

***Bacillus* Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA 'ları¹**

Ebru Kalaylı² , Yavuz Beyatlı³

***Bacillus* Cinsi Hakkında Genel Bilgi**

Çubuk şeklinde düz ya da düze yakın hücrelerdir. Çoğu kötü şartlara dirençlidir. Genelde gram pozitifler. Peritrik flagellalı ve flagellaları hareketlidir. Aerobik ve fakültatif anaerobtur. Çoğunda oksijen terminal elektron alıcısıdır. Endospor oluştururlar. Vejetatif hücreler 0.5X1.2 µm ile 2.5X10 µm çapındadır. *Bacillus* genusunun koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilere de rastlanır. *B. mycoides* 'in kolonileri ise rizoid şekilde agarlı besiyortamı üzerine yayılır (1).

Bacillus 'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalırlar. Genellikle 35-37 °C da ve pH 7 civarında ürerler. Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürerler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren ; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (2).

Bacillus genusu uygun olmayan şartlarda spor oluşturma yeteneğindedir. Oluşturduğu endospor ise; silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olabilir. Buna ilaveten sporlar hücre içerisinde sentral yada subterminal olarak yerleşebilir. *Bacillus* 'ların hücre duvarı, hücre yüzeyini tamamiyle örten yüzey katmanı parakristalin oluşturur. *Bacillus* 'lar genellikle karbonhidrat kapsülü bulundururlar. Tipik habitatları toprak olmasına rağmen doğada geniş olarak, süt ve süt ürünlerinden hava su ve yiyecek gibi birçok ortamdan elde edilebilirler (3).

¹ Bu makale Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü 'nde Prof. Dr. Yavuz Beyatlı Danışmanlığı altında Ebru Kalaylı tarafından yapılan ve 2002 yılında tamamlanan "Süt ve Fermente Ürünlerden İzole Edilen Bazı *Bacillus* Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivite, PHB Üretim ve Plazmid DNA 'larının İncelenmesi" adlı Yüksek Lisans Tezinden hazırlanmıştır.

² Yüksek Lisans Öğrencisi, 3 Prof. Dr. Gazi Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Beşevler Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi beyatli@gazi.edu.tr

Katalaz ve asit üretirler ama gaz oluşturmazlar. *Bacillus* 'ların bazı türleri yiyecekler için önemli olabilir. Bazı *Bacillus* 'ların proteolitik enzimleri peynir yapımında kullanılabilir. Bazı türleri de böcek patojenidir (4).

Bacillus 'ların birkaç türü polipeptit sınıfından antibiyotik üretir. Antibiyotikler kültürlerde sporulasyon aşaması olduğu zaman oluşmaya başladığı gözlenmiştir (1).

Turnbell and Kramer (5)' in yaptıkları bir araştırmaya göre *Bacillus* türlerinin teşhisi ve türler arasındaki farklılıkların tespiti için spor ve sporangiyum morfolojileri temel alınmıştır. Buna göre de *Bacillus* 'lar 3 grupta toplanmıştır.

Birinci grup *Bacillus* 'larda kendi içlerinde A ve B olmak üzere ikiye ayrılır. Bu her iki grupta sporangia şişmemiştir. Sporlar elips veya silindirik şekilli, sentral veya terminal konumludur. Gram pozitifler. A grubu ve B grubu arasındaki fark ise A alt grubunda hücre genişliği 1µm den küçük, B alt grubunda ise 1µm den büyüktür. A alt grubuna örnek olarak *B. megaterium* ve *B. cereus*; B alt grubuna örnek olarak da *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus* ve *B. coagulans* verilebilir (5).

İkinci grupta yer alan *Bacillus* türlerinde sporangia şişmiştir. Sporları elips, sentral veya terminaldir. Bu grupta yer alan *Bacillus* türlerine örnek olarak *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alvei*, *B. laterosporus* ve *B. brevis* verilebilir (5).

Üçüncü grupta yer alan *Bacillus* türlerinde de sporangia şişmiştir. Sporlar küresel, subterminal veya terminal konumludur. Örneğin *B. sphaericus* bu gruba örnek olarak verilebilir (5).

Bu genus içindeki bakterilerin çoğu patojen değildir. İki adedi insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan basillerdir. Bunlar da *B. anthracis* ve *B. cereus* 'tur.

Bacillus anthracis insan ve hayvanlarda antraks, şarbon, çoban çıbanı denilen hastalığın etkenidir. Hastalık *B. anthracis* sporlarının zedelenmiş deri, mukozalar ve seyrek olarak solunum yolu ile akciğerlerden organizmaya girmeleri sonucunda oluşur. *B. anthracis* 'ler bulundukları yerden lenfa yolu ile kana yayılma ve orada çoğalma eğilimindedirler.

B. anthracis giriş kapısına göre deri şarbonu, akciğer şarbonu, bağırsak şarbonu ve sepsisemiye sebep olur (6).

B. subtilis toz, toprak, gübre, bitki ve hayvanlar ile süt ve sularda bulunan bir bakteridir. Sıtlı içeceklerin, ekmeğın, sebze ve meyvelerin bozulmasında etkindir. *B. subtilis* 'in kültür szntlerinden elde subtilin adı verilen bu maddenin bazı bakterilere karşı inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Bakteri aslında saprofit olmakla birlikte doğrudan doğruya doku ve özellikle göz içerisine girmesi sonucunda panoftalmi, iridoksilit gibi göz yangıları meydana getirebilir. *B. subtilis* 'in besin zehirlenmesi yaptığından da şüphelenilmektedir (6).

