



Farklı Enerji Kaynaklarında Geliştirilen Bazı *Bacillus* Suşları Tarafından Üretilen Sekonder Metabolitlerin Antimikrobiyal Etkisi

Ferit Can Yazdıç^{1*}, Altuğ Karaman¹, Fadime Yazdıç²

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, 46000 Kahramanmaraş, Türkiye

²Bingöl Üniversitesi, Merkezi Uygulama ve Araştırma Laboratuvarı, 12000 Bingöl, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş 13 Haziran 2018
Kabul 26 Eylül 2018

Anahtar Kelimeler:

Bacillus sp.
Sekonder metabolit
Disk difüzyon yöntemi
Antimikrobiyal aktivite
Kahramanmaraş

*Sorumlu Yazar:

E-mail: fcyazdic@gmail.com

Ö Z

Bu çalışmada, Kahramanmaraş'taki tarım arazilerinde bulunan *Bacillus* sp. izolatlarının antimikrobiyal aktivite özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Toplanan tarım arazisi toprak örneklerinden *Bacillus* izolasyonu yapılmıştır. Bu izolatlar morfolojik ve biyokimyasal olarak tanımlanmıştır. Farklı karbon kaynaklarındaki (glukoz, fruktoz ve sakkaroz) *Bacillus* izolatlarının ve referans *Bacillus* türlerinin bazı bakterilere ve patojenik mayaya (*Candida albicans*) karşı antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemine göre araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, çalışmada kullanılan *Bacillus* izolatlarının sekonder metabolitleri test edilen mikroorganizmaların gelişmelerini değişik oranlarda engellemiştir (1-25,2 mm inhibisyon zonu). Üç izolat (*Bacillus* sp. B6, B13 ve B43) yüksek antibakteriyel aktivite göstermiştir. *Bacillus* sp. B6, *Bacillus* sp. B13 ve *Bacillus* sp. B43'ün, kullanılan tüm karbon kaynaklarında *Candida albicans*'a karşı (*Bacillus* sp. B6-sakkaroz hariç) antifungal sekonder metabolitleri ürettiği belirlenmiştir. Daha da önemlisi karbon kaynağı olarak fruktoz kullanıldığında *Bacillus* sp. B13 (1-11,67 mm inhibisyon zonu) ve *Bacillus* sp. B43'ün (1,4-19 mm inhibisyon zonu) tüm patojen mikroorganizmalara karşı antibakteriyel ve antifungal etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 6(10): 1437-1443, 2018

Antimicrobial Effect of Secondary Metabolites Produced by Some *Bacillus* Strains Developed in Different Energy Sources

ARTICLE INFO

Research Article

Received 13 June 2018
Accepted 26 September 2018

Keywords:

Bacillus sp.
Secondary metabolite
Disk diffusion method
Antimicrobial activity
Kahramanmaraş

*Corresponding Author:

E-mail: fcyazdic@gmail.com

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine antimicrobial activity properties of *Bacillus* sp. isolates in agricultural land in Kahramanmaraş. *Bacillus* isolation was done from soil samples collected agricultural land. These isolates were described as morphologically and biochemically. The antimicrobial activities in different carbon sources (glucose, fructose and saccharose) of the *Bacillus* isolates and reference *Bacillus* species against some bacteria and pathogenic yeast (*Candida albicans*) were examined by the disk diffusion method. At the result of the research, secondary metabolites of *Bacillus* isolates used in the study inhibited the growth of tested microorganisms in varying ratios (1-25,2 mm zone of inhibition). Three isolates (*Bacillus* sp. B6, B13 and B43) showed high antibacterial activity. It was found that *Bacillus* sp. B6, *Bacillus* sp. B13 and *Bacillus* sp. B43 produced antifungal secondary metabolites against *Candida albicans* at all used carbon sources (except *Bacillus* sp. B6- saccharose). More importantly, it was observed that *Bacillus* sp. B13 (1-11,67 mm zone of inhibition) and *Bacillus* sp. B43 (1,4-19 mm zone of inhibition) has antibacterial and antifungal effect against all pathogenic microorganisms when fructose is used as the carbon source.

DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i10.1437-1443.2066>

Giriş

Mikrobiyal sekonder metabolitler, mikrobiyal kültürlerin büyümesi için gerekli olmayan ancak insan sağlığı, beslenmesi ve ekonomisi için çok önemli olan genellikle benzersiz yapılara sahip, küçük moleküler ağırlıklı, mikroorganizmaların geç büyüme fazı sırasında üretilen sekonder metabolizma ürünleridir (Demain ve Fang, 2000; Berdy, 2005; Ruiz, 2010). Bunlar arasında antibiyotikler, pigmentler, toksinler, ekolojik rekabet için gerekli efektörler, feromonlar, enzim inhibitörleri, immünmodülatör ajanlar, reseptör antagonistleri ve agonistler, pestisitler, antitümör ajanlar ve kolesterol ilaçları gösterilebilir (Demain, 1998). Sekonder metabolitlerin keşfedilmelerinden günümüze en yaygın kullanım alanı antibiyotik üretimi ve keşifleri olmuştur ve olmaya da devam etmektedir (Spellberg, 2014). Diğer taraftan kimyasal yapıları ve etki mekanizmaları birbirinden çok farklı olan pek çok antibiyotik bilinmesine rağmen pek azı tıpta kullanılabilir kadar nontoksiktir (Ruiz, 2010). Modern tıp bugünkü hali ile devam edecekse, yeni antibiyotik ailelerinin düzenli olarak belirlenmesi gereklidir (Spellberg, 2014; Ruiz, 2010). Belirlenmiş yüzlerce antibiyotik arasında günümüzde antibiyotiklerin birçoğu *Penicillium*, *Streptomyces*, *Cephalosporium*, *Micromonospora* ve *Bacillus* cinslerine ait türlerden elde edilmektedir (Demain, 1999). Antibiyotik dirençli enfeksiyonlar tüm dünyada yaygın bir problemdir. Birçok araştırma ve sağlık kuruluşu, tedavi edilemeyen bakteriyel enfeksiyonlarına karşı dirençli bakterilerin hızlı bir şekilde ortaya çıkmasını “felaket” olarak tanımlamıştır (Viswanathan, 2014). Dünya Sağlık Örgütü, 2013 yılında insan ırkı için “antibiyotik sonrası dönem” ve 2014'te antibiyotik direnç krizinin giderek kötüleştiği konusunda uyarılarda bulunmuştur (Ventola, 2015). Bunlar dikkate alındığında önümüzdeki yıllarda mevcut antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalara karşı yeni doğal ve kimyasal bileşiklerin seçimi için daha kapsamlı tarama programlarına ihtiyaç her geçen gün biraz daha artmaktadır (Ruiz, 2010).

