

Balıklardan İzole Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi¹

Pınar Kaynar², Yavuz Beyatlı³

Giriş

Ülkemiz üç tarafının denizlerle çevrili olması ve farklı coğrafik yapısından dolayı farklı iklimlerin yaşanması nedeniyle su ürünleri özellikle çeşitli balık türleri açısından zenginleşmiştir.

İnsan gıdası olarak tüketilen balıklarda dominant bakterileri tanımlamak suretiyle bu besinlerin bakteriyolojik kalitesini belirlemek, aynı zamanda da bozulma nedenlerini öğrenmek mümkündür. Bu amaçla deniz ve tatlı su balıklarının deri, solungaç ve bağırsak mikroflorası incelenmektedir (1).

Günümüzde balık ve su ürünlerinden *Bacillus* cinsi bakterilerin izolasyon ve tanımlanma çalışmaları yanında bu bakterilerin birçok özellikleri de araştırılmaya başlanmıştır (2, 3).

Bacillus cinsi bakteriler kolay üretilibilmeleri ve endüstriyel öneme sahip olmaları (antibiyotik, enzim, toksin, biyoplastik gibi) sebebiyle bakteriler dünyasında dikkat çeken ve üzerinde geniş çalışmaların yapıldığı mikroorganizmalardandır (4).

Balıklar Hakkında Genel Bilgi

Balık ve su ürünleri günümüzde tüketilen proteinli yiyeceklerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Protein içeriği % 17-20 olan balık eti artan dünya nüfusuna paralel olarak hayvansal protein açığının giderilmesinde önemli bir yere sahiptir. Bu protein gereksiniminin karşılanması amacıyla üretimin artırılması ile birlikte ürünün kalitesinin korunarak tüketiciye ulaştırılması da büyük önem taşımaktadır (5).

¹ Bu çalışma Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. Yavuz Beyatlı danışmanlığı altında Pınar (Mursaloğlu) Kaynar tarafından yapılan ve 2003 yılında tamamlanan "Balıklardan İzole Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi"adlı Doktora tezinden alınmıştır.

² Dr. Biyolog, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı, Gıda Güvenliği Beslenme ve Araştırma Müdürlüğü Sıhhiye Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: pınarmkaynar@yahoo.com

³ Prof. Dr., Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Beşevler Ankara.

Gelişen teknoloji ile birlikte balıkların bugüne kadar alışagelmış hazırlanma şekilleri dışında da çeşitli preparatlar halinde üretilmesini mümkün kılmaktadır. Bu gelişme, balık tüketiminin artışında çok önemli bir etken oluşturmaktadır.

Bunun yanında insan gıdası halinde tüketilmesi söz konusu olmayan balıkların ve balık yan ürünlerinin de un haline dönüştürülerek, hayvan beslenmesinde değerlendirilmesi yaygın bir uygulama yöntemidir. Bu suretle tüketilemeyen balık ve yan ürünlerinin daha değerli protein kaynaklarına dönüştürülmesinin hayvansal protein açığının giderilmesinde önemli bir aşama kaydedilmesini sağlamaktadır (6).

Balıklar çok çeşitli yapıda olup, genel olarak gövdeleri yandan basık ve baştan kuyruğa doğru gittikçe daralmaktadır. Balıkların vücutları pullarla kaplı ve çok çeşitli hareketler yapan omurgalı hayvanlardır (6, 7).

Balıklarda proteinin yanı sıra önemli miktarda vitamin ve mineral madde bulunmakta ve bu ürünlerin beslenme değerinin de yüksek olduğu görülmektedir. Yağ miktarı balık etlerine göre değişiklik gösterip, karbonhidrat ise hemen hemen hiç bulunmamaktadır (8).

Çok yüksek bir besin değerine sahip olan ve diğer protein kaynaklarına göre ucuz bulunan balık ve su ürünleri mikrobiyal bozulmaya karşı çok duyarlıdır. Bu nedenle uygun şekilde işlenmesine ve saklanmasına özel dikkat edilmesi gerekmektedir (8).

Balıkların bozulması ölümden sonra yavaş yavaş oluşan ve sonunda onları insan gıdası olarak kullanılmayacak hale getiren bir işlemler zinciridir. Bu değişiklikler sırasıyla renk, kıvam, koku ve lezzet yönünden kendini göstererek, balığın kalitesini düşürmekte ve hatta tüketilme olanağını tamamen ortadan kaldırmaktadır. Balık bozulmaları otoliz, oksidasyon, bakteriyel bozulma ve bu faktörlerin birlikte faaliyeti ile gerçekleşmektedir (6, 9).

Balığın bozulmaya en duyarlı kısmı solungaç bölgesi olup, ilk olarak burada kötü kokunun ortaya çıkması ile duyuşal bozulma görülmektedir. Bunun yanında balığın bağırsakları da önemli bir mikroorganizma kaynağıdır. Balık yakalandıktan hemen sonra bağırsakları çıkarılmazsa mikroorganizmalar buradan ete kolayca geçmektedir. Balığın bozulması ile trimetilamin, amonyak, histamin, hidrojen sülfür, indol ve diğer bazı bileşikler de oluşmaktadır (8).

Balıkların bozulmasında proteolitik enzimlerinde büyük bir rolü vardır. Bu enzimler balık bağırsağında normal bulunurlar ve yine bağırsakta bulunan bazı mikroorganizmalar tarafından oluşturulup, bozulmalara neden olurlar (8).

Bu sebeplerden dolayı balık ve su ürünlerinin üretiminden son ürüne kadar geçen aşamalarda deniz suyu, hammaddenin özellikleri, işleme, ambalajlama, depolama ve nakliye koşulları belirli hijyen ve sanitasyon kurallarına bağlanmalı ve her aşamada işlemler standartlaştırılmalıdır. Ülkemizde son ürüne kadar hazırlanan standartların işlem basamaklarına göre düzenlenmesi için çalışmalar yapılmaktadır (10, 11).

Balık bozulmasına neden olan bakteriler trimetilaminoksiti (TMAO) trimetilene indirgerler ve bu madde balıksı kokuya sahip olup, nitrojen metabolizmasının son

ürünü olmaktadır. TMA miktarının artışı ile bakterilerin çoğalma hızı ve aktiviteleri ile ilişkili olup, bozulma kriteri olarak verilmektedir (12).

Cattaneo ve Cantoni, taze ve işlem görmüş çeşitli balıklarda bozulmayı gösteren histaminin varlığını belirlemek için çalışmışlardır. Muhafaza amaçlı işlem görmüş balık örneklerinde histaminin varlığı belirlenmemiştir. Ancak işlem görmemiş iki balık örneğinde *Bacillus* sp. bağlı histaminin oluşum belirtileri tespit edilmiştir (13).

İnsan gıdası olarak tüketilen balıkların bakteriyolojik kalitesini inceleyerek, dominant bakterileri belirlemek ve balıkların bozulma nedenlerini ortaya koymak için deri, solungaç ve bağırsak mikroflorası üzerine çalışmalar yapılmaktadır (1, 14, 15).

Avlanmış balıkların buz içerisinde muhafaza edilerek tüketiciye kadar bozulmadan kısa bir sürede ulaşması gerekmektedir. Enzimatik ve mikrobiyal bozulmalar 0°C' de en aza inmektedir. Balıkların buz içerisinde bulunmadığı durumda ise enzimatik ve mikrobiyal aktivite artarak, bozulmaya yol açmaktadır (12, 14).

Amerika Birleşik Devletlerin' de balıkların mikroorganizmalara karşı korunması amacıyla antibiyotiklerden de sıkça yararlanılmaktadır. Antibiyotiklerden penisilin ve streptomisin ile yapılan denemelerden tatminkar bir sonuç alınmazken, kloromisetin ve aureomisin antibiyotikleri ile iyi bir sonuç alınmıştır (6).

Balığın dondurularak saklandığında ise fiziksel yapısında önemli bir değişiklik olmamasına rağmen tat ve kokusunda değişikliğe neden olmaktadır (16).

Balıkların bozulmalarında psikrofil ve mezofil mikroorganizmalar etkili olup, primer olarak *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacter* gibi bakteriler ile bazı mantar ve mayalar bulunmaktadır. Sekonder olarak *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Micrococcus* gibi bakteriler bulunmakta olup, yanlış uygulamalar veya fabrikasyon hatalarından dolayı balıkların bozulmalarına neden olmaktadır (17).