Nitrojen kaynağı, karbon kaynağı, oksijen düzeyi, süt komponentleri gibi etkenler sütte *B. cereus* 'un gelişimini etkiler. Aynı zamanda *B. cereus* 'un gelişimi sütün işlenmesi sırasındaki pH ve sıcaklığa da bağlıdır. Sporları pastörize sütte canlı olarak

kaldıklarından, sütlerin oda sıcaklığında bozulmasına yol açar. *B. cereus* diyare, bulantı- kusma olmak üzere, iki türlü gıda zehirlenmesi yapar (7).

B. brevis, *B. licheniformis*, *B. subtilis* ve *B. sphaericus*' un besin zehirlenmesine sebep olduğu belirtilmiştir (Buchanan et al.1974).

B. licheniformis bacteraemia, sepsisemi, periton iltihabı, korneal ülser ve göz iltihabı enfeksiyonlarından sorumludur. Diyare ve kusma-bulantı şeklinde de besin zehirlenmesine sebep olur (7).

B. stearothermophilus ve *B. coagulans* konservelede ekşimeye sebep olur. *B. sphaericus* bacteraemia, menenjit ve endokarditis olmak üzere 3 çeşit enfeksiyon etmenidir. Aynı zamanda böcek patojenidir. *B. brevis* ve *B. megaterium* besin zehirlenmesine sebep olabilir (7).

***Bacillus* ' ların Antimikrobiale  zellikleri**

Birçok araştırmacının değerlendirmesi sonucunda çeşitli süt ve fermente ürün mikroflorasında yer alan birçok bakterinin birbirleriyle etkileşimi olduğu gözlenmiştir. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda çeşitli süt fermente ürünlerden izole edilen bakterilerin *Bacillus* 'lar üzerine antimikrobiale aktivitesi incelenmiş *Bacillus* 'ların süt ve fermente ürünlerdeki diğer mikroorganizmalar üzerine etkisi çok az araştırmaya konu olmuştur.

Değişik bakteri türleri tarafından oluşturulan ve aynı türlerin farklı suşlarına öldürücü veya diğer bakteriler üzerine inhibe edici etkisi olan maddelere bakteriosin denir (8).

Bakteriosinler farklı bakterilerin ribozomal olarak sentezlediği antimikrobiale peptitlerdir. Üç grup içerisinde sınıflandırılır. Lanthibiotikler (modifiye edilmiş aminoasit lanthionine içeren), Cystibiotikler (onların aktivitesi için ya da daha fazla disülfit bağı içeren) ve Thiolbiotikler (bir aktif – SH grubu içeren) dir. Bakteriosin  retimi sporulasyon esnasında azalır (9).

Bazı *Bacillus* suşları sekonder metabolit olarak çeşitli maddeler üretiler ve bu maddelerinde farklı mikroorganizmalar üzerinde inhibitör aktivitesi vardır. *B. megaterium* ' dan elde edilen megacinler bu mikroorganizma ile ilişkide olan diğer mikroorganizmaları inhibe eder. *B. subtilis* 'ten izole edilen botrycidin AJ 1316 ve alirin B – 1 antifungal aktiviteye sahiptir. Yine *B.subtilis* 'ten elde edilen subtilin ve subtilosin A gram pozitif bakterilerin çoğu suşu üzerinde etkilidir. *B. licheniformis* M-4 den M-4 amoebicidal madde bakteri ve fungiye karşı aktif olduğu tespit edilmiştir (10). *B. brevis* gramisidin antibiyotiği üretilir. *B. polymyxa* 'dan polymyxin antibiyotiği elde edilir (7).

Antibiotikler çok az yoğunlukta dahi mikroorganizma gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli, sekonder metabolitlerdir. Bunlar mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici bakteriostatik veya fungustatik olabildikleri gibi; mikroorganizmanın ölümüne sebep olan “bakterisit” ve “fungisit” gibi maddelerde olabirler. Seçici toksisiteye sahip olduklarından, çok düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmaya zararlı olup, makroorganizmaya zarar vermezler (11).

B. thuringiensis HD-2 suşu tarafından üretilen bakteriosin thuricin olarak adlandırılmış bu maddenin gram pozitif bakterilere karşı aktif olduğu bildirilmiştir. Antibiyotığın SDS-PAGE' de jel üzerinde 2-3 mm' lik bant oluşturduğu tespit edilmiştir (12).

B. licheniformis ve *B. subtilis* suşları tarafından üretilen antibiotiğe bacitrosin adı verilmiştir. Genel olarak mikroorganizmalarda sekonder metabolitlerin üretimi logaritmik fazın sonunda, sporulasyondan önce meydana gelmektedir. Karbon kaynağı olarak glikozun ortamda kullanımı ve gelişmenin sonraki aşamaları sırasında azalan pH ile bacitrasin üretimi artmıştır. pH 8.0' da bacitrasin üretimi artarken, pH 8.4' de azalmaktadır (13).

Yapılan bir araştırmada *B. aurantinus* 'un gram pozitif bakteri ve anaeroplara karşı antimikrobal aktivite gösteren aurentinin A ve B' yi kapsayan bir yeni poliketit antibiyotik kompleksi meydana getirdiği açıklanmıştır (14).