Bacillaceae familyasında bulunan *Bacillus* cinsi bakteriler çubuk şeklinde, birçoğu kötü şartlara ve sıcaklığa dirençli, endospor oluşturan, genelde gram pozitif, peritrik flagellalı ve flagellaları hareketli, aerobik veya fakültatif anaerobtur (Topçal ve ark., 2014). Bu cins koloni morfolojisi olarak çeşitlilik gösterse de genelde beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptirler (Buchanan ve Gibbons, 1974). *Bacillus* cinsi bakterilerin izolasyonlarının ve üretimlerinin kolay oluşu, endüstriyel ürün potansiyelleri ve patojeniteleri sebebiyle geniş çapta çalışılan mikroorganizmalar grubuna girer (Rosovitz ve ark., 1998). *Bacillus* bakterileri tarafından üretilen pek çok enzimin (proteaz, amilaz vb.), çeşitli endüstri alanlarında kullanılmasının yanı sıra en dikkat çekici noktaları ürettikleri antimikrobiyal maddelerdir (Johnvesly ve ark., 2002; Acet ve Özcan, 2018). Bu maddeleri geç logaritmik faz veya erken durağan fazda sekonder metabolit olarak üretirler. Bununla birlikte sporulasyon başlangıcıyla antimikrobiyal üretiminin de başladığı bilinmektedir (Gálvez ve ark., 1993).

Bacillus spp. güçlü antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri gösteren, yapısal olarak farklı metabolitlerden

oluşan doğal biyoaktif ürünlerin ana kaynağı olarak görülebilir (Wang ve ark., 2015). Şimdiye kadar *Bacillus*lar tarafından 200'den fazla peptid antibiyotik üretilmiştir (Pathma ve ark., 2011). Bununla birlikte, fermantasyon besiyerlerindeki sekonder metabolitlerin saflaştırılması zor bir işlem gerektirebilir, buradaki asıl problem istenilen sekonder metabolitin yüksek miktarlarda üretilmesidir (Liangzhi ve ark., 2007). Ayrıca araştırmalar mikroorganizmaların ürettikleri antibiyotiklerin karmaşık bir biyosentetik yol izlediğini ve antimikrobiyal aktivitedeki farklılığın (kültür ortamındaki besinsel faktörler, pH ve sıcaklık gibi) üretilen sekonder metaboliti etkilediği ve doğal olarak farklı ürünlerin ortaya çıktığını belirlemiştir (Cooper ve ark., 1981; Iwase ve ark., 2009; Qilong ve ark., 2013). Dolayısıyla yapılan bu çalışma ile farklı topraklardan izole edilen ve kültür koleksiyonundaki bazı *Bacillus* türlerinin farklı enerji kaynaklarındaki (glukoz, fruktoz ve sakkaroz) ürettiği oldukları sekonder metabolitlerin farklı günlerdeki antimikrobiyal etkileri araştırılmış, böylece farklı *Bacillus* türlerinin sekonder metabolitleri hakkında yapılan ve yapılacak olan çalışmalara katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Bacillus Cinsine ait türler: Bu çalışmada, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundaki *Bacillus cereus* EÜ, *B. megaterium* DSM 32, *B. brevis* FMC 3 ve *B. subtilis* IMG 22 türleri ile farklı tarım arazilerindeki toprak örneklerinden izolasyonu yapılan *Bacillus* sp. suşları kullanılmıştır.

Test Bakterileri: Yapılan bu çalışmada, bakteri tarafından üretilmiş olan ve antimikrobiyal etki gösteren maddelerin belirlenmesinde (Disk Difüzyon Metodu) test bakterisi olarak kullanılan mikroorganizma suşları için Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan yararlanılmıştır. Araştırmada *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella oxytoca*, *Micrococcus luteus* LA 2971, *Enterobacter aerogenes* ATCC 27859, *Klebsiella pneumoniae* FMC 3, *Staphylococcus haemolyticus* ve *Staphylococcus aureus* 6538 bakterileri ile *Candida albicans* mayası kullanılmıştır.

