

Topraktan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması

Hatice Kati^{*1}, Burak Karaca², Şebnem Hazal Gülşen³

06.07.2015 Geliş/Received, 24.02.2016 Kabul/Accepted

ÖZ

Bu çalışmada, Giresun adasından toplanan toprak örneklerinden *Bacillus* izolasyonu yapılmıştır. Bu izolatlar morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan *Bacillus*'larda bazı ekstrasellüler enzimlerinin varlığı kalitatif olarak incelenmiştir. Ayrıca *Bacillus* izolatlarının bazı bakterilere karşı antibakteriyal aktiviteleri agar difüzyon metoduna göre araştırılmıştır. Sonuç olarak 38 izolat *B. cereus* grubu üyesi, 7 izolat *B. thuringiensis*, 10 izolat *B. megaterium*, 6 izolat *B. pumilus* ve 12 izolat *Bacillus* sp. olarak tanımlanmıştır. *Bacillus* izolatlarının ekstrasellüler enzim aktivite sonuçları değerlendirildiğinde 38 izolatın amilaz, 53 izolatın lipaz/esteraz, 16 izolatın kitinaz, 7 izolatın ksilanaz, 2 izolatın pektinaz, 73 izolatın proteaz ve 35 izolatın selülaz enzim aktivitesi pozitif olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan *Bacillus* izolatları test edilen mikroorganizmaların gelişmelerini değişik oranlarda engellemiştir. Dokuz izolat yüksek antibakteriyal aktivite göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: antibakteriyal aktivite, *Bacillus*, *Bacillus thuringiensis*, ekstrasellüler enzim

Identification of *Bacillus* species isolated from soil and investigation of their biological properties

ABSTRACT

In this study, *Bacillus* isolation were performed from soil samples collected from Giresun Island. These isolates were characterized as morphological, biochemical, and molecular. The presence of some extracellular enzymes in the identified *Bacillus* isolates were qualitatively investigated. Furthermore the antibacterial activities of the *Bacillus* isolates against some bacteria were examined by the agar diffusion method. As a result 38 isolates were identified as the members of *B. cereus* group, 7 as *B. thuringiensis*, 10 as *B. megaterium*, 6 as *B. pumilus*, and 12 as *Bacillus* sp. When the extracellular enzyme activity results of the identified *Bacillus* isolates were evaluated, it was found that 38 of these have amylase, 53 have lipase/esterase, 16 have chitinase, 7 have xylanase, 2 have pectinase, 73 have protease, and 35 have cellulase positive enzyme activities. The *Bacillus* isolates used in this study inhibited the growth of tested microorganisms in varying ratios. Nine isolates show high antibacterial activity.

Keywords: antibacterial activity, *Bacillus*, *Bacillus thuringiensis*, extracellular enzyme

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

¹ Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Giresun - hatice.kati@giresun.edu.tr

² Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Giresun - b.rakkaraca@gmail.com

³ Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Giresun - sheb@windowslive.com

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Bacillus bakterileri tarafından üretilen enzimler, antibiyotikler ve bakteriyosinler gibi endüstriyel öneme sahip bileşikler gıda, ilaç, deterjan gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. *Bacillus*'lar; çubuk şekilli, Gram pozitif, zorunlu veya fakültatif aerob ve hareketli bakterilerdir.

Bacillus'lar amilaz, lipaz, kitinaz, ksilanaz, pektinaz, proteaz ve selüloz gibi farklı ekstrasellüler enzimleri üretme yeteneğine sahiptirler. Bir karbohidraz olan α -amilaz ekstrasellüler enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir [1, 2]. *Bacillus subtilis*'tan izole edilen amilaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir [3]. Bakteriye lipazların bir kısmı glikoprotein, bir kısmı da hücre dışı lipoprotein yapısındadır. Bakteriye lipaz üretiminde, *Achromobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., ve *Chromobacterium* sp. gibi mikroorganizmalardan faydalanılmaktadır [4]. Ertuğrul vd. [5]'ne göre kitinazlar organizmalar arasında oldukça geniş bir dağılım gösterirler. Bu dağılım bakteriler, mantarlar, yüksek bitkiler, böcekler, kabuklular ve bazı omurgalıları içermektedir [6]. Bakteriler tarafından üretilen kitinaz, kitini parçalayarak karbon ve enerji kaynağı olarak bakterinin kullanımına sunar [7, 8, 9]. Kitinazlar başlıca *Serratia*, *Bacillus* ve *Vibrio* türleri tarafından üretilmektedir [10, 11, 12]. Ksilan, yüksek bitkilerin hücre duvarının hemiselülozik kısmının temel yapısında bulunur [13, 14]. Çoğu bakteri ve mantar ksilanı sindirmek için ksilanaz ekstrasellüler enzimi üretmektedir [14, 15]. Topraktan izole edilen *B. cereus* bakterisinden ksilanaz enzimi izole edilmiş ve karakterize edilmiştir [16]. Pektinazlar gıda ve meyve suyu üretiminde kullanılmaktadır. Ticari pektinaz üretiminde kullanılan en önemli mikroorganizma *Aspergillus niger*'dir [17]. Kumar vd. [18] yaptıkları bir çalışmada *Bacillus* bakterisinden izole ettikleri pektinazın üretimini ve optimizasyonunu çalışmışlardır. Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Proteazlar, gıda olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadır. Bakteriye proteazlar diğer proteazlar ile karşılaştırıldığı zaman daha etkili olduğu görülmektedir [19]. Birçok mikroorganizmadan proteaz izole edilsede izolasyonu daha kolay olduğu için *Bacillus* biyoteknolojide en fazla kullanılan bakteridir. Selülozu parçalayan ekstrasellüler enzimler özellikle mantar ve bakterilerden elde edilmektedir. Ticari olarak en çok kullanılan selüloz üreticisi *Trichoderma* türleridir [20]. Ayrıca selülozlar *Aspergillus*, *Penicillium*, *Basidiomycetes* ve *Bacillus*'lardan da elde edilmektedir [21, 22].

Bacillus'lar bakteriyosin ve antibiyotik gibi antimikrobiyal bileşikler de üretmektedirler. Bu bileşikler genellikle tıp, gıda ve biyolojik mücadele

çalışmalarında kullanılmaktadır. Günümüzde birçok mikroorganizma antibiyotiklere karşı direnç kazanmıştır. Bundan dolayı yeni izole edilen mikroorganizmaların antibiyotik üretmesi ve geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip olması önemli olmaktadır [23].