Bir başka çalışmada *Bacillus* cinsinin yabani tip suşları antimikrobal aktivite için seçilmiştir. İki adet suşun *B. polymyxa* MIR 23 ve *B. circulans* MIR 13'ün *Micrococcus luteus* 'a karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bunlardan *B. polymyxa* MIR 23' ün *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Aspergillus niger* 'e karşı aktif olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık *B. circulans* MIR 13 bu organizmalara karşı aktif olmadığı gözlenmiştir. Çalışmada *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. polymyxa* ATCC 10401 suşları standart antibiyotik üretici suş olarak kullanılmıştır (15).

Son yıllarda çoğu mikroorganizma antibiyotiklere direnç kazanmıştır. Bu sebepten dolayı yabani tip mikroorganizmaların antibiyotik üretmesi veya geniş antimikrobal aktiviteye sahip olması çok önem taşımaktadır. Bu antibiyotiklerin patojenlere karşı etkili olması önemli görülmüştür (15).

Perez ve ark. (16) yaptıkları bir çalışmada, gram negatif mikroorganizmalara karşı aktif antimikrobal maddeye sahip olan MIR 15 suşunu elde etmişlerdir. Bu suştan elde edilen antimikrobal maddenin kullanım avantajları ve biyokimyasal yapısı hakkında bilgi verilmiştir. Antimikrobal maddenin profilleri ve üretimi kültivasyon sıcaklığı ile çeşitlilik göstermiştir.

Bu suş tarafından antibiyotik üretimi 37 °C' de meydana gelmektedir. Bu suşun oluşturduğu antibiyotik ve antimikrobal aktivitesi *B. subtilis* ATCC 6633 MIR 15 suşu ile karşılaştırıldığında bu suşun antimikrobal gücü dikkate değer bulunmuş ve standart suş olarak seçilmiştir. Suş *E. coli* ve *P. aeruginosa* gibi gram negatif mikroorganizmalara karşı antimikrobal aktivite göstermiştir. Suş tarafından üretilen antimikrobiyal madde diğer *Bacillus* suşları tarafından üretilen polimiksin ve tyrotrisin' in etkisine benzetilmiştir.

MIR 15 suşunun çok sayıda antibiyotiğe direnç gösteren *P. aeruginosa* 'ya karşı aktifliğinin önemli olduğu açıklanmıştır (16).

B. subtilis FHC 402 tarafından üretilen antibakteriyal faktörün bir glikopeptit olabileceği gösterilmiştir. Antibakteriyal faktörün moleküler ağırlığı jel filtrasyonu ile 3200 olarak tahmin edilmiştir. Diğer araştırmalarda *Bacillus* türleri bacitrasin, polimiksin, brebistin ve peptit antibiyotik gibi birkaç peptit antibakteriyal faktör

ürettikleri bildirilmiştir. Bu antibakteriyal faktörlerin moleküler ağırlıklarının *B. subtilis* FHC 402 nin antibakteriyal faktöründen daha az olduğuna gösterilmiştir (17).

Bakteriyal faktör ve hekzametafosfatın birlikte kullanımı ile ve sistemin non-toksisitesi sağlandığı zaman yiyeceklerin çoğu tipinde gram negatif bakterilerin proliferasyonunu engellemek için önemli olduğu düşünülmüştür (17).

Bacillus 'lar üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Kaynak olarak Denizli Acıgöl'den izole edilen 23 adet *Bacillus* türü TEM-FA-1 den TEM-FA-23'e doğru sıralanarak adlandırılmıştır. Suşların antimikrobial aktiviteleri *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *M. luteus*, *Proteus vulgaris*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis* ve *Candida albicans* 'a karşı denenmiştir. Elde edilen sonuçlardan antibiyotiğin peptit yapısında olduğu ve çoğunlukla Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu, bunun yanında Gram negatif bakterilere etkisinin az olduğu gösterilmiştir. Suşlar tarafından üretilen antibiyotiklerin antifungal aktivitelerinin az olduğu bildirilmiştir (18).

B. subtilis ATCC 39374 ve ATCC 39320 suşları ile yapılan bir çalışmada, suşların polyenlakton fostat esterleri olan diffisidin ve oksidiffisidin olarak adlandırılan antibiyotikler ürettiği bildirilmiştir. Ayrıca bu iki suşdan bacillin antibiyotiği de izole edilmiştir. Diffisidin ve oksidiffisidinin bir veya daha fazla antibiyotiğe dirençli olan insan patojenlerinin çoğuna, anaerob ve aerob bakterilere karşı geniş ve kuvvetli bir aktiviteye sahip olduğu açıklanmıştır. Diffisidin ve oksidiffisidin antimikrobial maddelerinin protein sentezini etkilediği, bakterisidal etkisinin olduğu belirtilmiştir (19).

Günümüzde bilinen 8000 antibiyotiğin kayıtlarda var olduğu belirtilmiş ve buna her yıl yüzlercesinin eklendiği ilave edilmektedir. Buna rağmen yeni antibiyotiklerin arayış ve keşfinin beklenildiği belirtilmiştir. Bu açıdan bakıldığında *Bacillus* genusu antibiyotik üretici kaynak olarak gösterilmiştir (18).

Yapılan çalışmaların çoğunda *Bacillus* izolasyonu topraktan, besinsel kaynaklardan ya da bitkisel kaynaklardan elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *Bacillus* suşu sarımsağın rizosferinden elde edilmiştir. Suşun sarımsakta çürümeye yol açan *Fusarium oxysporum* üzerine etkisi araştırılmıştır. İzole edilen *Bacillus polymyxa* KT-8 suşu tarafından üretilen maddeye fusarisidin A adı verilmiştir. Madde funguslara karşı önemli ölçüde aktif, *Micrococcus luteus* ve *Staphylococcus aureus* gibi Gram pozitif bakterilere karşı aktif olduğu, bununla birlikte Gram negatif bakterilere karşı antimikrobial aktivitesinin olmadığı belirtilmiştir (20).