Metot

İzolasyon: Kahramanmaraş'taki 6 farklı tarım arazisinden alınan yaklaşık 200 gr 3'er adet toprak örneği steril bir şekilde laboratuvara getirilerek 10 grama 9 ml fizyolojik su olacak şekilde süspansiyon haline getirilmiştir. Bu karışım 63°C sıcak su banyosunda yarım saat bekletilmiş, soğutulduktan sonra 10⁻², 10⁻³ ve 10⁻⁴ şeklinde dilüsyonlar hazırlanarak Plate Count Agar besiyerine yüzeysel ekim yapılmış ve 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (Lennette ve ark., 1985). Farklı morfolojik özellik gösteren koloni örnekleri Nutrient Broth besiyerine ekilerek 30°C'de 1 gece inkübasyona

bırakılmış gelişen örneklerden steril ependorflara %30'luk steril gliserol kullanılarak stok alınmış ve tüm izolatlar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Collins ve Lyne, 1970; Özçelik, 1998; Topçal ve ark., 2014).

Bacillus spp. izolatlarının identifikasyonu ve seçimi: Toprak örneklerinden izole edilen izolatların tanımlanması için gram boyama ve endospor boyamanın yanı sıra katalaz, karbonhidrat fermentasyon, nişasta hidroliz, üreaz aktivite, nitrit-nitrat ve amonyak testleri yapılmıştır (Demirbağ ve Demir, 2005; Collins ve Lyne, 1970). Bu testler yönünden pozitif olan ve morfolojik olarak *Bacillus*'a benzeyen kolonilerden rastgele seçilmiştir. Seçilen kolonilerden Nutrient Agar besiyerine ekim yapılarak saf kültürler elde edilmiştir. Saf kültürler Nutrient Broth besiyerine ekilmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere %30'luk steril gliserol içerisinde -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Sıvı besiyerinde sekonder metabolit üretimi: Toprak izole edilip identifikasyonu yapılan *Bacillus* sp. ile kültür koleksiyonlarından temin edilen *Bacillus* cinsine ait bakteriler Nutrient Broth besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 7-15 gün süre ile inkübe edilmiştir. İlave olarak, kültür ortamına farklı karbon kaynakları (glukoz, fruktoz, sakkaroz) eklenerek metabolit üretim miktarı üzerine etkileri test edilmiştir. Bu amaçla 200 ml hazırlanan Nutrient Broth besiyerine 10 gr karbon kaynağı (glukoz, fruktoz, sakkaroz) eklenerek süspansiyonun %5'lik olması sağlanmıştır. Referans kültürler (*Bacillus cereus* EÜ, *B. megaterium* DSM 32, *B. brevis* FMC 3 ve *B. subtilis* IMG 22) ve izole edilen *Bacillus* sp. bakterileri %5'lik karbon kaynağı ihtiva eden Nutrient Broth besiyerine inoküle edilerek ve 37°C'de 7-15 gün süre ile inkübe edilmiştir.

Sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu: Besiyerinde oluşan metabolitlerin ekstraksiyonu için öncelikle kültür ortamındaki bakteriler buz içerisinde (+4°C'de) alınarak üremesi durdurulmuştur. Kültür filtratından santrifüj yapılarak bakteri içermeyen süpernatant kısmından 10 ml alınarak etil asetat (CH₃COOC₂H₅) ile (1:1) ayırma hunisinde 3 defa metabolit ekstraksiyonu yapılmıştır (Collins ve Lyne, 1970; Bradshaw, 1979; Khan ve ark., 1988). Toplanan ekstraktın içine 2,5 g susuz Na₂SO₄ (sodyum sülfat) katılıp 3-5 dakika bekletilerek suyu alınmış ve süzümüştür.

Buharlaştırma: Suyu alınan ekstrakt, 100 ml'lik cam balon içerisinde evaporatörde yaklaşık 1 ml kalıncaya kadar buharlaştırılmıştır. Aletten çıkarılan balona 4 ml etil asetat ilave edilerek çalkalanmış ve karışım antimikrobiyal aktivitede kullanılmak üzere tüplere konularak 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi: Biyolojik ölçüm için test organizması olarak kullanılacak olan bakteri suşları Nutrient Buyyona (Difco)'a ekilerek 30±0.1°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Daha önceden hazırlanan 15'er ml'lik Mueller Hinton Agarlı deney tüpleri steril edilerek kullanılmıştır. Hazırlanan bu ortamlar eritilerek yaklaşık 45-50°C ye kadar soğutulan besiyerlerine 10 µl test bakterisi (10³-10⁴ adet/ml) ekilerek Vortex tüp karıştırıcıda iyice çalkalandıktan sonra 9 cm çapındaki steril petri kutularına steril ortamda 15'er ml ve homojen olacak bir şekilde dağılması sağlanmıştır (David ve McCuen, 1988).

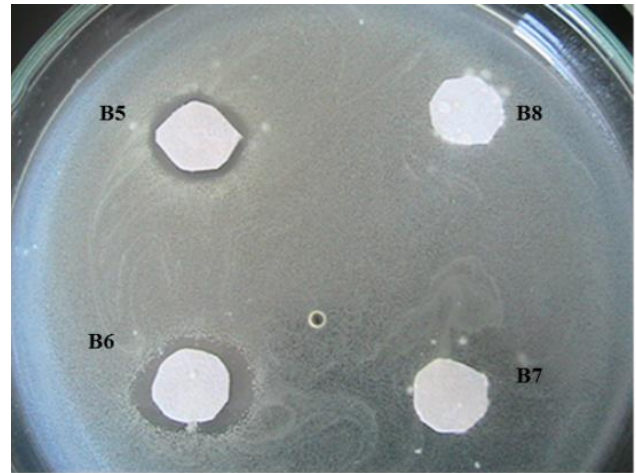
Sonrasında daha önceden elde edilen ekstraktlardan,