Yenilebilir tüm balık çeşitlerinin avlandıkları alanlardaki suların mikrobiyal yüküne bağlı olarak intestinal (bağırsak) mikroflora bulundurlar. Balıkların organ ve bağırsaklarının mikroflorası beslenme şekli ve gıda tipine de bağlıdır. Balıklarda hem aerobik hem de anaerobik mikroorganizmalar bulunur (18).

Ringo ve Strom, ticari yemlerle beslenen balıklarda *Aeromonas* ve *Pseudomonas* bakterilerin dominant olduklarını bulurken; balık yumurtaları ile beslenen balıklarda ise *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakterilerin dominant olduklarını tespit etmişlerdir (19).

Balıkların avlandıktan sonra tüketime kadar geçen sürede uygulanan işlemler ve muhafaza edildikleri ortam koşullarına bağlı olarak deri, solungaç ve bağırsaklardaki mikroorganizmalar kasa geçmektedirler. Bundan dolayı kas yüksek oranda kontamine olmuş enfeksiyon (tifo, kolera, hepatit, polimelitis) veya toksikasyonlara (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Clostridium*, *E. coli*, *Sreptococcus*) sebep olabilmektedir (14, 18).

Balıklardaki mikroorganizma farklılığının nedenleri balık türüne, balığın avlandığı mevsime ve avlandığı yerin kirlilik derecesine göre değişmektedir. Balıklardaki

mikroorganizma sayısının kışın daha yüksek olmasının sebebi ise diğer mevsimlere göre bu mevsimde fekal kirlenmenin daha yoğun olduğu bir bölgede avlanmaları olarak düşünülmektedir (20).

Yapılan araştırmalar sonucunda taze balıklarda genellikle *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Gaffkya*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Photobacterium*, *Kurthia* ve *Serratia* cinsine ait bakteriler ile bazı mayaların bulunduğu tespit edilmiştir (8).

Norveç kaynaklı bazı balıkların yüzey, mide ve bağırsak sistemlerinde *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* cinslerinin dominant, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Coryneform* ve *Streptococcus* cinslerin de dominant olmayan bakteriler olarak buldukları gözlenmiştir (19).

Yapılan bir çalışmada, kalkan balığının iç organlarında *Vibrio* ve *Pseudomonas*'ın dominant olduğu belirlenmiştir (21). Başka bir çalışmada ise hamsi balıklarında *Micrococcus* sp. ve *Lactobacillus* sp. bulunduğu tespit edilmiştir (22).

Atlantik salmon, sardalya ve uskumru balıkları üzerine çalışma yapılmış ve bu balıkların deri ve bağırsak florasında *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Coryneform*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* ve *Vibrio* gibi mikroorganizmalar saptanmıştır. Başka bir çalışmada da Avustralya, Afrika ve Hindistan'daki çeşitli balıkların derilerinde bulunan bakteriyel florada Gram pozitif bakterilerin dominant olduğunu özellikle de *Bacillus*, *Micrococcus* ve *Coryneform* bakterilerin daha çok bulunduğu belirlenmiştir (23).

Keban Baraj Göl'ünde bulunan küpeli sazan balıklarının deri florasında *Bacillus*, *Coryneform*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Stapylococcus* ve *Shigella* bakterilerinin oluşturduğu Gram pozitif bakteriler görülmüştür (24).

Alur ve arkadaşları, uskumru balığından *Pseudomonas marinolutinosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus megaterium* ve *Micrococcus colpogenes* bakterilerini izole etmişlerdir (25).

Johnson ve Bishop, yaptıkları çalışmada kurutulmuş balıkları istila eden böcek larvalarına karşı aktiviteye sahip *Bacillus thuringiensis*'in yeni bir suşunu izole edip, tanımlamışlardır. Balık işleme yerlerinde yapılacak insektisidal muamelelerde bu suşun kullanım potansiyelinin olduğunu düşünmüşlerdir (2).

Kim ve arkadaşları, balık işleme ve satış yerlerinden topladıkları balık eti unlarının mikrobiyal kalitesini ve özelliklerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda ısıya en dirençli bakteri olarak *Bacillus licheniformis* bakterisinin olduğunu tanımlamışlardır. Bunun yanında bu bakterinin güçlü bir proteolitik aktiviteye sahip olduğunu da tespit etmişlerdir (26).

Sung, tuzlu fermente edilmiş balık örneklerinin protein konsantrasyonunda *Bacillus* sp. türlerinin bulunduğunu görmüştür. Bu türlerin son üründe bulunmasının sebebini de işleme sırasındaki kontaminasyondan kaynaklandığını tespit etmiştir (27).

Balık enfeksiyonu olarak ilk kez gökkuşuğu alabalığından izole edilen *Nocardia* spp. belirlenmiş ve özellikle insanlar üzerinde etkili olup, immün sistemi uyararak, ateş yaptığı görülmüştür (28).

Japonya' da çiğ deniz balıklarının yenilmesiyle meydana gelen akut gastroenteritis vakalarına *Vibrio parahaemolyticus*'un neden olduğu 1951 yılından beri bilinmektedir (6). Ayrıca *Erysipelothrix insidiosa*'nın deniz balıklarının işlendiği yerlerde çalışan kişilerin ellerine balık kılçıklarının batmasıyla bu kişilerin ellerinde yaralara sebep olmaktadır (6, 8).

Gıda kaynaklı zehirlenmeleri meydana getiren *Bacillus cereus* ve *Clostridium botulinum* bakterileri balık kökenli zehirlenmelerde de görülmektedirler (6, 8, 29).

Bacillus Cinsi Hakkında Genel Bilgi

Bacillaceae familyası içinde yer alan *Bacillus* cinsi bakteriler Gram pozitif, çubuk şekilli, endospor oluşturan, aerob veya fakültatif anaerob olan mikroorganizmalardır. *Bacillus*'ların vejetatif hücreleri tek başına veya zincir şeklinde bulunabilir. 0,5x1,2 µm - 2,5x10 µm büyüklükte olan hücrelerin yuvarlak veya köşeli şekilde görünüşleri vardır (4, 30, 31).

Genellikle aerobik koşullar altında ortamda gıda maddelerinin tam olarak sarf olmadığı veya gıda maddelerinin (mineral maddeler, üreme faktörleri, nitrojen, karbon ve enerji kaynakları) azaldığı ve çevresel koşulların değiştiği durumlarda olgun basiller içersinde spor oluşmaktadır. Sporilasyon işlemi bakteri üremesinin duraksama fazında gerçekleşmektedir. Sporlar genellikle oval veya yuvarlak şekilde olup, hücrenin çeşitli yerlerinde bulunabilirler. Normal fiziksel faktörlere (ısı, ışık, donma, kuruma, radyasyon, vs), kimyasal maddelere (dezenfektanlar, vs) ve mekanik tesirlere karşı vejetatif formlarından çok daha fazla dayanıklıdırlar (4, 32).

Bacillus bakterilerinin hücrelerinde genelde sitoplazmik membran üzerinde bir veya birkaç aniyonik polimer ve birkaç peptidoglikan tabaka ile sarılmış hücre duvarı bulunmaktadır. Bazı *Bacillus* türleri hücre duvarından ayrı olarak ve hücre duvarının dışında jelatinöz, viskoz, elastik veya mukoid karakterde olan kapsül içermektedirler. *Bacillus anthracis*'de bulunan kapsül virülens etkiye sebep olmaktadır (4, 31, 32).

Ayrıca, bazı *Bacillus* türünde ince, uzun, dalgalı, fleksibilitesi fazla, sarmal yapıda ve hareketi sağlayan "flagellum" organeli bulunmaktadır. *Bacillus anthracis*'de hiç flagellum bulunmazken *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* bakterilerinde fazlaca flagellum bulunmaktadır (4, 31, 32).

Bacillus'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunmaktadır. Çok yüksek ısı derecelerinde bile canlı kalabilirler. Genellikle 30- 40 °C' de ve pH 7 civarında ürerler (33).

Bacillus bakterileri karbon kaynağı olarak organik asit, şeker, alkol ve nitrojen kaynağı olarak amonyum içeren besiyerlerinde iyi gelişirler. Gelişimleri sıvı ve katı besiyerlerinin üst kısımlarında olmaktadır. Katı besiyerlerinde kenarları ve üzeri pürüzlü, granüller yapıda olan koloniler meydana getirirler (30, 32, 33).

