa, Portugal. Laborato'rio Nacional de Engenharia Civil, Av. do Brasil, 101, 1700-066.
- Morikawa, M., Ito, M. and Imanaka, T. 1992.** Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74, 5, 255-261.
- Muaaz, M.A., Sheikh, M.A., Ahmad, Z. and Hasnain, S. 2007.** Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microbial Cell Fact.*, 10: 6-17.
- Muhammad, S.A., Ahmad, S. and Hameed, A. 2009.** Antibiotic Production by Thermophilic *Bacillus* Specie SAT-4. Microbiology Research Laboratory, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan, *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22(3):339-345.
- Nakano, M.M. and Zuber, P. 1990.** Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Crit. Rev. Biotechnol.*, No. 3, 223.
- Nam, D.H. and Ryu, D.D.Y. 1985.** Relationship between butirosin biosynthesis and sporulation in *Bacillus circulans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27(5):798-801.
- Nathan, P., Law, E.J., Murphy, D.F. and MacMillan, B.G. 1978.** A laboratory method for selection of topical antimicrobial agents to treat infected burn wounds. *Burns*, 4:177-187.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. 2000.** Lehninger principles of biochemistry. Third edition. *New York: Worth Publishers*, 10:35-56.
- Oscáriz, J.C., Lasa, I., Pisabarro, A. 1999.** Detection and characterization of cerin 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity, *FEMS Microbiology Letters*, 178, 337-341.
- Oscáriz, J.C. and Pisabarro, A.G. 2000.** Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2):361-9.
- Özkaya-Durlu, F. 2000.** Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Armoni matbacılık Ltd. Şti.Ankara. 358 p.

Paik, S., H., Bae, S. S, Park, S. H. and Pan, J. G. 1997. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19, 4, 294-298.

Paulus, H. and Gray, E. 1964. The Biosynthesis of Polymyxin B by Growing Cultures of *Bacillus polymyxa*. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 239, No. 3, Printed in U.S.A. The Department of Biological Chemistry, Harvard Medical School, Boston 15, Massachusetts.

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

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

Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Wallach, J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 5, 553-563.

Pierson, L.S., Keppenne, V.D. and Wood, D.W. 1994. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 34-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J. Bacteriol.* 176, 3966-3974.

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

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

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

Priest, F.G. 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriol, Rev.* 41 (3), P:711-753.

Romero, D., Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M. and Pérez-García, A. 2007. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca* MPMI. *The American Phytopathological Society* Vol. 20, No. 4, pp. 430-440.

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

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

Sajidi, A.G. and Ali, A.Y.M. 1987. Industrial Microbiology, 1st Part: Fundamentals of Industrial Fermentations. Basra University, Iraq.

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

Schaeffer, P. 1969. Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes, and exotoxins. *Bacteriol. Rev.*, 33, 48.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeisterr, J., Jaques, P., Thonart, P. and Vater, J. 1998. Structural and functional organization of the fengycin synthase multianzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3, *Chemistry & Biology*, 6,1, 31-41.

- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N. and Deguchi, Y. 1998.** Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain Nm 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish, *Aquaculture*, 165, 269-280.
- Talaro, A. and Talaro K. 1996.** Foundation in microbiology. W.M. Brown, New York.
- Temiz, A. 1994.** Gıda Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Ankara. S:26-120.
- Tunç, K. 1995.** Biyoteknoloji, Gazi Üniversitesi İletişim Fakültesi Basımevi, Ankara, s. 80-86.
- Tunail, N. 2009.** Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara, S:69-70.
- Umezawa, H. 1958.** Kanamycin: It's discovery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 76:20-26.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U. and Jung, G. 1986.** Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot.* (Tokyo), 39: 888-901.
- Versalovic, J. and Vilson, M. 2008.** Therapeutic Microbiology: Probiotics and related strategies. *American Society for Microbiology Washington D.C.* S: 62(1-403).
- Vollenbroich, D., Özel, M., Vater, J., Kamp, R. M. and Pault, G. 1997.** Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*, *Biologicals*, 25, 289-297.
- Waite, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S. and Higton, G. 2006.** Industrial Microbiology An Introduction. Blackwell Science. P:24.
- Waksman, S.A. 1967.** Actinomycetes: A Summary of Current Knowledge. The Ronald Pres Company, New York.
- Walker, J.E. and Abraham, E.P. 1970.** The structure of bacilysin and other products of *Bacillus subtilis*. U.S.A. *Biochem J.* 118(4): 563-570.
- Weinstein, M.J., Leedeman, G.M. and Oren, E. 1973.** Gentamicin: a new broad spectrum antibiolytic complex. *Antimicrob Agents*.
- Wipat, A. and Harwood, C. R. 1999.** The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium, *FEMS Microbiology Ecology*, 28, 1-9.
- Wood, D.W., Gong, F., Daykin, M.M., Williams, P. and Pierson, L. S. 1997.** N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aereofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.* 179, 7663-7670.
- Xianqing, H., Yufen, W., Yanhong, C. and Xie, H. 2010.** Optimization of Antifungal Effect of Surfactin and Iturin to *Penicillium notatum* in Syrup of Peach by

RSM. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, Vol:16, No:2, pp:63-69(7).

Yılmaz, M. ve Beyatlı, Y. 2003. *Bacillus* Cinsi Bakterilerde Antimikrobiyal Aktivite. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(7): 35-49.

Yousaf, M. 1997. Studies on the cultural conditions for the production of antibiotic bacitracin by *B. licheniformis*. PhD Thesis, Islamia University, Bahawalpur.

Yücel, A., Tabak, F., Öztürk, R., Mert, A. 1998. Günümüzde Antimikrobik Tedavi, İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği Yayını, No 12, İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Alev Usta
Doğum Yeri ve Tarihi : Osmangazi/29.07.1988
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Atatürk Lisesi/2006
Lisans : Uludağ Üniversitesi/2010