otomatik pipet ile 10 mm çapındaki steril boş antibiyotik disklere (Schleicher and Schül, Nr. 2668, Almanya) 100 µl ekstrakt emdirilmiştir. Kontrol olarak etil asetat emdirilmiş diskler kullanılmıştır. Katılaştıran agar üzerine ekstrakt emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak yerleştirilmiş ve bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C'de 2 saat bekletilmiştir. Bu petripler daha sonra 37±0,1°C'de 16-18 saat süre ile inkübe edildikten sonra disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülmüş ve mm olarak kaydedilmiştir (Collins ve Lyne, 1970; Bradshaw, 1979; David ve McCuen, 1988). Tüm ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Mikroorganizmaların antibiyotik üretiminin niteliksel ve niceliksel yönleri, izolasyon kaynağında hâkim olan çevresel basınca bağlıdır ve fermantasyon sırasında büyüme ve beslenme koşullarının manipülasyonu, metabolit üretim düzeyi üzerinde önemli bir etki yapmaktadır (Abdelghani, 2017). Antibiyotiklerin biyosentezi, karbon, azot, fosfat, metal iyonları ve diğer besin bileşenleri gibi farklı ortam bileşenlerinin türü ve konsantrasyonu ile düzenlenir (Abdelghani, 2017; Iqbal ve ark., 2018). Birçok faktör, mikrobiyal hücrelerin büyüme derecesini, kimyasal bileşimi ve üretilen spesifik metabolik ürünlerin doğasını ve konsantrasyonunu etkiler (Abdelghani, 2017). Bu maddelerin farklı *Bacillus* türleri tarafından kullanılmasında önemli bir seçicilik vardır (Iqbal ve ark., 2018). Yabani suşlar kimyasal çeşitlilik ve yeni ilaç molekülleri açısından çok zengindir (Sanchez ve Demain, 2002; Durairaj ve ark., 2018).

Kahramanmaraş ili Onikişubat ilçesindeki tarım arazilerindeki altı farklı topraklardan 54 farklı *Bacillus* izolatu izole edilmiş ve tanımlaması yapılmıştır. İzolasyon yapılan tüm örneklerin öncelikle *Escherichia coli* bakterisine ve *Candida albicans* mantarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri denenmiştir. Patogen gelişimlerini yüksek düzeyde inhibe ettiği tespit edilen üç örnek (B6, B13 ve B43) seçilerek diğer çalışmalarda kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1 *Bacillus* sp. (B5, 6, 7 ve 8) ekstraksiyonlarının *E.coli*'ye karşı inhibisyon etkisinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi.

Figure 1 Determination of the inhibition effect of *Bacillus* sp extracts against *E. coli* by disk diffusion method.

Öncelikle referans olarak kullanılacak *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. brevis* ve *B. subtilis* bakterilerinden elde edilen metabolitlerin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 1’de gösterilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi referans bakterilerden elde edilen ekstraktların patojen test mikroorganizmalarına (*Candida albicans*, *Enterobacter aerogenes* ATCC 27859, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* FMC 3, *Micrococcus luteus* LA 2971, *Staphylococcus aureus* 6538 ve *Staphylococcus haemolyticus*) karşı antimikrobiyal etkisi olduğu tespit edilmiştir (7,77-18 mm inhibisyon zonu).

Bacillus megaterium’dan elde edilen metabolitlerin test mikroorganizmalarından *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*’a karşı etkili olduğu belirlenmiştir. En güçlü antimikrobiyal etkinin olduğu mikroorganizma 18 mm zon çapıyla *Enterococcus faecium* olduğu görülmüştür (Tablo 1). Bilindiği gibi *Enterococcus faecalis* bağırsaklarda, cerrahi yaralarda, karın bölgesi ve doğum öncesi enfeksiyonlara ve iç kalp zarı iltihabına sebep olmaktadır (Siren ve ark., 1997). Daha önceki çalışmalarda *B. megaterium*’un megacin denilen bakteriyosin maddesini ürettiği bildirilmiştir (Cherif ve ark., 2001). Ayrıca megacin maddesinin plazmid DNA ilişkili olduğu ve *Bacillus* türleri tarafından üretilen bakteriyosinlerin özellikle Gram pozitif bakterilere karşı aktif olduğu, Gram negatiflere etki etmediği bildirilmektedir (Zheng ve Slavik, 1999; Oscáriz ve ark., 1999). Ayrıca antimikrobiyal aktiviteleri yönünden

araştırılan *Bacillus megaterium* ve *B. brevis* türünden elde edilen etil asetat ekstraktlarının *Enterobacter aerogenes* ATCC 27859 ve *Micrococcus luteus* LA 2971’e karşı antimikrobiyal etkiye sahip olmadıkları tespit edilmiştir. Diğer önemli nokta ise, nozokomiyal enfeksiyonlarda sık karşılaşılan ve son yıllarda giderek artan bir önem kazanan *Klebsiella oxytoca*’ya karşı test patojenlerinden elde edilen ekstraktların hiçbirinde herhangi bir antibakteriyel etkinin olmadığı görülmüştür (Gilchrist, 1995).