Toprak kökenli olan *Bacillus*'ların farklı özellikleri ile ilgili günümüzde birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmada, Giresun adasından alınan toprak örneklerinden *Bacillus* bakterileri izole edilerek tanımlanmaları yapılmış ve bu izolatların farklı ekstrasellüler enzim varlıkları ile antibakteriyal aktiviteleri incelenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM (MATERIALS AND METHODS)

2.1. Toprak Örneklerinin Toplanması (Collection of Soil Samples)

Giresun Adasından Eylül 2012 yılında toprağın üst yüzeyi temizlendikten sonra steril bir spatula ile yaklaşık 5 cm derinlikten 10'ar gram olacak şekilde 60 adet toprak örneği alınarak steril plastik poşetler içine bırakılmıştır. Alınan örnekler kullanılmaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2. *Bacillus* İzolasyonu (*Bacillus* Isolation)

Toprak örneklerinden *Bacillus* cinsine ait bakterileri izole etmek için her toprak örneğinden 1'er gr tartılarak, 9 ml steril saf suda çözülmesi sağlanmıştır. Bu karışımlar vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra karışımların üzerindeki sıvı alınarak steril cam tüplere bırakılmış ve örnekler 65 °C'lik su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. Seri dilüsyonlar hazırlanarak seyreltiklerden 100 µl alınarak Nutrient Agar (NA) besiyerine ekimleri yapılmış ve 30 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda morfolojik olarak *Bacillus*'a benzeyen kolonilerden rasgele seçilmiştir. Seçilen kolonilerden NA besiyerine çizgi ekim yapılarak saf kültürler elde edilmiştir. Saf kültürler Nutrient Broth (NB) besiyerine ekilmiş sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere %20'lik steril gliserol içerisinde -20 ve -80 °C'lerde muhafaza edilmiştir.

2.3. *Bacillus* İzolatlarının Tanımlanması (Identification of *Bacillus* isolates)

2.3.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi (Determination of Morphological and Biochemical Properties)

Topraktan izole edilen bakterilerin ilk olarak Gram boyamaları yapılmıştır. Gram boyama sonucu *Bacillus*

şüpheli izolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için VITEK 2 cihazı (Biomérieux) kullanılmıştır.

Bacillus thuringiensis bakterilerini tanımlamak için izolatlar NA besiyerinde beş gün büyütülmüş ve smearları hazırlanmıştır. Bu smearlara Sharif ve Alaeddinoğlu [24]'na göre kristal boyama prosedürü uygulanmıştır. Boyama sonucunda kristal benzeri yapıları içeren izolatlar *B. thuringiensis* olarak değerlendirilmiştir.

2.3.3. Moleküler Tanımlama (Molecular Identification)

Çalışmada PROMEGA Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak *Bacillus* izolatlarından genomik DNA izole edilmiştir. Bu DNA'lardan 16S rDNA gen bölgelerini çoğaltmak için 16S rDNA primerleri (F 5'-ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA-3'; R 5'-ATG GTA CCG TGT GAC GGG CGG TGT GTA-3') kullanılmıştır [25]. PCR reaksiyonu 50 µl olacak şekilde 1 µl DNA, 5 µl 10xPCR tamponu, 3 µl 25 mM MgCl₂, 2,5 U Tag DNA polimeraz, 1 µl 10 mM dNTP mix, 1'er µl 20 µM forward ve reverse primeri alınarak hazırlanmıştır. PCR şartları; başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 2 dak. olacak şekilde 94 °C'de 1 dak., 56 °C'de 1 dak., 72 °C'de 2 dak. 36 döngü ile 72 °C'de 10 dak. son uzama basamağı ile gerçekleştirilmiştir.

PCR sonucunda elde edilen yaklaşık 1400 bp uzunluğundaki 16S rDNA gen bölgesi sekanslama için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderilmiştir. Macrogen firmasından elde edilen dizi verileri GenBankasındaki mevcut dizilerle BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmıştır.

2.4. *Bacillus* İzolatlarının Ekstrasellüler Enzim Üretim Yeteneklerinin Araştırılması (Investigation of Extracellular Enzyme Production Capabilities of *Bacillus* Isolates)

Bacillus izolatlarında amilaz, kitinaz, ksilanaz, lipaz/esteraz, pektinaz, proteaz ve selüloz ekstrasellüler enzim üretme yetenekleri kalitatif olarak aşağıdaki besiyeri ve teknikler kullanılarak araştırılmıştır.

Amilaz ekstrasellüler enzimi: Amilaz aktivitesinin saptanması amacıyla nişasta besiyerine (Trypton 10 g, Maya Ekstraktı 5 g, NaCl 10 g, Agar 15 g, Nişasta 5 g, Distile su 1000 ml) [26] ekim yapıldıktan sonra 30 °C'lik etüve konularak 1 gece süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Üreme gözlemlendikten sonra iyot solüsyonu (I2 1g, KI 2g, 300ml) ile boyanarak gözlenen zonlar pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir [27].

Kitinaz ekstrasellüler enzimi: Kolloidal kitin ihtiva eden besiyeri kullanılmıştır [7]. Petrilere *Bacillus*'lar nokta ekim yapılarak ekilmiştir ve 10 gün 30 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakterilerin etrafında şeffaf zon görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir [28].

Ksilanaz ekstrasellüler enzimi: *Bacillus*'larda ksilanaz aktivitesi için ksilan ihtiva eden besiyeri (Ksilan 10 g, Pepton 5 g, Maya ekstraktı 5 g, MgSO₄.7H₂O 0.2 g, K₂HPO₄ 1 g (pH 7), Agar 15 g, Distile su 1000 ml) kullanılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra 30 °C'lik etüve 2 gece süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Koloni etrafında gözlenen şeffaf zonlar pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir [16].

Lipaz/esteraz ekstrasellüler enzim: Lipaz/esteraz ekstrasellüler enzim varlığının araştırılması için Tribütirin, Tween 20 ve Tween 80 içeren agar besiyerlerine kürdanla ekim yapılmış ve 30 °C'de 3 gün inkübe edilmiştir [29]. İnkübasyon sonunda etrafında şeffaf zon/kristal oluşan kolonilerin lipaz/esteraz ekstrasellüler enzim aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. *Bacillus*'ların lipaz aktivitelerinin doğrulanması amacı ile de % 2.5 zeytinyağı ilave edilerek hazırlanan Rhodamine B Agar Besiyeri kullanılmıştır [30, 31].

Pektinaz ekstrasellüler enzimi: Pektinaz varlığını araştırmak için iki farklı besiyeri kullanılmıştır (Besiyeri 1: Maya ekstraktı 1 g, Amonyum sülfat 1 g, Na₂HPO₄ 6 g, KH₂PO₄ 3 g, Poligalakturonik asit 5 g, Agar 20 g, Distile su 1000 ml, Besiyeri 2: Maya ekstraktı 1 g, Amonyum sülfat 2 g, Na₂HPO₄ 6 g, KH₂PO₄ 3 g, pektin 5 g, Agar 20g, Distile su 1000 ml). Bu besiyerilere ekim yapıldıktan sonra 30 °C'de 3-4 gün inkübasyon sonrasında hazırlanan 1% (w/v) setrimonyum bromür (CTAB) solüsyonu ile koloniler kaplanmıştır. Oda sıcaklığında 10 dak. bekletilmiş ve sonra kolonilerin etrafında açık zon oluşumu pektinaz üreticisi olarak değerlendirilmiştir [32].

Proteaz ekstrasellüler enzimi: *Bacillus* izolatlarında proteaz aktivitesini araştırmak için proteaz besiyerisi ((g/l): K₂HPO₄ 2, glukoz 1, pepton 5, jelatin 15 ve agar 15) kullanılmıştır. Besiyerilerine ekilen *Bacillus*'lar 30 °C'de iki gün inkübe edildikten sonra bakterilerin üzerini kaplayacak şekilde civa klorür solüsyonu dökülmüştür [33]. Oluşan zonlar proteaz aktivitesi için pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

Selüloz ekstrasellüler enzimi: *Bacillus* izolatlarının selüloz aktivitesini araştırmak için CMC besiyeri (Trypton 10 g, Maya Ekstraktı 5 g, NaCl 10 g, Agar 15 g, CMC (Carboxymethylcellulose) 1 g, Distile su 1000 ml) kullanılmıştır [26]. Bu besiyeriye ekim yapıldıktan

sonra petriler 30 °C'de 1 gece süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Üreme gözlemlendikten sonra %0.1 w/v kongo kırmızısı ilave edilerek CMCaz ekstrasellüler enzim aktivite zonu kırmızı zeminde sarımsak renk şeklinde gözlenmiştir [27].