Bacillus polymyxa KT-8 suşu ile yapılan diğer bir çalışmada da, bu suşun ürettiği fusarisidin B, C ve D elde edilmiştir. Bunların antimikrobial aktiviteleri fusarisidin A ile karşılaştırılmıştır. Fusarisidin B ve C, fusarisidin A'da olduğu gibi funguslara karşı güçlü bir aktivite göstermiştir. Yine fusarisidin B, C ve D *Staphylococcus aureus* ve *Micrococcus luteus* gibi Gram pozitif bakterilere karşı güçlü aktivite göstermiştir. Fusarisidin B ise *Candida albicans* IFO 1594 ve *Saccharomyces cerevisiae* HUT 7099 gibi mayalara karşı orta derecede aktif olduğu bulunmuştur. Bununla beraber fusarisidin C ve D' nin mayalara karşı aktif olmadığı belirtilmiştir (21).

Çeşitli sebeplerden dolayı fungusitlerin kullanımının istenmeyen sonuçlar doğurması ve ekonomik olmaması sebebi ile de alternatif arayışlarına başlanmıştır. Bundan dolayı da biyolojik kontrol cazip bir duruma gelmiştir. Biyolojik kontrolde *Bacillus* genusu bakteriler üzerine dikkatleri yoğunlaştırmıştır.

Bacillus türlerinin biyolojik kontrol ajanı olarak cazip olmasının sebepleri, toprakta bol miktarda bulunmaları, çeşitli biyolojik aktif metabolitlerin üretimi ve sabit sıcaklık dirençli spor formlarını oluşturma yetenekleri olarak rapor edilmiştir (22).

B. subtilis ATCC 6633 suşu antifungal peptit antibiyotik potansiyeli içeren mycosubtilin üreticisi olarak teşhis edilmiştir (23).

B. brevis 'in durgun faz kültür hücreleri siklik dekaeptitler gramisidin S ve tirosidin ürettiği tespit edilmiştir (24).

B. subtilis siklik peptit antibiyotik mycobacillin, iturin A, bacillomysin, mycosubtilin, fungustatin, subsporin, bacillisin ve fengimisin ürettiği bulunmuştur (25).

B. subtilis FS 94 ile yapılan çalışmada, filtratlarının fungusidal ve fungustatik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (25).

B.cereus UW85' in iki yeni antibiyotik Zwittermisin A ve antibiyotik B ürettiği bulunmuştur. Bakteri filtratlarının hastalığa neden olan *Phytophthora medicaginis* bakterisini baskıladığı belirtilmiştir (22).

B. subtilis üzerine yapılan bir araştırmada bakterinin antifungal etkisi *Penicillium* ve *Aspergillus* suşları üzerinde araştırılmıştır. Bakterinin *Penicillium* üzerinde daha fazla antifungal aktivite gösterdiği açıklanmıştır (26).

Bacillus sp.' lerden izole edilen, önceden tanımlanan peptidal antibiyotiklerden biyolojik ve kimyasal olarak farklı *Bacillus cereus* UW85 ten izole edilen yeni bir lineer aminopolyol izole edilmiştir ve buna Zwittermisin A adı verilmiştir. Bu maddenin yapısı spektrofotometrik metodlarla tespit edilmiştir (27). Zwittermisin A' nın *Phytophthora medicaginis* ' in sebep olduğu bitkisel hastalığı engellediği belirtilmiştir. Bu maddeyi üreten başka *Bacillus* suşları üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda *B. thuringiensis* 'inde bu maddeyi ürettiği bulunmuştur (28).

Polihidroksibitürik Asit (PHB) Üretiminde Kullanılan *Bacillus* ' lar

Gelişen dünya şartları beraberinde aşırı plastik kullanımını da getirmiştir. Kullanılan bu plastiğin miktarı günümüzde korkunç boyutlara ulaşmıştır. Plastiklerin büyük bir çoğunluğu kullanımdan sonra ortama atık plastik olarak terk edilmektedir. Bu da beraberinde aşırı bir çevre kirliliğini getirmektedir. Günümüzde halen kullanılmakta olan plastik petrolden elde edilen polietilen maddesinden yapılmaktadır ki bunun tabiatla parçalanması yüzlerce yıl almaktadır. İşte bu sebeplerden dolayı bilim adamlarının dikkatini doğada mikroorganizmalarca parçalanabilen biyoplastik maddesi çekmiştir.

Bacillus subtilis kültürleri distile suda otolize olduğu zaman pH'ının bilinmeyen bir asit oluşumu nedeni ile azaldığı bildirilmiştir. Bu bilinmeyen asitin diyabetli hastalardan alınan idrardaki β -hidroksibütirik aside benzer bir bileşik olduğu bulunmuştur. β -hidroksibütirik asit, önceleri diyabetli hastaların salgıladığı keton bileşiklerinden biri olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonunda Lemoigne pozitif olarak intraselüler poli- β -hidroksibütirik asit olarak *B. megaterium* 'un otolizi sırasında ortaya çıkan β -hidroksibütirik asit monomerinin kaynağı olduğu tespit edilmiştir (29).