Tablo 2 ve 3 incelendiğinde, değişik karbon kaynağı kullanılmasının *Bacillus* suşlarının yedinci günün sonunda ürettiği metabolitlerin antimikrobiyal etkileri üzerine olumlu sonuçları olmuştur. Karbon kaynağı olarak fruktoz ve sakkaroz kullanılması, gerek *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. subtilis*’in gerekse topraktan izole edilen *Bacillus* sp. B6, *Bacillus* sp. B13 ve *Bacillus* sp. B43’ün antibakteriyel ve antifungal etkilerini artırırken, glukoz kullanıldığında ya değişmemiş ya da azaltmıştır. Bunun nedeni glukoz gibi hızla metabolize edilen substratlar bazen maksimum hücre büyüme oranını gösterirken, aynı zamanda da birçok biyoaktif sekonder metabolitlerin üretimini baskılamakta ya da tamamen inhibe etmektedir (El-Benna, 2006; Kumar, 2012). Bunun en çarpıcı örneği *Bacillus cereus* ve *B. brevis*’in Nutrient Buyyon (Difco) besiyerinde gelişmesinden sonra elde edilen ekstraktların *K. oxytoca*’ya karşı etkisiz olmalarına karşılık, Nutrient Buyyon (Difco) besiyerine katılan fruktoz neticesinde *Bacillus* türlerinden elde edilen ekstraktların antibakteriyel aktivite göstermeleri olarak belirlenmiştir.

Tablo 1 Referans *Bacillus* türlerinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkileri
Table 1 Antimicrobial effects of extracts from reference *Bacillus* species

Test Bakterileri	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. subtilis</i>	Etil Asetat (Kontrol)
<i>Candida albicans</i>	11,33 ¹	12	- ²	12	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 27859	12	-	-	14	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	8,57	15	7,77	9	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-	18	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> FMC 3	11	12,5	-	12	-
<i>Micrococcus luteus</i> LA 2971	9,67	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	-	14	-	15	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	10	9,67	-	8,33	-

¹Inhibisyon zonu ortalaması (mm), ²Inhibisyon zonu belirlenmedi (-)

Tablo 2 Yedi gün boyunca farklı karbon kaynaklarında yetişen referans *Bacillus* türlerinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkileri

Table 2 Antimicrobial effects of extracts obtained from reference *Bacillus* species which grown on different carbon sources for seven days

Test Bakterileri	<i>B. cereus</i>			<i>B. megaterium</i>			<i>B. brevis</i>			<i>B. subtilis</i>		
	G	F	S	G	F	S	G	F	S	G	F	S
<i>C. albicans</i>	- ²	10 ¹	15	-	10	-	-	14	-	-	13	-
<i>E. aerogenes</i>	10,23	19,25	12,1	-	-	-	-	-	-	13,2	17	14,24
<i>E. coli</i>	16	23,2	13	15	14	20	14	15	15	17	10	10
<i>E. faecium</i>	-	9	-	-	18,67	-	-	15	-	-	-	-
PB <i>K. oxytoca</i>	-	3,2	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	11,67	15	-	-	12	-	-	11,33	-	12	13,5	7,67
<i>M. luteus</i>	-	12,66	5	-	11,67	-	-	7	-	-	4	6
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	8	11	-	-	9	-	-	9	-	-	11,96	10

PB: Patojen Bakteriler, ¹Inhibisyon zonu ortalaması (mm), ²Inhibisyon zonu belirlenmedi (-); G: Glukoz; F: Fruktoz; S: Sakkaroz

Tablo 3 Yedi gün boyunca farklı karbon kaynaklarında yetişen ve izole edilen bazı *Bacillus* türlerinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkileri

Table 3 Antimicrobial effects of extracts obtained from some *Bacillus* species which grown and isolated in different carbon sources for seven days

Test Bakterileri	<i>Bacillus</i> sp. B6			<i>Bacillus</i> sp. B13			<i>Bacillus</i> sp. B43			
	G	F	S	G	F	S	G	F	S	
Enerji Kaynağı										
<i>C. albicans</i>	12,25 ¹	13	- ²	5,6	11,67	10,33	4,2	18,67	7	
<i>E. aerogenes</i>	-	-	-	-	4,25	-	12,7	19	15,33	
<i>E. coli</i>	-	8,67	11,33	12,50	8,33	12	7,67	5	6,67	
<i>E. faecium</i>	-	13,67	-	-	10	-	-	8,56	-	
PB <i>K.oxycota</i>	-	10	-	-	1	-	-	1,4	-	
<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-	3,7	-	-	3,9	10	
<i>M. luteus</i>	-	10	-	6,5	4,5	2,3	3	10,56	2,5	
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	9,33	-	-	8,67	-	
<i>S. haemolyticus</i>	5,23	12	-	-	7,9	-	7,7	9,1	-	

PB: Patogen Bakteriler, ¹Inhibisyon zonu ortalaması (mm), ²Inhibisyon zonu belirlenmedi (-); G: Glukoz; F: Fruktoz; S: Sakkaroz

Tablo 4 On beş gün boyunca farklı karbon kaynaklarında yetişen referans *Bacillus* türlerinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkileri

Table 4 Antimicrobial effects of extracts obtained from reference *Bacillus* species which grown on different carbon sources for fifteenth day

Test Bakterileri	<i>B. cereus</i>			<i>B. megaterium</i>			<i>B. brevis</i>			<i>B. subtilis</i>		
	G	F	S	G	F	S	G	F	S	G	F	S
Enerji Kaynağı												
<i>C. albicans</i>	- ²	13 ¹	10	-	13	-	-	12	-	-	13	12
<i>E. aerogenes</i>	11,37	18,5	13,1	-	-	-	-	-	-	8,2	11	11,24
<i>E. coli</i>	17,25	25,2	13	15,01	14,97	18,3	9	11	10	-	11	-
<i>E. faecium</i>	-	10	1,5	-	17,27	-	-	13,1	-	-	5	-
PB <i>K.oxycota</i>	-	2	-	-	-	-	-	10	-	-	3,02	-
<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-	11	-	-	-	-	13,25	19	16
<i>M. luteus</i>	-	10,6	6,2	-	13,2	-	-	6	-	-	6,23	5
<i>S. aureus</i>	3,21	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	11	9,2	-	-	6	-	-	-	-	-	10,25	9,2