2.5. *Bacillus* İzolatlarının Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi (Determination of Antibacterial Activities of *Bacillus* Isolates)

Bacillus izolatlarının indikatör bakterilerine (Tablo 1) karşı herhangi bir antibakteriyel madde üretip üretmediğini araştırmak için agar nokta ekim yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak *Bacillus*'ların steril kürdan aracılığı ile triptik soy agar (TSA) içeren besiyerilerine nokta ekimi yapılmıştır ve 30 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Aynı zamanda indikatör bakteriler de triptik soy broth (TSB) besiyerinde bir gece inkübe edilmiştir. Bu indikatör bakteriler 10 mL yumuşak agar (%0.7 oranında agar içeren TSB) içerisine inoküle edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan yumuşak agar ortamı, nokta ekim sonrası gelişen kolonileri içeren TSA üzerine ikinci bir tabaka halinde homojen bir şekilde yayılmıştır. Ardından bir gece inkübe edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, çevresinde inhibisyon zonu gözlenen *Bacillus*'lar, pozitif sonuç olarak, inhibisyon zonu gözlenmeyen *Bacillus*'lar ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan indikatör bakteriler (Indicator bacteria used in this study)

Bitki Patojenleri*	<i>B. thuringiensis</i> ve <i>B. cereus</i> suşları**	Patojenik bakteriler
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Bt</i> subsp. <i>galleriae</i> HD29 (4G5)	<i>Bacillus subtilis</i> IMQ22
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Bt</i> subsp. <i>tolworthi</i> HD537 (4L3)	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> HD567 (4Q1)	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212
<i>Pseudomonas savastanoi</i> (Ps)	<i>B. thuringiensis</i> Berliner (2046)	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC13315
<i>Pseudomonas savastanoi</i> (Psa)	<i>Bt</i> subsp. <i>atazawai</i> HD133 (4I3)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Bt</i> subsp. <i>tochigiensis</i> HD868 (4Y1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> 3a3b (6I02)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228
	<i>Bt</i> subsp. <i>entomocidus</i> HD9 (4I4)	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028
	<i>Bt</i> subsp. <i>canadensis</i> HD30 (4H1)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923
	<i>Bt</i> subsp. <i>atazawai</i> HD137 (4J5)	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC911
	<i>Bt</i> subsp. <i>kenya</i> HD136 (4E1)	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922
	<i>Bt</i> subsp. <i>thompsoni</i> HD542 (4O1)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25218
	<i>Bt</i> subsp. <i>colmeri</i> IS720 (4X1)	<i>Bacillus pumilus</i> DSM27
	<i>Bt</i> subsp. <i>darmstadtensis</i> HD146 (4M1)	<i>Bacillus megaterium</i> lab. izolatu
	<i>Bt</i> subsp. <i>morrisoni</i> HD12 (4K1)	<i>Staphylococcus sciuri</i> lab. İzolatu
	<i>Bt</i> subsp. <i>tenebrionis</i> (4AA1)	
	<i>Bt</i> subsp. <i>indiana</i> HD521 (4S2)	
	<i>Bt</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> HD867 (4W1)	
	<i>Bt</i> subsp. <i>thuringiensis</i> (4A1)	
	<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> HD500 (4Q2)	
	<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> (4Q7)	
	<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> (4D1)	
	<i>Bt</i> subsp. <i>kenya</i> HD293 (4E3)	
	<i>Bacillus cereus</i> (6A5)	
	<i>Bacillus cereus</i> (6A2)	

*Yeditepe Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü laboratuvarından temin edilen bitki patojeni bakterileri.

***Bacillus* Genetic Stock Center'dan temin edilen *B. thuringiensis* ve *B. cereus* suşları.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI (RESEARCH FINDINGS)

3.1. *Bacillus* İzolatlarının Tanımlanması (Identification of *Bacillus* isolates)

Giresun adasından alınan toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* izolatları morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır.

Morfolojik çalışmalar sonucu Gram pozitif ve spor oluşturma özelliklerine sahip 91 izolat belirlenmiştir. Seçilen bu 91 *Bacillus* izolatının biyokimyasal tanımlanmaları ile biyolojik özelliklerinin benzer olmasından dolayı birbirine benzer olan izolatlar çıkarılarak çalışmaya 73 izolat ile devam edilmiştir. Ayrıca bu izolatların kristal yapı içerip içeripmedikleri araştırılmıştır. Yedi izolatta kristal benzeri yapılar belirlenmiştir.

3.1.1. *Bacillus* İzolatlarının Biyokimyasal Olarak Tanımlanması (Biochemical Identification of *Bacillus* isolates)

Morfolojik olarak *Bacillus* olduğu belirlenen 73 izolatın VITEK 2 cihazı kullanılarak biyokimyasal olarak tanımlanmaları yapılmıştır. Bu cihazın veri bankası kullanılarak *Bacillus* izolatlarının benzediği bakteriler Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. *Bacillus* izolatlarının VITEK 2 sistemi ile tanımlanması (Identification of *Bacillus* isolates using VITEK 2 system)

İzolat nu.	Bakteriler
T1, T2, T4, T67	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
T3, T5, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T18, T19, T24, T25, T27, T28, T31, T32, T34, T35, T38, T42, T44, T45, T51, T52, T54, T56, T57, T62, T63, T64, T65, T66, T68, T69, T71, T72, T73	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>
T6, T17, T23, T37, T41, T46, T47, T53, T59, T60	Tanımlama yapılmadı
T20, T30, T33, T39, T43, T48, T49, T50, T55, T70	<i>Bacillus megaterium</i>
T21, T22, T26, T29, T36, T58	<i>Bacillus pumilus</i>
T40, T61	<i>Bacillus lentus</i>

3.1.2. *Bacillus* İzolatlarının Moleküler Olarak Tanımlanması (Molecular Identification of *Bacillus* isolates)

Çalışmada 73 *Bacillus* izolatının 16S rDNA analizleri yapılmıştır. İzolatların çoğaltılan 16S rDNA gen bölgelerine ait yaklaşık 1400 bp uzunluğunda bantlar elde edilmiştir. Bu baz sıraları NCBI blast programında karşılaştırıldıktan sonra izolatların benzediği bakteri sonuçları Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. *Bacillus* izolatlarının 16S rDNA dizin analizi ile tanımlanması (Identification of *Bacillus* isolates using 16S rDNA sequencing)