Doğal PHB granülleri ilk kez *Bacillus megaterium* ve *Azotobacter beijerinckii* 'nin hücre ekstraktından izole edilmiştir. Saf *Bacillus megaterium* granülleri için gliserollü hem farklı hemde gradientli santrifüjler kullanmışlar ve orijinal sentez aktivitelerinin yaklaşık %30' unu tutan preparasyonlarını güvenli bulmuşlardır (30).

Nickerson (31), NaBr' de yoğun gradient santrifüjü ile *Bacillus thuringiensis* 'in sporlu kültürlerinden PHB granüllerini saflaştırmış ve spordan PHB granüllerini ayırabilmiştir.

Benoit ve ark. (32), *Bacillus thuringiensis* HD-1 suşunun sporlasyon esnasındaki PHB üretimi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu suşun asetatın tümünü yada bir kısmını 2-3 bütandiol çemberine dönüşüm için okside ettiği görülmüştür. Glikoz pruvata fermente olmuştur. Çemberden ayrılan asetat PHB üretim için kullanılmıştır ki PHB' de karbon bir enerji kaynağı olarak spor formasyonu esnasında tüketilmiştir.

B. amyloliquefaciens DSM7, *B. cereus* DMS31, *B. circulans* DSM1529, *B. laterosporus* DSM335, *B. licheniformis* DSM394, *B. macerans* DSM7068, *B. megaterium* DSM90, *B. mycoides* DSM2048, *B. sphaericus* DSM28, *B. subtilis* DSM10, *B. thuringiensis* DSM2046 suşları üzerinde yapılan çalışmalarda propiyonik asit, valerik asit ve heptanoik asitin bulunuşunda poli-D-(-)-3-hidroksibütirat (poli-HB) ve poli-D-(-)-3-hidroksivalat (poli-HV)' in üretimi karşılaştırılmıştır. Propiyonik asitte gelişmenin iyi olduğu gözlenmiştir. Valerik asitte propiyonik aside göre gelişmenin zayıf olduğu fakat poli-HV yüzde miktarının arttığı bildirilmiştir. Heptanoik asitte ise gelişme ve poli-HB oranının düşük olduğu açıklanmıştır. Heptanoik asitte poli-HV eser miktarda tespit edilmiştir. Bunun sebebide heptanoik asidin toksik etkisine bağlanmıştır (33).

Dave ve ark. (34) yapmış oldukları bir çalışmada petrokimyasal atıklarda *Bacillus* cinsinin üretilmesi ve ürettikleri PHB miktarını araştırmışlardır. 12 suş üzerinde yapılan çalışmada 10 *Bacillus* suşu PHB üretmiştir. Ortama glukoz ilavesi ile üretim 13 kat artmıştır. Karbon kaynağı olarak ortama asetat ve laktoz ilave edildiğinde PHB üretiminde azalma bulunmuştur.

B. cereus ve *B. megaterium* 'dan polihidroksialkonatları teşhis ve karakterize etmek için proton-NMR spektroskopisi, kütle spektrofotometrisi, gaz kromatografisi ile kombine olan bir prolizis metodu kullanılmıştır (35).

Bacillus 'larda Plazmid DNA Çalışmaları

Bazı prokaryotik ve mikrobiyal ökaryotik canlılarda kendi büyük sirküler ve sarmal kromozomlarından ayrı olarak diğer genetik elementler de bulunmaktadır. Bunlara genel olarak plazmid adı verilmektedir.

Ekstranükleer elementler bazı özel genetik bilgiler taşırlar ve bunları da diğer mikroorganizmalara transfer edebilirler. Plazmidler çift iplikçikli sirküler ve sarmal bir yapı özelliğine sahiptirler. Bakterilerin stoplazmaları içinde (plazmid) bulunabileceği gibi, kromozomlarda birleşebilirler (episom). Plazmidler bir bakterinin yaşamı için gerekli değildir. Plazmidler bakterilere bazı özel yetenekler kazandırır.

Plazmidler bakteri hücresi içinde kendi bağımsız durumlarını devam ettirebilecek ve otonom replikasyon kapasitesini koruyabilecek genetik bilgilere sahiptirler (35).

Bacillus cinsine ait suşların sergilediği çok farklı özellikler, bu bakterilerin taşıdıkları Plazmid DNA' ları ilginç bir hale getirmiştir. Bu bakteriler üzerinde birçok araştırma yapılmış ve halen devam edilmektedir.

Bacillus popilliae' nin farklı suşlarından plazmidlerin farklı dizilişleri rapor edilmiştir. Plazmidlerin rutin çalışmaları sırasında üç plazmid tespit edilmiş, pBP149, pBP082 ve pBP043 olarak belirtilmiştir. Bunlardan pBP149 ve pBP082 yaklaşık olarak 12 ± 0.4 ve 7.4 ± 0.1 kb ağırlığında oldukları bulunmuştur. pBP043 ise 4.9 ± 0.3 kb olarak belirtilmiştir (36).

Yapılan bir araştırmada *B. subtilis* 168' in içerdiği yüksek kopya sayılı p5'αB10 varlığı gösterilmiştir. Plazmide eksponansiyel, erken durgun ve geç durgun fazlarda rastlanılmıştır. Üç gelişme periyodunun geç durgun faz örnekleri daha çok kromozomal DNA kontaminasyonuna ile bulunduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni çoğalan nükleaz aktivitesi ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Düşük kopyalı *B. subtilis* plazmidi için hücreler geç eksponansiyel ya da erken eksponansiyel fazda olduğu periyotlarda iyi sonuç alınabileceği vurgulanmıştır (37).