PB: Patogen Bakteriler, ¹Inhibisyon zonu ortalaması (mm), ²Inhibisyon zonu belirlenmedi (-); G: Glukoz; F: Fruktoz; S: Sakkaroz

Tablo 5 On beş gün boyunca farklı karbon kaynaklarında yetişen ve izole edilen bazı *Bacillus* türlerinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkileri

Table 5 Antimicrobial effects of extracts obtained from some *Bacillus* species which grown and isolated in different carbon sources for fifteenth day

Test Bakterileri	<i>Bacillus</i> sp. B6			<i>Bacillus</i> sp. B13			<i>Bacillus</i> sp. B43			
	G	F	S	G	F	S	G	F	S	
Enerji Kaynağı										
<i>C. albicans</i>	- ²	15,33 ¹	15,67	6,1	18,37	9,33	3,8	15,9	6,5	
<i>E. aerogenes</i>	-	-	-	-	3,2	-	10,7	15,3	14,1	
<i>E. coli</i>	-	7,33	4	8,11	6,50	9	8,33	8,67	7,33	
<i>E. faecium</i>	-	11,7	3,1	-	9,7	-	-	11,5	-	
PB <i>K.oxycota</i>	-	-	-	-	3,7	-	-	2,3	-	
<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-	6,50	-	-	4,5	14	
<i>M. luteus</i>	5,2	12	4,7	7,3	7,12	4,8	6,8	11,05	3,7	
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	8,5	-	-	9,01	-	
<i>S. haemolyticus</i>	1,2	9,1	-	-	12,3	-	10,7	11,1	-	

PB: Patogen Bakteriler, ¹Inhibisyon zonu ortalaması (mm), ²Inhibisyon zonu belirlenmedi (-); G: Glukoz; F: Fruktoz; S: Sakkaroz

Bacillus sp. B6, *Bacillus* sp. B13 ve *Bacillus* sp. B43 kullanılan tüm karbon kaynaklarında *Candida albicans*'a karşı (*Bacillus* sp. B6-sakkaroz hariç) antifungal sekonder metabolitleri ürettiği görülmüştür. Daha da önemlisi karbon kaynağı olarak fruktoz kullanıldığında *Bacillus* sp. B13 (1-11,67 mm inhibisyon zonu) ve *Bacillus* sp. B43'ün (1,4-19 mm inhibisyon zonu) tüm patojen mikroorganizmalara karşı antibakteriyel ve antifungal etkisinin olduğunu görülmüştür (Tablo 3). Araştırmalarda, antimikrobiyal aktivitenin ve üretilen sekonder ürünlerin profillerinin, kültür şartlarına göre

değişebileceği bildirilmiştir. Öyle ki, örneğin Bacitracin antibiyotik üreten *B. licheniformis* 'in besiyerine glukoz yerine süt asidi konulduğunda, bu bakteri kültüründe Bacitracin yerine Licheniformis antibiyotik ürettirildiği belirtilmiştir (Awais ve ark., 2010).

Tablo 4-5'in incelenmesinden de anlaşılacağı üzere, araştırma yapılan *Bacillus* suşları 15. günün sonunda ürettikleri biyolojik metabolitlerin etkilerinde düşüşler gözlenmiştir. Fakat, 7. günün sonundaki antifungal aktivite ile karşılaştırılacak olursa *Candida albicans*'a karşı *Bacillus* suşlarının etkinliğini kaybetmediği veya

artırdığı görülmektedir. Ayrıca *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. subtilis*, *Bacillus* sp. B6, *Bacillus* sp. B13 ve *Bacillus* sp. B43'ün ürettikleri biyolojik metabolitlerin *Escherichia coli* üzerine antimikrobiyal etkinliğinin sürdüğünü söyleyebiliriz.

Glukoz, laktoz, sakkaroz, fruktoz, nişasta ve gliserol gibi farklı karbon kaynakları farklı mikroorganizmalarda sekonder metabolitlerin üretimi için uygun olduğu önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Charkrabarti ve Chandra, 1982; James ve Edwards, 1988; Bhattacharyya ve ark., 1998; Kotake ve ark., 1992; Petersen ve ark., 1994; Rizk ve Metwally, 2007). Ayrıca farklı bitki özütlerinin de karbon kaynaklarına ek bir ilave olarak kullanıldığında antimikrobiyal aktiviteyi artırdığı gözlemlenmiştir (Kalkan ve ark., 2017; Ergün ve ark., 2018). Karbon kaynaklarının seçimi, sekonder metabolizmayı ve dolayısıyla antibiyotik üretimini büyük ölçüde etkileyebilmektedir (Roitman ve ark., 1990). Karbon kaynağındaki varyasyonlar genellikle antimikrobiyal maddelerin üretiminde değişikliğe neden olurken üretilen maddenin bileşimini de büyük oranda etkilemektedir (El-Benna, 2006). Tablolarda da (Tablo 2,3,4 ve 5) görüldüğü üzere *Bacillus* sp. kültür ortamına katılan fruktoz bakterinin antibakteriyel ve antifungal aktivitesini artırmıştır. Bu gibi çalışmalarda kültür ortamına katılacak yeterli miktarda fruktoz, *Bacillus sp.*'den elde edilmek istenen metabolit miktarını artıracağını göstermektedir. Diğer bir değişle karbon kaynaklarındaki varyasyon, bakterinin ürettiği sekonder metabolitlerin kompozisyonunun değiştirilebileceğini gösterirken antimikrobiyal aktivitedeki değişime de neden olacağı açıktır. Yedinci günün sonunda kültür ortamına katılan karbon kaynakları *Bacillus* türlerinin *Escherichia coli* üzerindeki antagonistik etkilerini artırdığı görülmüştür. Yetiştirme parametrelerinin mikroorganizmalar tarafından üretilen sekonder metabolitler için kritik olduğu bilinmektedir. Kültür ortamındaki küçük değişiklikler bile sadece belirli bileşiklerin miktarını değil, aynı zamanda mikroorganizmaların genel metabolik profilini de etkileyebilir (Scherlach ve Hertweck, 2009). Besleyici veya çevresel faktörleri manipüle etmek, sekonder metabolitlerin biyosentezini teşvik edebilir ve böylece yeni doğal ürünlerin keşfini kolaylaştırabilir.