İzolat no.	16S rDNA'ya göre benzediği bakteriler	Erişim Numarası	%*
T1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	EU153549.1	99
T2	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	EU153549.1	99
T3	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	EU153549.1	99
T4	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	EU153549.1	99
T5	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain NBRC 3951	AB680181.1	99
T6	<i>Bacillus cereus</i> strain RL-1	KJ744035.1	97
T7	<i>Bacillus cereus</i> strain ZH-3	HM219667.1	98
T8	<i>Bacillus cereus</i> strain CTSP40	EU855216.1	96
T9	<i>Bacillus cereus</i> strain ZH-3	HM219667.1	99
T10	<i>Bacillus cereus</i> strain G38	JX293301.1	98
T11	<i>Bacillus cereus</i> strain IHB B 6508	KF475854.1	98
T12	<i>Bacillus cereus</i> strain NBRC 3002	AB679979.1	99
T13	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain 4-Sj-2-3-7-T	KJ009512.1	99
T14	<i>Bacillus cereus</i> strain ZH-3	HM219667.1	98
T15	<i>Bacillus cereus</i> strain AntCr97	HF570102.1	99
T16	<i>Bacillus cereus</i> strain NMSL88	GU568190.1	98
T17	<i>Bacillus</i> sp. D2(2011)	JF449448	94
T18	<i>Bacillus cereus</i> strain IHB B 6508	KF475854.1	98
T19	<i>Bacillus cereus</i> strain SH16	KM248381.1	95
T20	<i>Bacillus megaterium</i> strain MBI-42	KJ843149.1	99
T21	<i>Bacillus pumilus</i> strain ZAP071	KJ801630.1	98
T22	<i>Bacillus pumilus</i> strain B-30	KJ126924.1	98
T23	<i>Bacillus megaterium</i> strain g1	AY373360.1	98
T24	<i>Bacillus cereus</i> isolate NHS-1	EF690422.1	98
T25	<i>Bacillus cereus</i> strain IARI-ME-36	KJ752763.1	98
T26	<i>Bacillus pumilus</i> strain 2.1	KM265462.1	98
T27	<i>Bacillus cereus</i> strain NBRC 3002	AB679979.1	99
T28	<i>Bacillus cereus</i> strain 2109	JF947356.1	97
T29	<i>Bacillus pumilus</i> strain DZBT01	KM087337.1	98
T30	<i>Bacillus megaterium</i> strain MBI-42	KJ843149.1	98
T31	<i>Bacillus cereus</i> strain NMSL88	GU568190.1	99
T32	<i>Bacillus cereus</i> strain GBSC45	GU568207.1	98
T33	<i>Bacillus megaterium</i> strain PAS 16	KJ789369.1	99
T34	<i>Bacillus cereus</i> strain CTSP40	EU855216.1	99
T35	<i>Bacillus cereus</i> strain IHB B 6504	KF475850.1	98
T36	<i>Bacillus pumilus</i> strain BF17	KJ524515.1	98
T37	<i>Bacillus megaterium</i> strain MBI-42	KJ843149.1	99
T38	<i>Bacillus cereus</i> strain GBSC45	GU568207.1	99
T39	<i>Bacillus megaterium</i> strain IARI-CS-63	JF343154.1	90
T40	<i>Bacillus</i> sp. LS-511	KJ601746	99
T41	<i>Bacillus megaterium</i> strain MBI-42	KJ843149.1	99
T42	<i>Bacillus cereus</i> strain YB18	KJ720022.1	99
T43	<i>Bacillus megaterium</i> strain WZ-2	KJ855770.1	97
T44	<i>Bacillus cereus</i> strain LLCG23	GU568201.1	99
T45	<i>Bacillus cereus</i> strain ChST2.5	JF935135.1	98
T46	<i>Bacillus megaterium</i> strain DZBJ05	KM191302.1	98
T47	<i>Bacillus cereus</i> strain 264ZG5	KF831395.1	98
T48	<i>Bacillus megaterium</i> strain UF07	KF717520.1	95
T49	<i>Bacillus megaterium</i> strain MBI-42	KJ843149.1	98
T50	<i>Bacillus megaterium</i> strain SH6-1	FJ461752.1	99
T51	<i>Bacillus cereus</i> strain ZH-3	HM219667.1	96
T52	<i>Bacillus cereus</i> strain G38	JX293301.1	97
T53	<i>Bacillus megaterium</i> strain WS19	JN688163.1	96
T54	<i>Bacillus cereus</i> strain IARI-MB-6	JN411331.1	97
T55	<i>Bacillus megaterium</i> strain S20510	KF956591.1	98
T56	<i>Bacillus cereus</i> strain g9	KM019855.1	98
T57	<i>Bacillus cereus</i> strain JN174	KF150416.1	98
T58	<i>Bacillus pumilus</i> strain DZBT01	KM087337.1	93
T59	<i>Bacillus megaterium</i> strain MP02	KF717500.1	96
T60	<i>Bacillus megaterium</i> strain ALA2	AY739901.1	95
T61	<i>Bacillus megaterium</i> strain SCMC89	KF358455	95
T62	<i>Bacillus cereus</i> strain NMSW23	GU568186.1	98
T63	<i>Bacillus cereus</i> strain NA5	GQ280810.1	99
T64	<i>Bacillus cereus</i> strain M3	JF836883.1	98
T65	<i>Bacillus cereus</i> strain GBSC45	GU568207.1	98
T66	<i>Bacillus cereus</i> strain DBM	DQ521606.1	97
T67	<i>Bacillus cereus</i> strain MAL_5D	KM251864.1	96
T68	<i>Bacillus cereus</i> strain SMR22	KF600770.1	91
T69	<i>Bacillus cereus</i> strain HPCA2	JQ512967.1	98
T70	<i>Bacillus megaterium</i> strain ALA2	AY739901.1	95
T71	<i>Bacillus cereus</i> strain 5NAP21	KJ722482.1	98
T72	<i>Bacillus cereus</i> strain IARI-MB-6	JN411331.1	97
T73	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain LAMA 1099	KM272764.1	97

*:%97 altındaki benzerlikler eksik okumadan kaynaklanmaktadır.

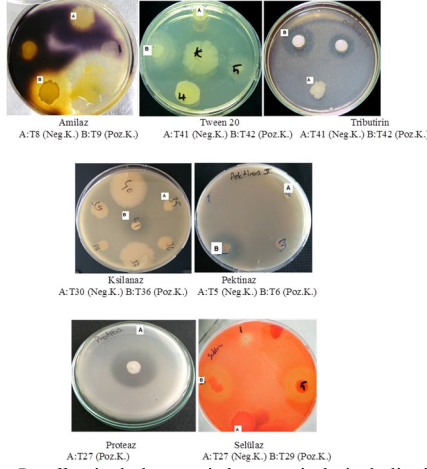
3.2. *Bacillus* İzolatlarının Ekstrasellüler Enzim Üretme Yetenekleri (Extracellular Enzyme Production Capabilities of *Bacillus* Isolates)

Bacillus izolatlarında amilaz, lipaz/esteraz, kitinaz, ksilanaz, pektinaz, proteaz ve selüloz ekstrasellüler enzim üretme yetenekleri kalitatif olarak incelenmiştir. *Bacillus* izolatlarına ait izolatların ekstrasellüler enzim aktivite sonuçları tablo 4'de verilmiştir. Bazı *Bacillus* izolatlarının enzim üretme yeteneklerine ait kalitatif görüntüler şekil 1'de verilmiştir.