*Bacillus*lar özellikle spor oluşturdıkları için hemen her yerde örneğin toprak, toz, saman, gıda, su, deniz ve tatlı su sedimentleri, balık ve su ürünleri, inek gübresi, bitki rizosferi, bazı böceklerin larvaları ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinden izole edilebilirler (4, 30, 34).

Bacillus'ların spor formasyonu 70⁰C' de 10 dakika pastörizasyon işlemi ile tanınması kolaylaşmaktadır. *Bacillus* sporları toprak, su ve gıda gibi birçok yerden izole edilirler. İzolasyon işleminde spor formlarının sığağa dirençli olma özelliğinden yararlanılır (31).

Bacillus türlerinin çeşitli besinlerde bulduklarında besin maddesinin dönüşümü ve bozulmasına sebep olmaktadır. *Bacillus cereus* pastörize süt ve süt ürünlerinde kontaminant olan önemli bir türdür (35).

Bacillus bakterileri genelde Embden-Meyerhof metabolizma yolunu ve terminal elektron alıcısı olarak oksijeni kullanırlar (4, 31).

Bacillus cinsi bakteriler kolay üretilebilmeleri, endüstriyel öneme sahip olmaları (antibiyotik, enzim, toksin, biyoplastik gibi) ve patojeniteleri sebebiyle bakteriler dünyasında dikkat çeken ve üzerinde geniş çalışmalar yapıldığı mikroorganizmalar grubuna girer (4).

Bacillus bakterileri tarafından üretilen subtilisin, protez, amilaz gibi endüstriyel enzimler deterjan, besin, eczacılık gibi birçok endüstri alanında kullanılmaktadır (4, 36).

Bulaşıcı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin üretiminde de *Bacillus* bakterilerinden yararlanılmaktadır. Örneğin *Bacillus polymyxa* polimiksini, *Bacillus subtilis* subtilini ve *Bacillus licheniformis* basitrasini üretmektedir (4).

Ayrıca *Bacillus* bakterilerinin çeşitli böceklere karşı insektisit etkileri bulunmaktadır (4). Yapılan bir çalışmada kurutulmuş balıkları istila eden böcek larvalarına karşı aktiviteye sahip *Bacillus thuringiensis*'in yeni bir suşu izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Balık işleme yerlerinde yapılacak insektisidal muamelelerde bu suşun kullanılabileceği düşünülmektedir (2).

Aynı zamanda *Bacillus* cinsleri arasında başlıca iki tanesi insan ve hayvanlarda hastalık oluşturmaktadır. Bu bakterilerden biri başlıca ot yiyen hayvanlarda görülen ve şarbon denilen hastalığı sebep olan *B. anthracis*'dir. *B. anthracis* bulunduğu hayvanlardan veya ürünlerinden insanlara bulaşmaktadır. Diğer *Bacillus* türü ise pişmiş pirinç, makarna, et ve kümes hayvanları, sebze yemekleri, çeşitli çorbalar, pudingler, baharat ve soslarda görülen ve gıda zehirlenmesine neden olan *B. cereus*'tur. *B. cereus* ile kontamine olmuş gıdalar pişirildikten sonra yeterince ve hızlı soğutulmadıklarından veya gıdaların hazırlanması ile tüketimi arasındaki süre uzadığından canlı ve ısıya dirençli sporları bulunan bakteri hücreleri çoğalarak, gıda zehirlenmesine neden olabilecek düzeyde toksin oluşturmaktadır (37, 38).

Bacillus Cinsinde Toplam Hücre Protein Profili

Mikroorganizmaların tanımlanmasında morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmaktadır. Ancak yapılan testler sonucunda yanlış tanımlamalar yapılarak, orijinal mikroorganizmalardan bir veya birkaç yönden ayrı özellikte farklı tür altında değerlendirilmektedir. Bu durumda tür ayırımının güçleşmesine neden olmaktadır (39, 40).

Mikroorganizmaların sahip olduğu geniş fenotipik çeşitlilik yanında geniş bir filogenetik dağılımlarından dolayı gelişmiş moleküler tekniklerle elde edilen moleküler kriterler organizmaların gruplandırılmasında önemli bir yere sahiptir (4).

Protein jel elektorforezi mikrobiyal sistematikte özellikle tür ve alt tür düzeylerinin belirlenmesinde en güvenilir teknik olarak yıllardır kullanılmaktadır. Bu teknik ile tür ve alt türlere ait suşların hücresel proteinleri karşılaştırılarak taksonomik akrabalık sınırları belirlenmektedir (41, 42, 43, 44).

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektorforezi (SDS-PAGE) ile 47 adet *Bacillus circulans* suşunun toplam hücre protein profilleri çıkarılarak, API testlerinden elde edilen biyokimyasal özellikleri karşılaştırılmış ve iki ana gruba ayrılan suşların protein profillerinin % 78 oranında birbirine benzediği görülmüştür. İkinci grupta yer alan bakterilerin daha yakın biyokimyasal özellikler gösterme gibi ortak özelliklerinin de olduğu görülmüştür (45).

Parasporal inklüzyon kristalleri üreten üç farklı *Bacillus thuringiensis* subsp. suşunun delta endotoksin kristal proteinleri SDS-PAGE üzerinde her biri farklı bir dizi vermiştir (46).

Tek bir toprak örneğinden izole edilen 10 *Bacillus thuringiensis* izolatu 3 antijenik sero gruba ayrılmış ve sivrisineklere karşı ılımlı larvasidal aktiviteler göstermiştir. SDS-PAGE analizi sonucunda ise izolatlar arasında protein profilleri bakımından çok yüksek benzerliğin olduğu ve güçlü bir immünolojik akrabalığın bulunduğu görülmüştür (47).

Bacillus thuringiensis subsp. fukuokaesensis in SDS-PAGE analizi kullanılarak, kristal protein profilini 90, 86, 82, 72, 50, 48, 37 ve 27 kD' luk polipeptitler olarak açığa çıkarılmıştır. Bozulmamış tam olan kristal proteinlerin sivrisineklere karşı olan etkisinin *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*' e göre çok düşük olduğu belirlenmiştir. *Bacillus thuringiensis subsp. fukuokaesensis*' in bu proteinleri ile *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* arasında çok az immünolojik akrabalığın bulunduğu tespit edilmiştir (48).

Hastalık etmeni olan *Bacillus cereus* bakterisi türünün toplam hücre protein profili ve alt tiplendirilmesinin yapıldığı çalışmada, 58 *Bacillus cereus* izolatının bir biyotip varlığında 3 antibiyogram ve 22 toplam hücre protein profiline ulaşıkları görülmüştür. SDS-PAGE analizi ile *B. cereus* izolatları arasında % 38 oranında bir benzerlik bulunduğu için heterojen bir yapı belirlenmiştir. Predominant özellik gösteren 13 *B. cereus* izolatu ile birlikte *B. cereus* ATCC 14579 suşunun polimeraz zincir reaksiyonuyla (PCR) yapılan alt tiplendirilmesinde yaklaşık % 89 benzerlik görülmüştür. Toplam hücre protein profiline göre *Bacillus* cinsi bakterilerin

tiplendirilmesi yapılabilmekte ve pilot epidemiyolojik çalışmalar için PCR'ın yanı sıra toplam hücre protein profillerinin yardımıyla da tiplendirmenin yapılacağı belirtilmiştir (49).

Sivrisinek patojeni olan ve olmayan *Bacillus sphaericus* suşlarının toplam hücre protein profillerine bakıldığında patojenik suşların farklı bir yapıya sahip oldukları tespit edilmiştir. Mikrobiyal türlerin farklılaşması ve karakterizasyonunda poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile elde edilen toplam hücre protein profillerin kullanılabilceği bildirilmiştir (43).

Başka bir çalışmada ise *B. sphaericus* suşlarının gruplandırılmasında bakteriyosin aktivitelerinden de yararlanıldığı ve DNA homoloji gruplarındaki suşlar arasında bakteriyosin profillerinin benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Buna göre *B. sphaericus* H5a5b suşunun benzer bakteriyosin aktivitesi gösterdiği ve poliakrilamid jeldeki bakteriyosin bandının benzer olduğu görülmüştür (50).