Bu çalışmanın sonuçları, doğal izolatlardan *Bacillus* topluluğunun birçok suşunun, klinik olarak önemli bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca kullanılan *Bacillus* izolatlarından elde edilen metabolitlerin biyolojik ölçüm yöntemi ile belirlenmesinde test mikroorganizması olarak *E. coli* ve *C. albicans*'ın kullanılabilirliğini göstermiştir. Ayrıca kültür ortamına katılan bazı substratların farklı metabolit üretmesine neden olduğu için, çalışmada kullanılan diğer test bakterilerinin de basilluslar tarafından üretilen metabolitlerin belirlenmesinde kullanılabilirliğini söyleyebiliriz. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin sonuçları, bakteriden elde edilen antimikrobiyal sekonder metabolitlerin, bir karbon kaynağı olarak fruktoz ve sakkaroz varlığında optimal olarak üretilebileceğini göstermiştir. Dahası, *Bacillus* cinsi üyelerinin, patojen bakterilerde gelişen antibiyotik direncine karşı, hala ilaç endüstrisi için katkıda bulunabilecek bileşikler üretebilen türlere sahip proliferatif bir bakteri grubu olduğunu göstermektedir. Bu

açıdan, yapılan bu tip çalışmalarla, doğada yaygın bir şekilde bulunan *Bacillus* türleri antibakteriyel ve antifungal bileşikler için kaynak oluşturabilir, ilaç ve tarım endüstrisinde potansiyel bir kullanım alanı bulabilirler.

Teşekkür

Bu çalışmaya maddi destek sağlayan TÜBİTAK-BİDEB'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Abdelghani T. 2017. Production of Antibacterial and Antifungal Metabolites by (*S. albobovineus*) Strain no. 10/2 and Media Optimization. American International Journal of Biology. doi: 10.15640/aijb.
- Acet T, Özcan K. 2018. Investigation of Some Biological Activities of Horsetail (*Equisetum arvense*) Plant Used for Medicinal Purposes in Gümüşhane Province. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 5 (13): 1810-1814.
- Awais M, Pervez A, Yaqub A, Shah MM. 2010. Production of antimicrobial metabolites by *Bacillus subtilis* immobilized in polyacrylamide gel. Pakistan J. Zool., 42(3): 267-275.
- Bhattacharyya BK, Pal SC, Sen SK. 1998. Antibiotic production by *Streptomyces hygrosopicus* D1. 5: Cultural effect. Rev. Microbiol., 29(3).
- Bradshaw LJ. 1979. Laboratory microbiology. Saunders Limited.
- Bredy J. 2005. Bioactive microbial metabolites a personal view. J. Antibiot., (58).
- Buchanan RE, Gibbons NE. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, The Williams and Wilkins Comp. Baltimore, Md.
- Chakrabarti S, Chandra AL. 1982. A new streptomycete and a new polyene antibiotic, acmycin. Folia microbiologica, 27(3): 167-172. PMID 7106659;
- Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D, Cherif H, Ben Slama K, Hassen A, Jaoua S, Boudabous A. 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1. 7, a new strain isolated from soil. Lett. Appl. Microbiol., 32(4): 243-247. PMID 11298934;
- Collins CH, Lyne PM. 1970. Microbiological methods. Microbiological methods., (3rd. Edition).
- Cooper DG, Macdonald CR, Duff SJB, Kosaric N. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. Appl. Environ. Microbiol., 42(3): 408-412. PMID 16345840;
- David AP, McCuen JP. 1988. Manual of BBL products and Laboratory procedures.
- Demain AL, Fang A. 2000. The natural functions of secondary metabolites. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 69:1-39. PMID 11036689;
- Demain AL. 1998. Induction of microbial secondary metabolism. Int. Microbiol., 1(4): 259-264. PMID 10943372;
- Demirbağ Z, Demir İ. 2005. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvarı Uygulama Kitabı, KATÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Esen Matbaacılık, Trabzon, 126s,
- Durai Raj K, Velmurugan P, Park JH, Chang WS, Park YJ, Senthilkumar P, Oh BT. 2018. An investigation of biocontrol activity *Pseudomonas* and *Bacillus* strains against *Panax ginseng* root rot fungal phytopathogens. Biological Control.
- El-Banna NM. 2006. Effect of carbon source on the antimicrobial activity of *Corynebacterium kutscheri* and *Corynebacterium xerosis*. Afr. J. Biotechnol., 5(10).