Tablo 4. *Bacillus* izolatlarına ait ekstrasellüler enzimler (Extracellular enzymes belonging *Bacillus* isolates)

İzolat no.	Amilaz	Kitinaz	Tween 20	Lipaz/esteraz			Pektinaz		Proteaz	Selüloz
				Tween 80	Tribitürin	Rho. B agar	Ksilanaz	Pektinaz 1		
T1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
T2	+	-	++	-	-	-	-	-	-	++
T3	+	-	++	-	-	-	-	-	-	++
T4	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
T5	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+
T6	-	-	++	+	++	-	-	-	-	+++
T7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+++
T8	-	+	++	+	+	-	-	-	-	+
T9	++	-	+	-	-	-	-	-	-	++
T10	+++	+	+	+	+	-	-	-	-	+++
T11	-	-	+++	+	+	-	-	-	-	+
T12	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	+
T13	-	+	+	-	+	-	-	-	-	++
T14	-	+	+	-	-	-	-	-	-	++
T15	+++	+	+	+	+	-	-	-	-	+++
T16	++	-	+	-	++	-	-	-	-	++
T17	-	-	++	+	++	+	+	-	-	++
T18	-	-	++	+	+	-	-	-	-	+
T19	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
T20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++
T21	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+++
T22	-	-	++	-	++	+	+	-	-	+
T23	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++
T24	++	-	+	-	+	-	-	-	-	+
T25	+	-	++	-	-	-	-	-	-	++
T26	-	-	+	+	+	-	-	-	-	++
T27	++	+	+	+	+	-	-	-	-	+++
T28	++	+	++	+	+	-	-	-	-	++
T29	-	-	+++	+	++	-	-	-	-	+++
T30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
T31	-	+	++	+	+	-	-	-	-	++
T32	+++	+	+	+	+	-	-	-	-	+++
T33	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
T34	-	+	+	+	+	-	-	-	-	++
T35	-	+	+	+	+	-	-	-	-	++
T36	-	-	++	++	++	+	+	++	++	++
T37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
T38	+	+	++	+	+	-	-	-	-	++
T39	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
T40	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++
T41	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++
T42	+	-	+++	++	++	-	-	-	-	+
T43	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++
T44	-	-	++	++	++	-	-	-	-	+++
T45	++	-	-	+	+	-	-	-	-	+
T46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
T47	-	-	+++	+	+	-	-	-	-	+
T48	-	-	++	-	-	-	-	-	-	++
T49	-	-	++	-	-	-	-	-	-	++
T50	-	-	++	-	-	-	-	-	-	++
T51	+	-	++	++	++	-	-	-	-	++
T52	+	-	++	++	++	-	-	-	-	++
T53	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
T54	+	-	+	++	++	-	-	-	-	++
T55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
T56	+	-	++	+	+	-	-	-	-	++
T57	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+++
T58	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
T59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
T60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
T61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
T62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
T63	+	-	+	-	-	-	-	-	-	++
T64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
T65	-	-	+	+	+	-	-	-	-	++
T66	++	-	+	++	++	-	-	-	-	++
T67	+	-	+	+	+	-	-	-	-	++
T68	++	-	+	++	++	-	-	-	-	++
T69	++	-	+++	++	++	-	-	-	-	++
T70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
T71	++	-	+	+	+	-	-	-	-	++
T72	++	-	++	++	++	-	-	-	-	++
T73	+	-	+++	++	++	-	-	-	-	++

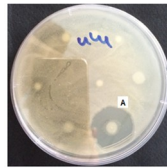
negatif, zon çapı; + < 10 mm, ++ 10-20 mm, +++ > 20 mm*. Bakteri büyümedi.



Şekil 1. *Bacillus* izolatlarına ait bazı enzimlerin kalitatif görüntüleri. (Qualitative images of some enzyme contents of *Bacillus* isolates)

3.3. *Bacillus* İzolatlarının Antibakteriyal Özellikleri (Antibacterial properties of *Bacillus* isolates)

Bu çalışmada izole edilen *Bacillus* izolatlarının, *B. thuringiensis* suşları ile patojenik bakterilere karşı antibakteriyal özellikleri incelenmiştir. Bazı *Bacillus* izolatlarının indikatör bakteriye karşı göstermiş olduğu antibakteriyal aktivite şekil 2’de görülmektedir. *Bacillus* izolatlarının çalışmada kullanılan indikatör bakterilerden *Staphylococcus epidermidis*, *Xanthomonas axonopodis*, *Pseudomonas syringae* ve *Micrococcus luteus*’a karşı antibakteriyal aktivitelerinin olmadığı görülmüştür. T9, T12, T20, T25, T27, T33, T34, T35, T39, T40, T41, T46, T49, T55, T60 ve T70 numaralı *Bacillus* izolatlarının çalışmada kullanılan indikatör bakterilere karşı aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan 9 izolat tablo 5’te verildiği gibi bazı indikatör bakterilerine karşı antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Diğer 48 izolat daha düşük oranlarda antibakteriyal aktivite göstermiştir.



Şekil 2. *Bacillus* izolatının antibakteriyal aktivite görüntüsü. 4Y1: İndikatör Bakteri (*Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* HD868); A: İzolat T71 (Antibacterial Activity Image of *Bacillus* isolate. 4Y1: Indicator Bacteria (*Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* HD868))

Tablo 5. İndikatör bakterilere karşı yüksek antibakteriyal aktivite gösteren *Bacillus* izolatları. (*Bacillus* isolates which show high antibacterial activity against indicator bacteria)