B.thuringiensis suşu üzerinde yapılan bir çalışmada bu suшта bulunan insektisidal kristal proteinlerin üretimini sağlayan özgül plazmidlerin gerekliliği araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonunda *B. thuringiensis* suşunun 5 farklı plazmid içerdiği bulunmuştur. Plazmidlerin bulunuşlarının gelişme şartları ve gelişme zamanına bağlı olduğu belirtilmiştir. Düşük plazmidlerin LB besi ortamında iken logaritmik faz sırasında yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. LB Broth besi ortamında hücreler durgun faza girdiklerinde iki adet yüksek molekül ağırlıklı plazmidin güçlükle görüldüğü belirlenmiştir (38).

Besleyici bakımdan zengin broth kültürlerde 20- 25 saat civarında daha kolayca *B. thuringiensis* var. *israelensis* ' in geniş plazmidleri tespit edilmiştir (39).

İnkübasyon sıcaklığının toksin maddenin sentezlenmesinde etkili olduğu Afkhami ve ark. (38) tarafından açıklanmıştır. *B. thuringiensis* 'in 81 plazmidi üzerinde yapılan çalışmada 25 °C, 30 °C, 37 °C ve 42 °C' lik inkübasyon sıcaklıkları kullanıldığında, LB ortamında 16. saatte yükselen sıcaklıkla birlikte toksik maddenin arttığı gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada 1100 adet *Bacillus* suşu su ve denizlerden izole edilmiştir. İzolatların 33 adedinde toplam 102 plazmid bulunduğu belirtilmiştir. Plazmidlerin dağılımı ise, 11 suşun 1 plazmid, 17 suşun 2-5 plazmid içerdiği gözlenmiştir. Çalışmada, 3 suşun 6- 9 plazmid, 2 suşunda 10 yada daha fazla plazmid içerdiği tespit edilmiştir. Tüm plazmidlerin moleküler ağırlığı 1.9-210 MDa arasında belirlenmiştir. 19 adet suşun plazmidleri 20 Mda' dan büyük, 15 suşun plazmidleri 20-50 MDa arasında bulunduğu, 7 suşun 50- 100 MDa ve 11 suşun 100 MDa' dan büyük plazmid içerdiği belirlenmiştir. 21 adet suşta orta derecede moleküler kütleyle sahip plazmid (4-20 MDa) tespit edilirken, 12 suşta düşük moleküler ağırlıklı plazmid (1.9-3.9 MDa) bulunmuştur (40).

Marin ve ark. (41) tarafından yapılan bir çalışmada *Lepidoptera* 'ya karşı toksisite gösteren çoğu *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD- 3a3b suşundan 15 kbp' lik plazmid DNA izole edilmiştir ve bu plazmidin *Lepidoptera* 'ya karşı toksisite ile ilgili olduğu bulunmuştur.

Bir başka çalışmada da 30 MDa dan büyük plazmide insektisidal kristal proteinleri kodlayan genlerin yerleştiği belirtilmiştir (42).

B. stearothermophilus fermantasyon teknolojisinde önemli bir termofilik bakteridir. Bu bakterinin aynı zamanda *B. subtilis* ile açıklanamayan bir ilişkisi vardır. Bu iki suşta kanamisin yada tetrasikline dirençli genlerden birini kodlayan Plazmid DNA' ları içermektedir. Tüm antibiyotik dirençli termofilik *Bacillus* ' lar için plazmid DNA' lar incelendiği zaman yüzlerce izolat arasından 35 suşta küçük plazmid (<10 kb) bulunmuştur. Antibiyotik dirençli plasmidin 4 tipi denemelerde elde edilmiştir. Termofilik *Bacillus* T9 suşdan pTHT9, T15 suşdan pTHT15, T22 suşdan pTHT22 ve N1 suşdan da pTHN1 plazmidleri izole edilmiştir. Bu plazmidlerde tetrasiklin dirençli geni kodlayan kısım bulunmuştur (43).

Bacillus suşlarıyla yapılan diğer bir çalışmada da *B. thuringiensis* var. *israelensis* suşunun delta-endotoksin kristallerinin insektisidal aktivitesi ve bunun plasmid bağlantısı incelenmiştir. Çalışma sonucunda bakterinin 70 MDa' luk plasmidin delta-endotoksin protein üretimi ile ilgili olduğu açıklanmıştır (39).

Bugüne kadar yapılmış olan çalışmaların verileri doğrultusunda δ endotoksin ile ilgili plasmidlerin oldukça büyük moleküler ağırlığında olduğu, bunlardan en küçüğünün 29 MDa olarak belirtilmiştir. *B. thuringiensis* HD- 1' de ise 44 MDa' dan 130 MDa' na kadar plazmidlerin varlığı gösterilmiştir (44, 45).

B. thuringiensis sub sp. *cameroun* serotip H32 üzerinde yapılan bir çalışmada bu suşun 9 plazmidi içerdiği gözlenmiştir. İzole edilen 7 adet plazmidin moleküler ağırlıkları 4.8-113 kb arasında değiştiği belirtilmiştir. Bir plazmidin 4.8 kb den küçük, diğerinde 113 kb' dan daha büyük olduğu vurgulanmıştır (44).