- Ergün N, Ökmen G, Erdal P, Cantekin Z, Ergün Y. 2018. The Antibacterial Activities of *Lavandula stoechas* and *Crepis sancta* Leaf and Flower Against Mastitis Pathogens and Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Activities of The Extracts. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(5): 543-549.
- Gálvez A, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Lebbadi M, Valdivia E. 1993. Isolation and physico-chemical characterization of an antifungal and antibacterial peptide produced by *Bacillus licheniformis* A12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39(4-5): 438-442. PMID 7763922;
- Gilchrist MJR. 1995. Enterobacteriaceae: opportunistic pathogens and other genera. *Manual of clinical microbiology*, 457-464.
- Iqbal S, Qasim M, Rahman H, Sajid I. 2018. Screening, Characterization and Optimization of antibacterial peptides, produced by *Bacillus safensis* strain MK-12 isolated from waste dump soil KP, Pakistan. *bioRxiv*, 308205.
- Iwase N, Rahman MS, Ano T. 2009. Production of iturin A homologues under different culture conditions. *J. Environ. Sci. (China)*, 21, S28-S32. DOI: 10.1016/S1001-0742(09)60031-0; PMID 25084426;
- James PDA, Edwards C. 1988. The effects of cultural conditions on growth and secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 52(1-2): 1-5.
- Johnvesly B, Manjunath BR, Naik GR. 2002. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *Bioresour Technol.*, 82(1): 61-64. PMID 11848379;
- Kalkan S, Taş E, Erginkaya Z, Turhan EÜ. 2017. Determination of Antimicrobial Effects of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Garlic Extract Against Some Foodborn Pathogenic Bacteria. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 5(2): 125-131.
- Khan NH, Rahman M, Nur-e-Kamal MS. 1988. Antibacterial activity of *Euphorbia thymifolia* Linn. *Indian J. Med. Res.*, 87, 395-397. PMID 3169896;
- Kotake C, Yamasaki T, Moriyama T, Shinoda M, Komiyama N, Furumai T, Konishi M, Oki T. 1992. Butyrolactols A and B, new antifungal antibiotics. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 45(9): 1442-1450. PMID 1429230;
- Kumar SN, Siji JV, Ramya R, Nambisan B, Mohandas C. 2012. Improvement of antimicrobial activity of compounds produced by *Bacillus* sp. associated with a *Rhabditid* sp.(entomopathogenic nematode) by changing carbon and nitrogen sources in fermentation media. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, 1(6): 1424.
- Lennette EH, Ballows A, Hausler WJ Jr SH. 1985. *Manual of Clinical Microbiology* American Society for Microbiology Washington DC.
- Liangzhi LI, Zheng H, Yingjin YUAN. 2007. Effects of propionate on streptolydigin production and carbon flux distribution in *Streptomyces lydicus* AS 4.2501. *Chin. J. Chem. Eng.*, 15(2): 143-149. DOI: 10.1016/S1004-9541(07)60049-4.
- Oscáriz JC, Lasa I, Pisabarro AG. 1999. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 178(2): 337-341. PMID 10499284;
- Özçelik S. 1998. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu, Süleyman Demirel Üniversitesi, Zir. Fak. Yayın No:2, Ders Notları, Isparta, 91s.
- Pathma J, Rahul GR, Kamaraj KR, Subashri R, Sakthivel N. 2011. Secondary metabolite production by bacterial antagonists. *J. Biol. Control*, 25(3): 165-181. DOI: 10.18311/jbc/2011/3716;
- Petersen F, Moerker T, Vanzanella F, Peter HH. 1994. Production of cladospirone bisepoxide, a new fungal metabolite. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 47(10): 1098-1103. PMID 7961158;
- Qilong R, Huabin X, Zongbi BAO, Baogen SU, Qiwei YANG, Yiwen YANG, ZHANG Z. 2013. Recent advances in separation of bioactive natural products. *Chin. J. Chem. Eng.*, 21(9): 937-952. DOI: 10.1016/S1004-9541(13)60560-1
- Rizk M, Abdel-Rahman T, Metwally H. 2007. Factors affecting growth and antifungal activity of some *Streptomyces* species against *Candida albicans*. *J. Food, Agri. Environ.*
- Roitman JN, Mahoney NE, Janisiewicz WJ. 1990. Production and composition of phenylpyrrole metabolites produced by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34(3): 381-386.
- Rosovitz MJ, Voskuil MI, Chambliss GH. 1998. *Bacillus*, Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology.
- Ruiz B, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, Langley E. 2010. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crit. Rev. Microbiol.*, 36(2):146-67. doi: 10.3109/10408410903489576.
- Sanchez S, Demain AL. 2002. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7): 895-906.
- Scherlach K, Hertweck C. 2009. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org. Biomol. Chem.* 7(9):1753-60. doi: 10.1039/b821578b.
- Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. 1997. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int. Endod. J.*, 30(2): 91-95.
- Spellberg, B. 2014. The future of antibiotics. *Critical care*, 18(3): 228.
- Topçal F, Dıgırak M, Gündoğan R. 2014. Topraktan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması ve Bakteriosin Üretimlerinin Belirlenmesi. *Adıyaman University Journal of Science*, 4(2).
- Ventola, C L. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4): 277.
- Viswanathan V K. 2014. Off-label abuse of antibiotics by bacteria. *Gut Microbes*;5(1):3-4.
- Wang T, Liang Y, Wu M, Chen Z, Lin J, Yang L. 2015. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chin. J. Chem. Eng.*, 23(4): 744-754.
- Zheng G, Slavik MF. 1999. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28(5): 363-367.