İzolat nu.*	İzolatın adı	Bitki patojenleri	İndikatör Bakteriler	
			<i>B. thuringiensis</i> ve <i>B. cereus</i> suşları	Patojenik bakteriler
T26	<i>B. pumilus</i>	<i>P. savastanoi</i> (Psa)	<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> 3a3b (6102)	<i>E. coli</i> ATCC25922
			<i>Bt</i> subsp. <i>colmeri</i> (4X1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>thompsoni</i> HD542 (401)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>entomocidus</i> HD9 (414)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>kenyae</i> HD136 (4F1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> HD146 (4M1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>indiana</i> HD521 (4S2)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>tenebrionis</i> (4AA1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>galleriae</i> HD29 (4G5)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>tothrowi</i> HD537 (4L3)	
T36	<i>B. cereus</i>	<i>P. putida</i>	<i>Bt</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> HD146 (4M1)	<i>E. coli</i> ATCC25922
			<i>Bt</i> subsp. <i>kenyae</i> HD136 (4F1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>indiana</i> HD521 (4S2)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>tenebrionis</i> (4AA1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>galleriae</i> HD29 (4G5)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>tothrowi</i> HD537 (4L3)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> 3a3b (6102)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> HD567 (4Q1)	
			<i>Bacillus cereus</i> (6A2)	
			<i>Bacillus cereus</i> (6A5)	
T44	<i>B. cereus</i>	<i>P. putida</i>	<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> 3a3b (6102)	<i>B. subtilis</i> IMG22
			<i>Bt</i> subsp. <i>kenyae</i> HD293 (4F3)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>indiana</i> HD521 (4S2)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>entomocidus</i> HD9 (414)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i> 3a3b (6102)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>galleriae</i> HD29 (4G5)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>tenebrionis</i> (4AA1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>thompsoni</i> HD542 (401)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> HD567 (4Q1)	
			<i>Bacillus cereus</i> (6A2)	
T51	<i>B. cereus</i>	<i>P. savastanoi</i> (Ps)	<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> (4Q7)	<i>E. coli</i> ATCC25922
			<i>Bt</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> HD146 (4M1)	<i>B. subtilis</i> IMG22
			<i>Bt</i> subsp. <i>indiana</i> HD521 (4S2)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>entomocidus</i> HD9 (414)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>tothrowi</i> HD537 (4L3)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> HD146 (4M1)	
			<i>Bacillus cereus</i> (6A2)	
			<i>Bacillus cereus</i> (6A5)	
			<i>Bacillus cereus</i> (6A2)	
			<i>Bacillus cereus</i> (6A5)	
T62	<i>B. cereus</i>	<i>E. amylovora</i>	<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> (4Q7)	<i>E. coli</i> ATCC25922
			<i>Bt</i> subsp. <i>thuringiensis</i> (4A1)	<i>B. subtilis</i> IMG22
			<i>Bt</i> subsp. <i>tothrowi</i> HD537 (4L3)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>tenebrionis</i> (4AA1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>indiana</i> HD521 (4S2)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>thompsoni</i> HD542 (401)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>kenyae</i> HD136 (4F1)	
			<i>B. thuringiensis</i> Berliner (2046)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>canadensis</i> HD30 (4H1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> HD146 (4M1)	
<i>Bt</i> subsp. <i>morrisoni</i> HD12 (4K1)				
<i>Bt</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> HD867 (4W1)				
<i>Bt</i> subsp. <i>galleriae</i> HD29 (4G5)				
<i>Bacillus cereus</i> (6A2)				
<i>Bacillus cereus</i> (6A5)				
T68	<i>B. cereus</i>	<i>E. amylovora</i>	<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> (4Q7)	<i>E. coli</i> ATCC25922
			<i>Bt</i> subsp. <i>thuringiensis</i> (4A1)	<i>B. subtilis</i> IMG22
			<i>Bt</i> subsp. <i>tothrowi</i> HD537 (4L3)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>tenebrionis</i> (4AA1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>thompsoni</i> HD542 (401)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>kenyae</i> HD136 (4F1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>canadensis</i> HD30 (4H1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> HD146 (4M1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>morrisoni</i> HD12 (4K1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> HD867 (4W1)	
<i>Bt</i> subsp. <i>galleriae</i> HD29 (4G5)				
<i>Bacillus cereus</i> (6A2)				
<i>Bacillus cereus</i> (6A5)				
T69	<i>B. cereus</i>	<i>E. amylovora</i>	<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> (4Q7)	<i>E. coli</i> ATCC25922
			<i>Bt</i> subsp. <i>thuringiensis</i> (4A1)	<i>B. subtilis</i> IMG22
			<i>Bt</i> subsp. <i>tothrowi</i> HD537 (4L3)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>tenebrionis</i> (4AA1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>thompsoni</i> HD542 (401)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>kenyae</i> HD136 (4F1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>canadensis</i> HD30 (4H1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> HD146 (4M1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>morrisoni</i> HD12 (4K1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> HD867 (4W1)	
<i>Bt</i> subsp. <i>galleriae</i> HD29 (4G5)				
<i>Bacillus cereus</i> (6A2)				
<i>Bacillus cereus</i> (6A5)				
T71	<i>B. cereus</i>	<i>E. amylovora</i>	<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> HD500 (4Q2)	<i>B. pumilus</i> DSM27
			<i>Bt</i> subsp. <i>kenyae</i> HD293 (4F3)	<i>B. megaterium</i>
			<i>Bt</i> subsp. <i>thuringiensis</i> (4A1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>morrisoni</i> HD12 (4K1)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> (4Q7)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>atawai</i> HD137 (4J5)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>tochigiensis</i> HD868 (4Y1)	
			<i>B. thuringiensis</i> Berliner (2046)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>tothrowi</i> HD537 (4L3)	
			<i>Bt</i> subsp. <i>indiana</i> HD521 (4S2)	
<i>Bt</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> HD867 (4W1)				
<i>Bt</i> subsp. <i>entomocidus</i> HD9 (414)				
<i>Bt</i> subsp. <i>atawai</i> HD133 (4J3)				
<i>Bacillus cereus</i> (6A2)				
<i>Bacillus cereus</i> (6A5)				

*Bu izolatlar indikatör bakterilere karşı yüksek aktivite göstermiştir. Zon çapı:15-20 mm

4. TARTIŞMA (DISCUSSION)

Bu çalışmada Karadeniz'in tek adası olan Giresun adasından alınan toprak örneklerinden izole edilen 73 *Bacillus* izolatu tanımlanarak ekstrasellüler enzim üretme yetenekleri ve antibakteriyal özellikleri incelenmiştir.

Çalışma sonucu izolatların 45'inin *B. cereus* grubu üyesi olduğu ve kristal benzeri yapıları içeren 7 izolatu *B. thuringiensis* olduğu tespit edilmiştir. Literatüre baktığımızda *B. cereus* üyeleri arasındaki benzerliklerinden dolayı bu grubun üyelerini tanımlayabilmek için ilave çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. *B. cereus* üyeleri birçok ortamdan izole edilebilmektedir. *B. cereus* grubunda yer alan türler *B. cereus* [34], *B. thuringiensis* [34, 35], *B. anthracis* [34], *B. mycoides* [34], *B. pseudomycoides* [36], *B. weihenstephanensis* [37] ve *B. cytotoxicus* [38]'dir. Diğer izolatların 10'u *B. megaterium*, 6'sı *B. pumilus* ve 12'si *Bacillus* sp. olarak tanımlanmıştır. VITEK 2 cihazı ile yapılan çalışma sonucunda T20, T30, T33, T39, T43, T48, T49, T50, T55 ve T70 numaralı izolatların *B. megaterium*'a benzer olduğu ve 16S rDNA analiz sonuçlarına göre ise yüksek oranda *B. megaterium* ve *B. aryabhatai* benzediği bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada *B. megaterium* bakterisinin koloni rengi beyaz/krem renkli olduğu belirtilirken *B. aryabhatai* bakterisinin ise şeftali renkli olduğu bildirilmektedir [39]. Bu çalışmada izolatların koloni renklerinin krem renkli olması ve moleküler çalışmaları destekleyen biyokimyasal çalışmalar sonucu izolatların *B. megaterium* bakterisi olduğuna karar verilmiştir. VITEK 2 cihazı ile yapılan çalışma sonucunda T21, T22, T26, T29, T36 ve T58 numaralı izolatların *B. pumilus*'a benzer olduğu ve 16S rDNA sonuçlarının da yüksek oranda *B. pumilus*'a benzemesinden dolayı bu izolatların *B. pumilus*'e ait suşlar olduğu düşünülmektedir. Diğer izolatların (T6, T17, T23, T37, T40, T41, T46, T47, T53, T59, T60, T61) biyokimyasal ve moleküler analiz sonuçları benzer sonuçlar vermemesinden dolayı bu izolatlar *Bacillus* sp. olarak tanımlanmıştır.

Bacillus izolatlarının ekstrasellüler enzim aktivite sonuçları değerlendirildiğinde 38 izolatu amilaz, 53 izolatu lipaz/esteraz, 16 izolatu kitinaz, 7 izolatu ksilanaz, 2 izolatu pektinaz, 73 izolatu proteaz ve 35 izolatu selüloz ekstrasellüler enzim aktivitesi pozitif olarak bulunmuştur.