Çökmüş ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada ise UV ile muamele edilmiş toksik *Bacillus sphaericus* suşlarının larvasidal aktivitesini belirlemişlerdir. SDS-PAGE analizi ile moleküler ağırlıkları bilinen toksik protein bantların varlıkları araştırılmış ve bazı maddelerin gösterdiği koruyucu etkiler tespit edilmiştir(51).

Bacillus cereus TZ415 suşunun toplam hücre protein profillerine göre farklı pH' larda ve farklı büyüme evrelerinde oluşturduğu aside dayanıklılık cevapları tespit edilmiştir. Bu suşun geç durgun fazda aside karşı tolerans düzeyinin en yüksek seviyeye ulaştığı ve bu toplam hücre protein profillerindeki değişiklikler ile belirlenmiştir (52).

***Bacillus* Cinsinin Proteolitik Aktivitesi**

Proteaz enzimi genellikle ekstrasellüler enzim olup, hücre dışındaki büyük moleküle sahip proteinleri hidrolize ederek küçük ünitelere yani aminoasitlere ayırmaktadır (32).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan proteaz enzimi genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizma tarafından üretilen enzimlerin katalitik aktivitelerinin hayvansal ve bitkisel kaynaklara göre daha yüksek olması, daha fazla miktarda elde edilmesi, daha stabil, daha ucuz olmaları nedeniyle mikrobiyal enzim üretimi ve uygulanmaları konusunda dikkat çekmektedir (53, 54).

Bununla birlikte gıdalar üzerinde gelişen bazı mikroorganizmalar proteinleri hidrolize ederek, tat ve koku bileşenleri üzerinde olumsuz etkiye neden olabilmektedirler. Psikrotrofik mikroorganizmalardan bazıları kuvvetli proteolitik özellikleri nedeniyle süt, et ve deniz ürünlerinde istenmeyen değişikliklere neden olabilmektedirler. Özellikle depolama süresi boyunca bu mikroorganizmalar çoğalmakta ve bazen gıdayı tüketilemeyecek hale getirmektedirler. Proteolitik mikroorganizma türleri arasında *Bacillus* cinsi bakteriler başta yer almaktadırlar (55, 56).

Balık eti ununun mikrobiyal niteliğini ve izole edilen termodurik bakterilerin özellikleri araştırılırken ısıya en duyarlı bakteri olarak *Bacillus licheniformis* bakterisinin olduğu,

20 °C' den daha yüksek sıcaklıklarda geliştiği ve çok güçlü proteolitik aktivite sahip olduğu görülmüştür (26).

Güçlü proteolitik enzimler kullanılarak hızlandırılmış metotlar ile düşük tuz konsantrasyonunda fermente edilmiş hamsi balıkların üretimi için bu balıklardan güçlü proteolitik bakteriler izole edilmiş ve bu bakterilerin bakteriyolojik karakteristikleri ve proteaz enzim özellikleri belirlenmiştir. En güçlü proteolitik aktiviteye sahip olan *Bacillus subtilis* bakterisinin endüstriyel kullanım için yararlı olabileceği düşünülmüştür (57,58).

Fermente balıklardan izole edilmiş farklı sekiz *Bacillus* suşu oda sıcaklığında (35°C) ve 18 saat gelişimleri sonrasında proteolitik enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Sekiz suştan sadece dörtünde (3 izolat *Bacillus subtilis* ve 1 izolat *Bacillus licheniformis*) yüksek proteaz aktivite göstermiştir. Proteaz enzimlerinin 55°C'de 20 dakika sonra orijinal aktivitelerinin sadece % 40'ını tutabildikleri ve 65°C'de tüm aktivitelerini kaybettikleri tespit edilmiştir (59).

Diğer mikroorganizmalar tarafından sentezlenen enzimlerle parçalanmayan "keratin" in *Bacillus hicheniformis* tarafından sentezlenen proteaz enzimi olan keratinaz tarafından parçalanabilmektedir. Keratinolitik *Bacillus* suşları sadece özgün keratinazları değil aynı zamanda tripsin, kimotripsin ve subtilisin benzeri proteazlar üretmektedirler. Keratinaz enziminin üretimi özellikle kuş ve tavuk tüylerinin parçalanmasında önem taşımaktadır (60).

Deri işlenmesi, deterjan endüstrisi, X- ışın filmlerinden gümüşün geri kazanımı ve protein hidrozatların üretimi gibi uygulamalarda kullanılabilecek ekstrasellüler olarak salınan alkalın proteazları *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. stearothermophilus* tarafından üretilmektedir (61).

Bozulmuş deniz ürünlerinden izole edilen suşların (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* ve *Alcaligenes* sp.) % 1 skim milk içeren Nutrient Agar besiyerindeki proteolitik aktiviteleri çeşitli durumlar altında belirlenmiştir (62). *Bacillus subtilis*' in bakteriyel ekzoproteaz salgı yoğunluğunun proteinli besiyerlerindeki protein konsantrasyonu ile doğrusal bağlı olduğu görülmüştür. Aminoasitlerin de bakteriyel proteolitik aktivitenin doğru düzenleyicileri olduğu ileri sürülmektedir (63).

Bazı yeşil ve mavi-yeşil alg kültürlerinin çevreleri içerisinde proteolitik enzimleri salgılayamadıkları görülmektedir. Bakteri ile alg kültürünün birlikte buldukları ortam şartlarında ise bakteri (*Bacillus subtilis*) tarafından üretilen proteaz enziminin 1,5-2,5 kat arttığı tespit edilmiştir. Bu durumda bakterinin doğal uyarıcı etkisiyle alg polisakkaritli maddeleri salgılamaya başlamaktadır (64).

Bacillus stearothermophilus tarafından üretilen proteaz enziminin aktif çamur parçalanmasında kimyasal ve ekonomik yararlar sağlamaktadır. Atık aktif çamur parçalanmasında önemli enzimatik reaksiyonlarından birinin proteolizis olduğu belirtilmektedir. Termofilik bakteriler tarafından üretilen ısıya dayanıklı proteaz enzimlerinin termofilik aerobik parçalanma olayında ve aktif çamurun ayrıştırılmasında bulunma gerekliliği açıklanmaktadır (65).

Bacillus Cinsinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Mikroorganizmalar tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklı ve organik doğal ürünler olan antimikrobiyal maddeler, seçici toksisiteye sahip olduklarından çok düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmaya zarar verip, makroorganizmaya zarar vermezler. Antimikrobiyal maddeler biyolojik kökenli ikincil metabolitler olup, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici “bakteriostatik” veya “fungostatik” olabildikleri gibi mikroorganizmanın ölümüne neden olan “bakterisit” veya “fungusit” ler de olabilirler (66, 67).

Antimikrobiyal maddeler günümüzde tedavi amaçlı olarak tıp alanında antibiyotik olarak kullanılmaktadırlar. Ancak son zamanlarda antibakteriyel ve antifungal ilaçlara karşı dirençli mikroorganizmaların varlığı tespit edilmektedir. Bu mikroorganizmalara karşı tek yönlü etkili olan antibiyotiklerin etkisi zayıf kalmaktadır. Araştırmalar değişik ve güçlü antibiyotik üreten, geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip yeni mikroorganizmalar üzerindeki çalışmalara önem vermektedirler (66, 68).

Bu amaçla *Bacillus* cinsi bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. *Bacillus* cinsi bakterilerin genellikle farklı mekanizmalarla sentez edilen birkaç hücre dışı peptid antibiyotikleri ürettikleri ve bu antibiyotiklerinde daha çok Gram pozitif bakterilere karşı etkili oldukları belirlenmiştir. Gram negatiflere etkili olan geniş spektrumlu ve antifungal antibiyotik üretiminin az olduğu tespit edilmiştir (68, 69, 70, 71).

Drablos, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen basitrasin antibiyotığının birçok Gram pozitif ve bazı Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesinin olduğunu tespit etmiştir (72).

Bacillus bakterileri peptid, biosurfaktant, aminoglikozit ve fosfolipit yapıda antimikrobiyal maddeler üretmektedirler (73, 74, 75, 76, 77).

Bacillus subtilis NB22 suşu tarafından üretilen lipopeptid antibiyotik iturin olarak adlandırılmıştır (78).

Bacillus türlerinin antibakteriyel ajan olarak kullanılmalarının yanı sıra antifungal (79, 80), antiviral (81) antiamöbitik (82, 83) ve antimikoplazma (84) ajanı olarak da kullanılan geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler.