B. megaterium ' un 2 tip bakteriosin ürettiği (megasin A ve megasin C) belirtilmiştir. *B. megaterium* ATCC 19213 suşu üzerinde yapılan bir araştırmada her iki bakteriosin üretiminde plazmid DNA' lar tarafından kodlandığı açıklanmıştır. Bunlardan megasin A-19213' ün 29 MDa' luk pBM113 plazmidi üzerinde kodlandığı belirtilmiştir (46, 47).

Yapılan bir başka araştırmada tetrasiklin dirençli *Bacillus thuringiensis* suşlarında bu fonksiyonla ilgili plazmid DNA' lar tespit edilmiş, plazmitlerin *B. cereus* ve *B. anthracis* bakterilerine aktarımı sağlanmıştır. Bu plazmitler ise, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 4049' da pXO13 plazmidi (72 MDa), *B. thuringiensis* subsp. *taumanoffi* 4059' da pXO14 (54 MDa); *B. thuringiensis* subsp. *alesti* YAL' da pXO15 (50 MDa) ve *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* BIS' da pXO16 (>120 MDa) olarak gösterilmiştir (48).

Bazen *Bacillus* suşlarında Plazmid DNA' ya içine entegre olmuş faj genomlarına da rastlanabilmektedir. Bununla ilgili bir çalışmada *Bacillus thuringiensis* AF101 suşunda 69 kb' lık plazmid entegre olabilen faj (37 W-1) genomu üzerinde çalışmalar yapılmıştır (49).

Yararlanılan Kaynaklar

1. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., 1974, Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edition, The Williams and Wilkins Company, 1246 p. Baltimore.
2. Taubman, S., 1992, Genus *Bacillus*, Contemporary Oral Microbiology and Immunology, 355-356.
3. Robinson, R. K., 1985, Dairy Microbiol., 258p.
4. Bonwart, G. J., 1989, Basic Food Microbiology, Van Nostrand Reinhold, 773p., New York.
5. Turnbull, P. C. B. and Kramer. J. M., 1991, *Bacillus*: Manual of clinical Microbiology, Fifth Edition, Balows, A., Hauster, J. R., Herman, K. L., Isenberg, H. D. and Shadomy, H. J., American Society of Microbiology, Washington D. C., 296-303.
6. Bilgehan, H., 1995, *Bacillus* Genusu: Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları, 529-532, İzmir.
7. Logan, N. A., 1988, *Bacillus* species of medical and veterinary importance, J. Med. Microbiol., 25, 157-165.
8. Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J., 1994, Bacteriocins: Biology of Microorganisms, Seventh Edition, 264-265.
9. Oscariz, J. C., Lasa, I., Pisabarro, A. G., 1999, Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *B. cereus* with a broad spectrum of activity, FEMS Microbiol. Lett., 178, 337-341.
10. Zheng, G. & Slavik, M. F., 1999, Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain, Lett. in Appl. Microbiol., 28, 363-367.
11. Kayser, F., Bienz, K., Eckert, J. and Lindemann, J., 1997, Kemoterapinin temel ilkeleri. Tıbbi Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitapevleri, 117-133.
12. Montgomery, E., Favlet, M. E. and Allan, A. Y., 1989, Thuricin: The bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*, J. of Invert. Pathol., 53, 206-216.
13. Azevedo, E. C., Rios, E. M., Pukushima, K. and Campos-Takaki, G. M., 1993, Bactericin production by a new strain of *Bacillus subtilis*, Appl. Biochem. and Biotech., 42, 1-7.
14. Nakagawa, A., Konda, Y., Hatano, A., Harigaya, Y., Onda, M. and Omura, S., 1988, Structure and biosynthesis of novel antibiotics, Aurentinins A and B produced by *Bacillus aurentinus*, J. Org. Chem., 53, 2660-2661.

15. Perez, C., Suarez, C. and Castro, G. R., 1993, Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* cluster folia, *Microbiol.*, 38 (1), 25-28.
16. Perez, C., Suarez, C. and Castro, G. R., 1992, Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15, *J. of Biotechnol.*, 26, 331-336.
17. Miyamoto, T., Yoshimoto, M., Tsutsumi, M., Yamada, K. and Hatano, S., 1986, Purification and some properties of an antibacterial factor derived from *Bacillus subtilis* FHC 402, *Agric. Biol. Chem.*, 50 (5), 1169-1176.
18. Eltem, R. ve Uçar, F., 1998, Bir soda (Na₂SO₄) gölü olan Denizli (Acıgöl)' den izole edilmiş 23 *Bacillus* suşunun antimikrobiyal aktivite spektrumlarının saptanması, *Kükem Derg.*, 21, 1, 57-64.
19. Zimmerman, S. B., Schwartz, C. D., Monaghan, R. L., Pelak, B. A., Weisberger, B., Gilfillan, E. C., Mochales, S., Hernandez, S., Currie, S. A., Tejera, E. and Stapley, E. O., 1986, Difficidin and oxididifficin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis* I. Production, Taxonomy and Antibacterial Activity, *The J. of Antibiotics*, XL, 12, 1677-1681.
20. Kajimura, Y. and Kaneda, M., 1996, Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, 49 (2), 129-135.
21. Kajimura, Y. and Kaneda, M., 1997, Fusaricidin B, C and D, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: isolation, structure elucidation and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, 50 (3), 220-228.
22. 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. and Environ. Microbiol.*, 60 (6), 2023-2030.
23. Duitman, E. H., Hamoen, L., Rembold, M. and Venema, G., 1999, The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an aminotransferase and a fatty acid synthase. *Genetics*, 96 (23), 13294-13299.
24. Marahiel, M. A., Nakano, M. M. and Zuber, P., 1993, Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.*, 7 (5), 631-636.
25. Schreiber, L. R., Gregory, G. F., Krause, C. R. and Ichida, J. M., 1988, Production, partial purification and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by a *Bacillus subtilis* isolate from *Ulmus americana*. *Can. J. Bot.*, 66, 2338-2346.
26. Hussain, S., Lane, S. D. and Price, D. N., 1994, A preliminary evaluation of the use of microbial culture filtrates for the control of contaminants in plant tissue culture systems, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 36, 45-51.
27. He, H., Silo-Suh, L. A., Handelsmann, J. and Clardy, J., 1994, Zwittermisin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. *Tetrahedron Lett.*, 35, 16, 2499-2502.
28. Stabb, E. V., Jacobson, L. M. and Handelsmann, J., 1994, Zwittermisin A producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 60 (12), 4404-4412.
29. Lafferty, R. M., Korsatko, B. and Korsatko, W., 1988, Microbial production of poly-β hydroxy butyric acid B. 135-176, *Biotechnology*, v. 6b, *Special Microbial Processes*, Rehm, H. J. and Reed, G. (eds.), VCH erlagsgesellschaft mbH, Weinheim, FRG, 810p.
30. Anderson, A. J. and Dawes, A. E., 1990, Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Rev.*, 54 (4), 450-472.