T26, T44, T51, T52, T62, T68, T69 ve T71 numaralı izolatlar kullanılan indikatör bakterilere karşı diğer izolatlara göre daha yüksek aktivite göstermişlerdir. *Bacillus* türleri ve *B. cereus* bakterileri antibiyotikler, proteinazlar ve bakteriyosinler gibi çeşitli biyolojik aktif

metabolitler üretmektedirler. Çoğu bakteri diğer bakterilere in vitro büyümeleri süresince inhibitör etki göstermektedir [40]. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler çok çalışılmıştır. *Bacillus*'larda özellikle *B. cereus* bakterileri ile ilgili bakteriyosin çalışmaları sınırlıdır. *B. coagulans* tarafından üretilen coagulin olarak adlandırılan plazmit kaynaklı antilisterial bakteriyosin Le Marrec vd. [41] tarafından rapor edilmiştir. Buna ilave olarak *B. subtilis* JH642 ve yabancı tipi *B. subtilis* 22A üretilen antilisterial peptid saflaştırılmıştır [42]. *B. licheniformis* 26-103RA suşu lichenin olarak adlandırılan bakteriyosin üretirken [43], *B. thuringiensis* tarafından Thuricin 7 üretilmektedir [44]. *Bacillus* türleri tarafından üretilen basitrisin, pumilin ve gramisidin antibiyotikleri Gram pozitif bakterilere (*Staphylococci*, *Streptococci*, *Corynebacter*, *Streptomyces*) karşı, tetrasiklin, kloramfenikol, vankomisin, gentamisin Gram negatif bakterilerine karşı ve *Lactobacillus lactis* tarafından üretilen nisin laktobacillus bakterilerine karşı kullanılmaktadır [45]. Antagonistik bakteriyal ajanlar ile bitki hastalıklarının kontrol etme çabaları başarılı bir şekilde yürütülmektedir [46, 47]. *Bacillus* türlerinin biyolojik kontrol mekanizmalarını aydınlatmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Antagonistik aktivite antibiyotik özellikli sekonder metabolitlerin üretimiyle çoğunlukla ilişkilidir [48, 49, 50].

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENTS)

Bu çalışma TUBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje no 113Z010). VITEK 2 cihazı ile ilgili çalışmaların yürütülmesinde gerekli kolaylığı sağlayan Giresun Gıda Kontrol Laboratuvar'ı idari personeline ve Mikrobiyoloji Birim Sorumlusu Sayın Hatice Karadeniz'e, bitki patojeni bakterilerini temin eden Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Fikretin Şahin'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] J.A. Radley, "Production of Microbial Amylolytic Enzymes: Starch Production Technology", Editör : Underkofler, L.A. Applied Science Publisher Ld. England, 1976.
- [2] S. Aira, K. Kilal ve A. Imanaka, "Cloning and Expression of Thermostable α -amylase Gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*", Applied and Environmental Microbiology, sayı 46, pp. 1059-1065, 1983.
- [3] T. O. Femi-Ola, ve I.I. Azeez, "Purification and Characterization of Beta-Amylase of *Bacillus subtilis* Isolated from Kolanut Weevil", Journal of Biology and Life Science, sayı 4, pp. 68-78, 2013.

- [4] R.K. Saxena, A. Sheoran, B. Giri ve S.W. Davidson, "Purification Strategies for Microbial Lipases", *Journal of Microbiological Methods*, sayı 52, pp. 1-18, 2003.
- [5] S. Ertuğrul, G. Dönmez ve S. Takaç, "Isolation of Lipase Producing *Bacillus* sp. from Olive Mill Wastewater and Improving its Enzyme Activity", *Journal of Hazardous Materials*, sayı 149, pp. 720-724, 2007.
- [6] J. Flach, P.E. Plet ve P. Jolles, "What's the New in Chitinase Research?", *Experientia*, sayı 48, pp. 701-716, 1992.
- [7] W. K. Roberts ve C. P. Selitrennikoff, "Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity", *Journal of General Microbiology*, sayı 134, pp. 169-176, 1988.
- [8] G.W. Goodey, "The Ecology of Chitin degradation", *Advances in Microbial Ecology*, sayı 11, pp. 387-430, 1990.
- [9] R. Leah, H. Tommerup, I. Svendsen ve J. Mundy, "Biochemical and Molecular Characterisation Three barley Seed Proteins with Antifungal Properties", *Journal of Biological Chemistry*, sayı 266, pp. 1564-1573, 1995.
- [10] B. L. Bassler, C. Yu, Y.C. Lee ve S. Roseman, "Chitin Utilization By Marine Bacteria: Degradation and Catabolism of Chitin-Oligosaccharides By *Vibrio furnissi*", *Journal of Biological Chemistry*, sayı 266, pp. 24276-24286, 1991.
- [11] J. Tomassen, A. Filloux, M. Bally, M. Murgier ve A. Lazdunski, "Protein Secretion In *Pseudomonas aeruginosa*", *FEMS Microbiology Reviews*, sayı 103, pp. 73-90, 1992.
- [12] K. Suzuki, M. Suzuki, M. Tayıyoji, N. Mikardou ve T. Watanabe, "Chitin-binding protein (Cbp-21) in the Culture Supernatant *Serratia marsescens* 2170", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 128-135, 1998.
- [13] V.W., Yang, Z., Zhuang, G. Elegir ve T.W. Jeffries, "Alkaline-active Xylanase Produced by an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolated from Kraft Pulp", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, sayı 15, pp. 434-441, 1995.
- [14] B.C. Salles, R.B. Cunha, W. Fontes, M.V. Sousa ve E.X.F. Filho, "Purification and Characterization of a New Xylanase from *Acrophialophora nainiana*", *Journal of Biotechnology*, sayı 81, pp. 199-204, 2000.
- [15] G. Gamerith, R. Groicher, S. Zeilinger, P. Herzog ve C.P. Kubicek, "Cellulase-Poor Xylanases Produced by *Trichoderma reesei* RUTC-30 on Hemicellulose Substrates", *Applied Microbiology and Biotechnology*, sayı 38, pp. 315-322, 1992.
- [16] N. Roy ve H.M. Rowshanul, "Isolation and Characterization of Xylanase Producing Strain of *Bacillus cereus* from Soil", *Microbiology*, sayı 1, pp. 49-53, 2009.
- [17] F. Yener, "Pektinaz Enziminin Farklı İki Destek Üzerine İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu", Yüksek lisans tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2007.
- [18] D. J. Mukesh Kumar, G.M. Saranya, K. Suresh, P.D. Andal, R. Rajakumar ve P. T. Kalaichelvan, "Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 Using Cassava Waste", *Asian Journal of Plant Science and Research*, sayı 2, pp. 369-375, 2012.
- [19] U.C. Banerjee, R.K. Sani, W. Azmi ve R. Soni, "Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its Characterization as a Laundry Detergent Additive", *Process Biochemistry*, sayı 35, pp. 213-219, 1999.
- [20] T.T. Teeri, A. Koivula, M. Linder, G. Wohlfahrt, C. Divne ve T.A. Jones, "Trichoderma reesei Cellobiohydrolases: Why so Efficient on Crystalline Cellulose", *Biochemical Society Transactions*, sayı 26, pp. 173-178, 1998.
- [21] P. Tomme, R.A. Warren ve N.R. Gilkes, "Cellulose Hydrolysis This Bacteria and Fungi", *Advances in Microbial Physiology*, sayı 37, pp. 1-81, 1995.
- [22] S. Ito, "Alkaline Cellulases from Alkaliphilic *Bacillus* Enzymatic Properties, Genetics, and Application to Detergents", *Extremophiles*, sayı 1, pp. 61-66, 1997.
- [23] C. Perez, C. Suarez, ve G.R. Castro, "Antimicrobial Activity Determined in Strains of *Bacillus circulans* Cluster", *Folia Microbiology*, sayı 38, pp. 25-28, 1993.
- [24] F.A. Sharif ve N.G. Alaeddinoğlu, "A Rapid and Simple Method for Staining of the Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis*", *Journal of Industrial Microbiology*, sayı 3, pp. 227-229, 1988.
- [25] T. Beffa, M. Blanc, P.F. Lyon, G. Vogt, M., Marchiani, J.L. Fischer ve M. Aragno, "Isolation of *Thermus* Strains from Hot Composts (60 to 80°C)", *Applied and Environmental Microbiology*, sayı 62, pp. 1723-1727, 1996.
- [26] J. Sambrook ve D.W. Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3. Basım)", New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [27] A. Çoşkun, "Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2010.