Balık üretim merkezlerindeki ciddi ticari kayıplara karşı *Bacillus* bakterilerinin ürettiği antibiyotiklerden yararlanılabileceği düşünülmektedir (85). Ayrıca *Bacillus* bakterilerinin birçok bitki hastalıklarını da inhibe ettikleri görülmüştür (80, 86).

Bacillus subtilis'in 3 suşundan izole edilen aminokoumasin A ve noaminokoumasin adlı antibiyotiklerin kronik gastrit, ülser ve mide kanserine yol açan *Helicobacter pylori* üzerinde etkili olması önemli bir gelişme olarak değerlendirilmektedir (87).

Şekerkamışı fermantasyonundan izole edilen yeni *Bacillus subtilis* C 126 suşunun ürettiği antibiyotik ile *Micrococcus flavus* 'un gelişiminin inhibe edildiği tespit edilmiştir (88).

Bacillus aurantinus tarafından üretilen aurantin A ve B' nin yeni bir poliketit antibiyotik kompleksi oldukları ve özellikle anaerob, Gram pozitif bakterilere karşı etkili oldukları belirlenmiştir (89).

Bacillus circulans J2154'den izole edilen lipopeptit yapıdaki sirkulosinlerin Gram pozitif bakterilere ve piperasiline dirençli streptokoklar ile vankomisine dirençli enterokoklara karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (90).

Topraktan izole edilen *Bacillus* suşlarının antibiyotik madde üretim kabiliyetleri incelendiği zaman sadece % 25'inin *Micrococcus luteus*'u inhibe ettiği görülmüştür. *Bacillus circulans* ve *Bacillus polymyxa* olarak tanımlanan suşlarda ise ekstrasellüler antibiyotik aktivite gözlenmiştir. *B. polymyxa*'nın *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Aspergillus niger*'e karşı aktivitesi bulunurken, *B. circulans*'ın bu organizmalara karşı aktivitesi bulunmamıştır. *B. polymyxa* ATCC 10401 tarafından üretilen polimiksinler *A. niger*'i inhibe edememektedir. *Bacillus polymyxa* ise *A. niger*'e karşı aktivitesinin bulunması, diğer antibiyotiklere göre *P. aeruginosa*'ya karşı çok daha dirençli olması ve ürettiği antibiyotığın geniş spektrumlu antibiyotik olarak sınıflandırılmasından dolayı çok önemli bir bakteri olduğu düşünülmektedir (69).

Yine topraktan izole edilen *Bacillus polymyxa* SCE2 suşunun maya, küf, farklı cinsteki Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal madde ürettiği belirlenmiştir. Genellikle polimiksinler tarafından öldürülen *P. aeruginosa* karşı aktivitesinin düşük olması ve çoğunlukla gram pozitif bakterilere karşı etkili olmasından dolayı polimiksinden farklı bir antibiyotik ürettiği düşünülmüştür. Ayrıca bu bakterinin ürettiği antimikrobiyal maddenin plazmid DNA ile ilişkisi hakkında bağlantı kurulamamıştır (91).

Sarımsağın rizosferinden izole edilen *Bacillus* suşunun sarımsağın çürümesine neden olan *Fusarium oxysporum* üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. İzole edilen bu suşun *Bacillus polymyxa* KT-8 olduğu ve oluşturduğu fusarisidin A adlı maddenin funguslara karşı önemli ölçüde etkisinin bulunduğu görülmüştür. *Micrococcus luteus* ile *Staphylococcus aureus* gibi Gram pozitif bakterilere karşı aktif olduğu, Gram negatif bakterilere karşı ise antimikrobiyal aktivitesinin bulunmadığı gözlenmiştir (92). Başka bir çalışmada ise *Bacillus brevis*' in bezelye gibi bitkilerin solmasına sebep olan *Fusarium oxysporum f. sp. udum* üzerinde etkili olduğu ve fusariyal hastalığı engellemede biyokontrol olarak görev yaptığı belirlenmiştir (93).

Yine *Bacillus polymyxa* KT-8 suşu ile yapılan bir çalışmada, suşun ürettiği fusarisidin B, C ve D'nin antimikrobiyal aktiviteleri fusarisidin A ile karşılaştırılmış ve fusarisidin A gibi fusarisidin B ve C' nin funguslara karşı güçlü bir aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Fusaridin B, C ve D'nin *M. luteus* ile *S. aureus* gibi Gram pozitif bakterilere karşı güçlü bir aktivite gösterirken, fusarisidin B' nin *Candida albicans* IFO 1594 ile *Saccharomyces cerevisiae* HUT 7099 gibi mayalara da etkisi görülmüştür. Aynı zamanda fusaridin C ve D'nin mayalara karşı etkili oldukları da gözlenmiştir (94).

Bacillus bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyal maddelerin yapıları farklı olduğu gibi etki mekanizmaları da birbirinden farklı olabilmektedir. Hücre duvarı sentezini bozan veya hücre membranına zarar veren etkileri yanında protein sentezini de engelleyen antimikrobiyal maddeler bulunmaktadır (76).

Bacillus subtilis ATCC 39320 suşunun aerobik ve anaerobik organizmalara karşı antibakteriyel etkisinin diffisidin ve oksidiffisidin antibiyotiklerinden dolayı ileri gelmektedir. Bu antibiyotikler *E. coli*'nin protein sentezini inhibe ettikleri görülmüştür (95).

Bacillus licheniformis A-12 ve M-4 suşlarından izole edilen amoebisinlerin (A-12A, A12-B, m4-A, m4-B ve m4-C) *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium glutamicum* ve *Sarcina* gibi bakterilere karşı aktif olduğu bilinmektedir (96). Ayrıca bu suşlardan izole edilen amoebisinler insan patojeni olan *Naegleria fowleri* amibinin hücre membran yapısını bozarak etki etmektedirler (82, 83, 97).

Bacillus suşlarından izole edilen peptit yapıdaki antimikrobiyal madde olan mersasidinin metisilin'e dirençli sitafilokoklar başta olmak üzere bazı Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu belirlenmiştir (98).

Bacillus bakterilerinin doğada yaygın bulunmaları, kolay gelişebilmeleri ve çeşitli metabolit ürünleri sentezleyebilmeleri nedeniyle biyolojik kontrol amaçlı olarak kullanılmaktadırlar.

Yapılan bir çalışma sonucunda *Bacillus cereus* UW85'in zwittermisin A ve B adlı iki antibiyotik ürettiği belirlenmiştir. Bu bakteri *Phytophthora medicaginis*'in gelişimini inhibe ederek sebep olduğu hastalık engellenmiştir (99).

Bacillus subtilis ATCC 21332'in ürettiği ve en güçlü biyosurfaktanlardan biri olan surfaktinin yüzey tansiyonunu düşürdüğü bildirilmektedir (75).

Bacillus subtilis tarafından meydana getirilen antimikrobiyal maddenin farklı virüsler üzerinde geniş antiviral etkisinin olduğu gözlenmiştir. Bu maddeden biyoteknoloji ve farmakoloji alanlarında yararlanılabileceği düşünülmektedir (100).

Çeşitli bakteriler tarafından üretilen ve aynı türlerin farklı suşlarına öldürücü veya diğer bakteriler üzerine inhibe edici etkisi olan bakteriyosini *Bacillus* suşları da meydana getirmektedirler.

Bacillus subtilis bakterisinden elde edilen basillosin 22'nin hem *Bacillus cereus* hem de *Listeria monocytogenes* üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu madde midedeki peptidaz enzimlerine duyarlı olduğundan gıda kaynaklı patojenlere karşı gıda antimikrobiyal ajanı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle basillosin 22'nin gıda endüstrisi alanında kullanım potansiyelinin yüksek olduğu düşünülmüştür (101).

Hayvan besinlerinde antibiyotiklerin yerine bağırsak florasını dengeleyen, yararlı etki yapan ve yaşayan mikrobiyal besinlerin kullanılmasının daha faydalı olacağı düşüncesinden dolayı probiyotik canlıların destekleyici hayvan besini olarak kullanılması da tavsiye edilmektedir (23).

Bacillus Cinsinin PHB Üretimi

Petrolde elde edilen sentetik polimerler (plastik) toprakta uzun süre parçalanmadıklarından çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Bu sebeple mikrobiyal plastik olan poli- β -hidroksibütiratın doğada kolay parçalanabilme özelliğinden dolayı önem kazanmaktadır (23).