31. Nickerson, K. W., 1982, Purification of poly- β - hydroxybutyrate by density gradient centrifugation in sodium bromide, *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1208-1209.
32. Benoit, T. G., Wilson, G. R. and Baugh, C. L., 1990, Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1, *Lett. in Appl. Microbiol.*, 10, 15-18.
33. Chen, G. Q., König, K-H., Lafferty, R. M., 1991, Occurrence of poly- D (-)- 3 – hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 84, 173-176.
34. Dave, H., Ramakrishna, C. and Desai, J. D., 1996, Production of polyhydroxy butyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp. IPCB-403, *Indian J. of Exper. Biology*, 34, 216-219.
35. Morikawa, H. and Marchessault, R. H., 1981, Pyrolysis of bacterial polyalkanoates, *Can. J. Microbiol.*, 59, 2306-2313.
36. Valyasevi, R., Kyle, M. M., Christie, P. J., Steincraus, K. H., 1990, Plasmids in *Bacillus popillie*, *J. of Invert. Pathol.*, 56, 286-288.
37. Voskuil, M. I. and Chambliss, G. H., 1993, Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis*, *Appl. And Environ. Microbiol.*, 1138-1142.
38. Afkhami, P., Özcengiz, G., Alaeddinoğlu, N. G., 1993, Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* 81 and its crystal-negative mutants, *Biotechnol. Lett.*, 15 (12), 1247-1252.
39. Himeno, M., Ikeda, M., Sen, K., Koyama, N., Komano, T., Yamamoto, H. and Nakayama, I., 1985, Plasmids and insectidal activity of delta- endotoxin crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Agric. Biol. Chem.*, 49 (3), 573-580.
40. Belliveau, B. H., Starodub, M. E. and Trevors, J. T., 1991, Occurrence of antibiotic and metal resistance and plasmids in *Bacillus* strains isolated from marine sediment, *Can. J. Microbiol.*, 37, 513-520.
41. Marin R., Tanguay, R. M., Vale'ro, J., Letarte, R. and Bellemare, G., 1992, Isolation and sequence of a 2 kbp miniplasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-3a3b: Relationship with miniplasmid of other *B. thuringiensis* strains, *FEMS Microbiol. Lett.*, 94, 263-270.
42. Chambers, J. A., Jelen, A., Gilbert, P., Jany, C. S., Johnson, T. B. and Gavron-Burke, C., 1991, Isolation and characterization of a novel insecticidal Crystal Protein Gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *J. of Bacteriol.*, 173 (13), 3966-3976.
43. Hoshino, T., Ikeda, T., Narushima, H. and Tomizuka, N., 1985, Isolation and characterization of antibiotic-resistance plasmids in thermophilic bacilli, *Can. J. Microbiol.*, 31, 339-345.
44. Salama, H. S., Ali, A. M. M. and Sharaby, A., 1991, The determination of antibiotic-resistant genes linked to endotoxin genes in *Bacillus thuringiensis* Berliner, *J. Appl. Ent.*, 112, 422-424.
45. Kronstad, J. W., Schnepf, H. E. and Whiteley, H. R., 1983, Diversity of location for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes, *Journal of Bacteriol.*, 154, 419-428.
46. Von Tersch, M. A. and Carlton, B. C., 1983, Megacinogenic plasmids of *Bacillus megaterium*, *J. of Bacteriol.*, 155 (2), 872-877.
47. Von-Tersch, M. A. and Carlton, B. C., 1983, Bacteriocin from *Bacillus megaterium* ATCC 19213: Comparative studies with Megacin A- 216, *J. of Bacteriol.*, 155 (2), 866-871.
48. Reddy, A., Batisti, L. and Thome, C. B., 1987, Identification of self- transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies, *J. of Bacteriol.*, 169 (11), 5263-5270.
49. Kanda, K., Tan, Y. And Aizawz, K., 1989, Anovel phage genome integrated into a plasmid in *Bacillus thuringiensis* strains AF101, *J. of Gen. Microbiol.*, 135, 3035- 3041.