- [28] S. Okay, "Cloning of chitinase a gene (chia) from *Serratia marcescens* Bn10 and its expression in coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*", Yüksek Lisans Tezi. Middle East Technical University, Ankara, 2005.
- [29] W. Kugiyama, Y. Otani, Y. Hashimoto ve Y. Tagagi, "Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of Lipase Gene", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, sayı 14, pp. 185-190, 1980.
- [30] E. Haba, O. Bresko, C. Ferrer, A. Marqués, M. Busquets ve A. Manresa, "Isolation of Lipase-Secreting Bacteria by Deploying Selective Substrate", *Enzyme and Microbial Technology*, sayı 26, pp. 40-44, 2000.
- [31] D., Litthauer, A. Ginster ve E.V.E. Skein, "Pseudomonas luteola lipase: A new member of the 320-residue Pseudomonas lipase family", *Enzyme and Microbial Technology*, sayı 30, pp. 209-215, 2002.
- [32] A. Altan, "Isolation and Molecular Characterization of Extracellular Lipase and Pectinase Producing Bacteria from Olive Oil Mills", Yüksek lisans Tezi, 2004.
- [33] O.A.G. Ali, "Formation of proteases by *Aspergillus fumigatus* and *pencillium* sp.", *Journal of King Saud University*, sayı 4, pp. 127-136, 1992.
- [34] V.B.D., Skerman, V. McGowan ve P.H.A. Sneath, *Approved lists of bacterial names*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1989.
- [35] E. Berliner, Über die Schlaffsucht der mehlmottenraupe (*Ephestiakühniella* Zell) und ihren erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp., *Zeitschrift für ange-wandte Entomologie Berlin* 2, 29-56, 1915.
- [36] L.K. Nakamura, "*Bacillus pseudomycoides* sp nov.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, sayı 48, pp. 1031-1035, 1998.
- [37] S. Lechner, R. Mayr, K.P. Francis, B.M. Prüss, T. Kaplan, E. Wiessner-Gunkel, G.S. Stewart ve S. Scherer, "*Bacillus weihenstephanensis* sp nov. is a New Psychrotolerant Species of the *Bacillus cereus* Group", *International Journal of Systematic Bacteriology*, sayı 48, pp. 1373-1382, 1998.
- [38] M.-H. Guinebrière, S. Auger, N. Galleron, M. Contzen, B. De Sarrau, M.-L. DeBuyser, G. Lamberret, A. Fagerlund, P.E. Granum, D. Lereclus, P. De Vos, C. Nguyen-The ve A. Sorokin, "*Bacillus cytotoxicus* sp nov. is a New Thermo-tolerant Species of the *Bacillus cereus* Group Occasionally Associated with Foodpoisoning", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, sayı 63, pp. 31-40, 2013.
- [39] S. Shivaji, P. Chaturvedi, Z. Begum, P. K. Pindi, R. Manorama, D.A. Padmanaban, Y.S. Shouche, S. Pawar, P. Vaishampayan, C.B.S. Dutt, G.N. Datta, R.K. Manchanda, U.R. Rao, P.M. Bhargava ve J.V. Narlikar, "*Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., Isolated from Cryotubes Used for Collecting Air from the Upper Atmosphere", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, sayı 59, pp. 2977-2986, 2009.
- [40] J.R. Tagg, A.S. Dajani ve W.L. Wannamaker, "Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria", *Bacteriology Reviews*, sayı 40, pp. 722-756, 1976.
- [41] C., Le Marrec, B., Hyronimus, P., Bressollier, B., Verneuil, M.C., Urdaci, "Biochemical and Genetic Characterization of Coagulin, a New Antilisterial Bacteriocin in the Pediocin by *Bacillus coagulans* I(4)", *Applied and Environmental Microbiology*, sayı 66, pp. 5213-5220, 2000.
- [42] G. Zheng ve M.F. Slavik, "Isolation, Partial Purification and Characterisation of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated *Bacillus subtilis* strain", *Letters in Applied Microbiology*, sayı 28, pp. 363-367, 1999.
- [43] P. Pattnaik, J.K. Kaushik, S. Grover ve V.K. Batish, "Purification and Characterization of a Bacteriocin-like Compound (Lichenin) Produced Anaerobically by *Bacillus licheniformis* Isolated from water buffalo", *Journal of Applied Microbiology*, sayı 91, pp. 636-645, 2001.
- [44] A. Cherif, H. Ouzari, D. Daffonchio, H. Cherif, K. Ben Slama, A. Hassen, S. Jaoua ve A. Boudabous, "Thuricin 7: a Novel Bacteriocin Produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a New Strain Isolated from Soil", *Letters in Applied Microbiology*, sayı 32, pp. 243-247, 2001.
- [45] M.J. Waites, N.L. Morgan, J.S. Rockey ve G. Higton, "Industrial Microbiology an Introduction", London: Blackwell Publisher, 2008.
- [46] G. Wei, J.W. Kloepper ve S. Tuzun, "Induction of Systemic Resistance of Cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by Select Strains of Plant Growth-promoting Rhizobacteria", *Phytopathology*, sayı 81, pp. 1508-1512, 1991.
- [47] C. Chen, E.M. Bauske, G. Musson, R. Rodríguez-Kábana ve J.W. Kloepper, "Biological Control of Fusarium wilt on Cotton by Use of Endophytic Bacteria", *Biological Control* sayı 5, pp. 83-91, 1995.

- [48] L.A. Silo-Suh, B.J. Lethbridge, S.J. Raffel, H. He, J. Clardy ve J. Handelsman, “Biological Activities of Two Fungistatic Antibiotics Produced by *Bacillus cereus* UW85”, *Applied and Environmental Microbiology*, sayı 60, 2023-2030, 1994.
- [49] E.V. Stabb, L.M. Jacobson ve J. Handelsman, “Zwittermicin A-Producing Strains of *Bacillus cereus* from Diverse Soils”, *Applied and Environmental Microbiology*, sayı 60, pp. 4404-4412, 1994.
- [50] O. Asaka ve M. Shoda, “Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14”, *Applied and Environmental Microbiology*, sayı 62, pp. 4081-4085, 1996.