Poli- β -hidroksibütirat (PHB), prokaryot ve ökaryot organizmalar tarafından hücre içi depo granülü olarak sentezlenerek biriktirilen ve mikroorganizma için karbon-enerji kaynağı olarak kullanılan mikrobiyal depo poliesterdir (102, 103, 104, 105).

Mikrobiyoloji alanında mikroskobun kullanılması ile birlikte bakteri hücrelerindeki küçük yağ damlacıkları tanımlanmıştır. Bakterilerde bulunan lipofilik granüllerin yapısını ilk kez 1923 yılında Lemoigne tarafından ortaya konulmuştur. Çalışmasında, *Bacillus subtilis* kültürlerinin otolizi sonucunda bilinmeyen bir asit oluştuğu ve pH'ın azaldığı tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda ise bu asitin şeker hastalarında görülen β -hidroksibütirik aside benzer bir asit olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Bacillus megaterium* bakterisinin otolizinde β -hidroksibütirik asit monomerleri görülmüş ve bu monomerlerin kaynağının poli- β -hidroksibütirik asit olduğu anlaşılmıştır (102, 106).

Faz-kontrast ve elektron mikroskobu kullanılarak bakteri hücrelerindeki PHB granülleri incelenmektedir. PHB granülleri 100-800 nm çapında, genellikle küresel şekildedir. 2-4 nm kalınlığında, ünit olmayan bir membran ile çevrilidir. İzole edilen PHB granülleri yaklaşık % 98 PHB ve % 2 protein içermektedir. Yapılan bir çalışmada *Bacillus cereus*' tan izole edilen PHB granüllerin % 50' sinin merkezi bir çekirdekte olduğu görülmüştür. Bu çekirdek en dışta bir membran ile tekrar çevrilmiştir. Her bir granülün fibriler yapıda olduğu ve 10-15 nm uzunluğunda polimerik PHB granüllerinden oluştuğu belirlenmiştir. Bu fibrillerin eş zamanlı sentez veya suda çözünmeyen bir polimer yapısındaki kristalizasyonun sonucu olduğu düşünülmüştür (102, 107).

PHB sağ el kuralına göre ikiye katlı kıvrılmış bir heliks yapıdadır. PHB optik olarak aktif ve D (-) konfigürasyondadır (108). Katı ama kırılğan bir materyal olan PHB' nin erime sıcaklığı ise 157-188 °C arasındadır. PHB termoplastik olduğundan preslenip şekil verilebilmektedir (104,107). Ayrıca UV ışınlarına dirençli olan PHB'nin asit ve baz uygulamalarına karşı zayıf dirençli olması, polimerin su ve hava geçirmez oluşunun sebebiyle de hidrolitik parçalanmaya dirençlilik göstermesinden dolayı kullanım olanaklarının genişlediği bildirilmektedir (109).

İzolasyon yöntemi, kullanılan bakteriyel suş, substrattın tipi, inkübasyon süresi ve oksijenin kısmi basıncı D(-)-3-hidroksibütirik asitin makromoleküler bir polimeri olan PHB'nin kimyasal yapısında değişikliklere neden olmaktadır (102,104). Polimerin moleküler ağırlığının 60 000-2 000 000 D arasında olduğu ve polimerin molekül ağırlığının özellikle bakterinin türüne bağlı olmakla birlikte büyüme koşulları ile hücrenin yaşam döngüsündeki yerine göre de değişebilmektedir (106, 110, 111).

Mikroorganizmalar tarafından uygun olmayan üreme koşullarında PHB'i oluşturdukları ve genellikle karbon kaynağının fazla azot, oksijen ve esansiyel

elementler gibi besleyici maddelerin az olduğu ortamlarda PHB biriktirdikleri belirlenmiştir (107, 112).

PHB nin biyosentezi β -ketothiolaz, asetoasetil-CoA redüktaz ve PHB sentaz enzimleri tarafından katalize edilen üç reaksiyon basamağından oluşmaktadır. PHB'nin intrasellüler sentezi için ilk bileşik olan Asetil-CoA, β -ketothiolaz enzimi ile asetoasetil-CoA dönüşmektedir. Reaksiyon asetoasetil-CoA redüktaz tarafından katalize edilmesiyle β -hidroksibütiril-CoA'ya dönüşmektedir. Bu molekülde PHB sentaz enzimi ile PHB' e dönüşmektedir (113, 114, 115).

PHB biyosentez genlerinin kromozomda veya plazmid DNA' da kodlu oldukları bildirilmiştir (116).

PHB'nin en önemli özelliklerinden birisi toprak mikroorganizmaları tarafından parçalanmasıdır. PHB'nin aerobik ortamdaki parçalanma ürünleri karbondioksit ve su, anaerobik ortamda parçalanma ürünü ise metandır. Parçalanmada azot oksidi oluşmadığından çevre korunması açısından önemli sayılmaktadır. PHB'nin parçalanma süresi ise birkaç aydan birkaç yıla kadar değişmektedir (106, 115).

PHB'nin parçalanmasında biyolojik faktörler (bakteri, mantar, yüksek organizmalar), kimyasal faktörler (hidroliz, oksidasyon) ve fiziksel faktörler (güneş ışığı, ıslanma, mekanik aşınma vs) etkili olmaktadır (104).

PHB enzimler yardımıyla parçalanarak oluşan monomerik 3-hidroksibütirik asit ve dimer yapı birçok organizma tarafından kullanılmaktadır (107).

PHB'nin parçalanmasında görev alan topraktaki birçok mikroorganizma arasında Gram (-) bakteriler, Gram (+) basiller, *Streptomyces*' ler ve küf mantarları yer almaktadır (117).

Savenkova ve arkadaşları, tarafından yapılan bir çalışmada toprak mikroorganizmalarından PHB'i parçalayan başlıca mikroorganizmalar tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmalar arasında en önemli bakteri cinsleri *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus* ve *Streptomyces* ile funguslar arasında ise *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Paecilomyces* ve *Trichoderma* olduğunu bildirmişlerdir (118).

Yapılan bir çalışmada, *Comomonas* sp., *Pseudomonas lemoignei* ve *P. fluorescens* bakterileri tarafından polihidroksialkonatların parçalandığı belirlenmiştir (119).

Khan ve Hiraishi, aktif çamurdan izole ettikleri yeni bir denitrifikant kemoorganotrof bakterinin PHB'i aerobik ve anaerobik koşullarda parçalayabildiğini tespit etmişlerdir (120).

Sei ve arkadaşları'nın yaptığı çalışmada ise PHB'i parçalayan mikroorganizmaların polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonucunda 57 adet PHB'i parçalayan mikroorganizmadan 47' sinin olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir (121).

PHB'nin fermentatif üretimi, karbonhidrat ve yağ asitleri gibi tarımsal ürünler de karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesine bağlıdır (104).

PHB ve kopolimerler çeşitli ürünlerin yapısında önemli bir potansiyele sahip oldukları için ziraat, endüstri, veterinerlik, ilaç, gıda, kozmetik ve tekstil gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar (108, 115). Kolay şekil alma ve parçalanabilme özellikleri nedeniyle daha çok paketleme malzemesi olarak PHB kullanılmaktadır (104).

Polimerin depolimerizasyonu sonucu oluşan D(-)-3-hidroksibütirik asit monomerinin kullanımı da yaygındır. D(-)-3-hidroksibütirik asit yüksek organizmalarda ara metabolit olup, lipit metabolizmasının ürünü ve insan kanının normal ögesidir. Ayrıca, belirli dokularda özellikle de beyin ve kalp dokusu için bir enerji kaynağıdır. Yapılan bir çalışmada, D(-)-3-hidroksibütirik asittin damar içi veya ağızdan karbon sağlanması için kullanılabileceği ve daha yaygın olarak kullanılan glukoz yerine bazı klinik avantajlara sahip olabileceği tespit edilmiştir (108).

Termobiyoplastik maddenin potansiyel kullanım alanları aşağıda verilmiştir (104, 108, 115, 122).

- Paket filmleri, poşetler, torbalar, gıda korunmasında kullanılmak üzere tepsiler ve çeşitli kaplar,
- Şampuan ve meşrubat şişeleri, karton süt kutularının iç yüzey kaplamaları,
- İlaç, tablet, insektisit, herbisit ve gübrenin uzun sürede, belli hızda saliverilmesi için biyolojik parçalanabilen taşıyıcılar,
- Bir defa kullanılan tıraş bıçağı, çatal, bıçak, tabak gibi mutfak kapları, bebek bezleri ve hijyenik pedler,
- Ameliyat ipliği, yara örtüsü, ortopedik çubuk ve vida,
- Cerrahi pens, iğne, eldiven, önlük ve maske,
- Kemik değiştirilmesi ve cerrahi plakalar,
- Kemik büyütülmesi ve tedavisi,
- Pansuman sargısı,
- Kan damarının değiştirilmesi,
- Tohum kapsüllendirilmesi fide taşımacılığında muhafaza ve gübre yada pestisitlerin kontrollü salınımı için plastik kılıflar,
- Bitki sulama boruları, bitki yapraklarının kaplanması,
- Kiral bileşenlerin üretimi için başlatıcı materyaller,
- Taze balık, peynir, et ve et ürünleri, kurutulmuş ürünler, orta nemli gıdalar, yağlı tohumlar, kurutulmuş pastacılık ürünleri, cipsler, şekerlemeler gibi gıdalarda nem ve oksijene karşı koruma veya parlaklık sağlama, aroma kaybını önleme amacıyla kullanım,
- Basınca duyarlı yapışkanlar, kağıt örtüler ve krem öncülleri gibi ajanların yapımı,
- Bazı kimyasal maddelerin elde edilmesi.

PHB ve çeşitli PHA'ların üretimi için kullanılan substratlardan karbon kaynağı olarak glukoz, sükroz, propiyonik asit, bütirik asit, pentatonik asit, 4-hidroksi hegzanoik asit, L-laktat, yağ asitleri ile alkanlar ve kloroalkanoik asitler gibi kimyasal bileşenler kullanılmaktadır (112, 123, 124).

Yüksekdağ ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise bazı mezofilik ve termofilik laktik asit bakterilerinin PHB üretimlerinin % 0,52-25,55 arasında olduğunu tespit etmişlerdir (125).

Aslim ve arkadaşları, topraktan izole ettikleri *Bacillus* suşlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimini % 6,53-48,13 olarak belirlemişlerdir (126).

Yeni bir *Bacillus megaterium* B-124 suşunun hücre kuru ağırlığına göre % 20 PHB depoladığı ve kültür besiyerinde 3-hidroksibütirik asit ve trimer salgıladığı belirlenmiştir (127).

Fotoototrofik ortamda, termofilik siyanobakter suşu yüksek oranda PHB biriktirmiş ve bu suşun *Synechococcus* sp. olduğu belirlenmiştir. Bu suşun hücre kuru ağırlığının % 20' si kadar PHB depoladığı tespit edilmiştir (128).

Dave ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, aktif çamurdan izole ettikleri *Bacillus* suşlarının PHB üretimlerini incelemişler ve *Bacillus* sp. IPCB-403 suşunun optimum şartlar altında en yüksek PHB (% 70) verimine sahip olduğunu görmüşlerdir (129).

Palmada ve Sanchez, sudan izole ettikleri *Bacillus megaterium*'un PHB üretimi üzerine yaptıkları çalışmada, doğal *Bacillus thuringiensis* suşu yerine akuatik ortamlarda rekombinant kristal biyoinsektisit olarak *Bacillus megaterium*'un kullanılması bazı avantajlar sağlayabilecek potansiyelinin olduğunu gözlemlemişlerdir (130).

Bacillus thuringiensis HD-1 suşunun sporulasyonu sırasında PHB'i tüketmeye başladığı ve PHB'i spor şekillenmesi sırasında enerji kaynağı olarak kullandığı tespit edilmiştir (131). Başka bir çalışmada ise *Bacillus cereus*'un spor oluşumundan hemen önce PHB birikiminin maksimum oranda olduğu ve bakterinin sporulasyon döneminde bu PHB'i kullandığı belirlenmiştir (132).

Topraktan izole edilen *Bacillus* bakterilerinin PHB üretimleri çalışılmış ve PHB miktarlarının tür ve suşlara göre farklı olduğu belirlenmiştir (126).

Ekonomik biyoplastik üretimi için ucuz substratlar olarak melas, arpa, soya gibi atık sular ve peynir altı suları kullanılmaktadır (133, 134, 135). Yapılan bir araştırmada, *Bacillus* cinsi bakterilerin melas da hızlı gelişerek PHB ürettikleri anlaşılmıştır (133).

Azotobacter beijerinckii bakterisinin kasein pepton, maya özütü, kasamino asit ve üre gibi azot kaynakları ile birlikte glukoz veya sükröz gibi karbon kaynaklarının kombine edildiği besiyerlerindeki PHB üretiminin % 50 olduğu bulunmuştur (136). Diğer bir çalışmada ise *Pseudomonas extorquens* DMS 1337' ün % 22,98 oranında ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)' in % 12,10 oranında pancar içeren besiyerindeki PHB üretimleri belirlenmiştir (137) .

Pseudomonas marina adlı bakterinin mannitol içeren besiyerindeki PHB üretimi hücre kuru ağırlığına göre % 30 oranında olduğu belirlenmiştir (138).

Alcaligenes eutrophus'un polietilen glikol veya polisakkaritlerden kopolimerler ürettiği ve bu kopolimerlerin kompozisyonu ve moleküler ağırlıklarının yapılan araştırmalarla kontrol edilebileceği bildirilmiştir (139). Başka bir çalışmada ise *A. eutrophus* DSM 545 suşunun % 3 glukoz ve farklı amonyum kaynakları ile şeker kamışı melasındaki PHB üretimine bakılmış ve en iyi PHB üretimini amonyum sülfat içeren besiyerinde olduğu görülmüştür (140).

Gomez ve arkadaşları, toprak Gram negatif bakterilerin sükröz, fruktoz, glukoz ile propiyonik asitli ortamdaki PHB üretimlerinin % 50-80 arasında değiştiğini görmüşlerdir (141).

Chen ve arkadaşları, *B. amyloliquefaciens* DSM7, *B. cereus* DSM31, *B. circulans* DSM1529, *B. laterosporus* DSM335, *B. licheniformis* DSM394, *B. macerans* DSM7068, *B. megaterium* DSM90, *B. mycoides* DSM2048, *B. sphaericus* DSM28, *B. subtilis* DSM10 ve *B. thuringiensis* DSM2046 suşlarının propiyonik asit, valerik asit, heptanoik asit içeren ortamlarda PHB üretimlerini incelemişler ve PHB üretiminin heptanoik asit içeren ortamda düşük, valerik asit içeren ortamda ise yüksek olduğunu bulmuşlardır (142).

Gouda ve arkadaşları, şeker kamışı melası ve mısır suyunu karbon ve azot kaynağı olarak kullanarak *B. megaterium*'un PHB üretimini incelemişler ve en yüksek PHB miktarını melas ve glukoz içeren besiyerinde bulmuşlardır (135).

Bacillus sp. NKF 200 suşunun karbon kaynağı olarak sükröz, azot kaynağı olarak amonyum sülfat ve fosfor kaynağı olarak sodyum fosfat içeren ortamda hücre ağırlığının 23 g/l ve PHB miktarının ise % 58 olduğu görülmüştür (143).

Page ve Knosp çalışmalarında asetat ve glukozu azot kaynakları ile beraber kullanmışlar ve *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun glukoz ve amonyum sülfat bulunan ortamda, asetat ve amonyum sülfat bulunan ortama göre daha fazla miktarda PHB sentezlediğini görmüşlerdir (144).

Mercan ve Beyatlı, *Bacillus sphaericus* suşlarının PHB üretimlerini tespit etmişler ve bu suşların PHB üretimlerini % 5-25,88 arasında bulmuşlardır . Bazı suşların % 0,2 beef ekstrakt içeren besiyerindeki PHB verimlerinin % 32,50'ye kadar yükseldiğini görmüşlerdir. Yine yapılan başka bir çalışmada ise bazı *Bacillus* türlerinin PHB üretimleri incelenmiş ve en yüksek PHB üretimine % 49,91 oranı ile *B. sphaericus* suşunda olduğu görülmüştür (146).

Aktif çamurdan izole edilen *Bacillus* suşlarını arpa ve soya atık suyunda geliştirerek PHB üretimleri araştırılmıştır. *Bacillus* sp. HF-1 ve HF-2 suşlarının PHB verimleri sırasıyla % 19,22 ve % 10,18 oranında olduğu görülmüştür. *Bacillus* suşlarının amilaz ve proteaz enzimlerinin olması nedeniyle gıda atık sularında yararlanabilecekleri düşünülmüştür (147).

Labuzek ve Radecka yaptıkları çalışmada, *B. cereus* UW85 suşunun azot sınırlandırılmış besiyerindeki PHB verimini % 9 olarak tespit etmişlerdir (148). Yapılan başka bir araştırmada ise melaslı topraktan izole edilen *Bacillus* sp. Jma5 suşunun melas içeren besiyerindeki PHB üretiminin % 35 olduğu belirlenmiştir (133).

B. subtilis K1 suşunun proteaz pepton içeren ortamdaki PHB verimi % 78,69 oranında iken *B. megaterium* Y6 suşunda ise % 77 oranında PHB verimi saptanmıştır. Bu suşların karbon kaynağı olarak glukoz içeren besiyerindeki PHB verimi sırasıyla % 19,51 ve % 19,49 olarak tespit edilmiştir (149).

Dave ve arkadaşları, karbon kaynağı olarak glukoz içeren ve içermeyen besiyerinde geliştirilen *Bacillus* bakterilerindeki PHB üretimini belirlemişler ve glukoz içermeyen

besiyerine göre % 1 glukoz içeren besiyerinde PHB üretiminin 20 misli arttığını tespit etmişlerdir (129).

B. thuringiensis'in gelişimi sırasındaki glukoz kullanımı araştırılmış ve glukozun önce asetata daha sonra asetoina dönüştüğü bildirilmiştir. Asetat oluşmaya başladıktan sonra kültürde PHB'nin sentezlendiği ve PHB oranının asetat tüketimi boyunca arttığı görülmüştür. Aynı zamanda asetatin asetoin oluşumu için de kullanıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca ortamda asetoinin indirgenmesi ile 2,3-bütandiol oluşumu da belirlenmiştir. Asetatin yalnız PHB üretiminde kullanılmadığı aynı zamanda asetoin oluşumu veya PHB sentezinde gerekli NADH₂'lerin kullanıldığı indirgenme reaksiyonlarında da tüketildikleri anlaşılmıştır (131).

Bazı bakteriler PHB'i sentezleyebilmeleri için ortamda mutlaka N, Mg ve P gibi elementlerin bulunması gerekmektedir. Bunun yanı sıra bazı bakteriler (*Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*'nin mutant suşu, *Pseudomonas resinovorans* ve rekombinant *E. coli* gibi bakteriler) polimer sentezi için bu elementlere gereksinim duymazlar (136, 150).

Son yıllarda daha fazla ve daha ucuz PHB üreten bakteriyel suşların geliştirilmesi amacıyla moleküler biyolojik çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Ahn ve arkadaşları (134), rekombinant *E. coli*'yi kullanarak peynir altı suyundan yüksek PHB verimi elde etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise yine rekombinant *E. coli*'yi peynir altı suyunda geliştirilmiş ve % 20 oranında PHB verimi sağlanmıştır (151).

Aktif PHB sentaz genine sahip olduğu bilinen *Caulobacter crescentus* bakterisi glukoz içeren ortamda % 18 PHB verimine sahiptir. Bu bakterinin PHB sentaz enzim genini kodlayan bölgesini mutant *A. eutrophus* PHB (-)4 ve rekombinant *E. coli* JM109 bakterilerine aktarılmış ve bu bakterilerde PHB verimi sırasıyla % 62 ve % 6 olarak belirlenmiştir (152).

A. eutrophus'dan izole edilen genlerin pamuk bitkisine (*Gossypium hirsutum* L. Cv DP50) aktarılması sonucu transgenik pamuğun lif lümenleri içinde PHB üretimi sağlanmıştır. PHB granülleri sayesinde yüksek ısı kapasitesi ve düşük termal geçirgenliğe sahip olan transgenik liflerin tekstil sanayi uygulamalarında avantaj sağlayacağı düşünülmüştür (153).

Lee ve arkadaşları, *A. eutrophus*'un PHB sentez genlerini taşıyan plazmidleri kullanarak *E. coli*'de PHB üretimini incelemişler ve PHB veriminin % 80,1 olduğunu tespit etmişlerdir (154).

Bacillus Cinsinde Plazmid DNA

Mikroorganizmaların ekstrakromozomal materyali olup, hücre sitoplazmasında serbest olarak bulunabilecekleri gibi mikroorganizmanın kromozomu ile birleşmektedirler (episom). Moleküler ağırlıkları 1-200 kb arasında olup, hücredeki sayısı 1-700 kopya arasında değişmektedir. Plazmid DNA'lar antibiyotiklere, metallere ve ilaçlara dirençlilik, toksin formasyonları, pilus oluşumu, virülens faktörleri, fermentasyon özellikleri, nitrojen fiksasyonu vs gibi bazı özel karakterleri taşıdıkları için bakterilere avantajlar sağlamaktadırlar (155, 156, 157).

Kriptik plazmid denilen plazmidler de fenotipte gözlenmeyen özellikleri içeren genler bulunmaktadır. Kendi kendine transfer olabilen veya konjugatif plazmidlerin içerdikleri "tra" genleri sayesinde çıkardıkları kopyalarını diğer bakterilere transfer edebilmektedirler. Bazı plazmidler ise kendi transferleri için yetenekleri olmadığından bazı bakteriyel hücrelerdeki konjugatif plazmidlerin "tra" fonksiyonlarından yararlanmaktadır (158).

Bacillus subtilis 168 suşunun düşük ve yüksek kopya sayıda plazmid DNA bulundurduğu tespit edilmiştir (159). *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* HD-1 kültürünün iki plazmid içerdiği ve moleküler ağırlığının 0,8-4,2 kb olduğu bulunmuştur (160).

Deniz çöküntüsünden izole edilen 110 *Bacillus* suşunun plazmid DNA'ları, 11 farklı antibiyotik, HgCl₂ ve fenilciva asetatta dirençlilikleri incelenmiştir. Antibiyotik ve civaya dirençli suşların % 43' ünün bir veya birden fazla plazmide sahip oldukları ve bunların moleküler ağırlıklarının 1,9-210 Md arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu suşların % 54' ünde 20 Md ağırlığından büyük plazmid DNA bulunmaktadır. Plazmid içeriği ile ne antibiyotiklere nede civa bileşimlerine dirençlilik arasında korelasyon bulunmamıştır (161).

Bacillus thuringiensis subsp. israelensis suşunun ekstrakromozomal genetik elementi incelenmiştir. Bu suşun kompleks plazmid sıralanışı içerdiği bulunmuştur. Toplam 6 plazmid belirlenip, moleküler ağırlıkları 4,3-20 Md arasında tespit edilmiştir. Suşların biosit sentezindeki rolüne bakıldığında ise en az bir plazmidin (3,6 Md) delta-endotoksin üretimi ile ilişkili olduğu görülmüştür (162).

Bacillus amyloliquefaciens B155 suşunun alfa-amilaz üretmeyen ve üreten kolonilerinin plazmid DNA'larına bakılarak incelendiğinde alfa-amilaz üretimi yapan hücrelerde plazmid DNA bulunduğu ve alfa-amilaz üretimi yapmayan hücrelerde ise plazmid DNA bulunmadığı görülmüştür. Sürekli fermantasyon sırasında *Bacillus amyloliquefaciens*'in alfa-amilaz üretiminin azalmasının plazmidin yapısal olarak stabil olmamasıyla ilişkilendirilmiştir (163).

Biyoteknolojik uygulamalar ve temel araştırmalarda büyük öneme sahip olan *Bacillus*'larda özellikle *B. subtilis*'in plazmid DNA'sının kararsızlığı büyük bir sorun olmaktadır. Hücredeki plazmid popülasyonunun tamamının kaybolmasına neden olan bölünmeye bağlı kararsızlık ile yapısal yeni düzenlenmeyi taşıyan plazmid popülasyonundaki kayıplarla oluşan yapısal kararsızlık olmak üzere iki grup belirlenmektedir (164).

Entomopatojen *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* antibiyotiğe dirençli genlerini tespit etmek için antibiyotiğe duyarlılık testi yapılmıştır. Kullanılan antibiyotiklerin *Bacillus thuringiensis*'in gelişimini önemli şekilde geciktirdiği ve suşun antibiyotiklere duyarlı olduğu görülmüştür. *Bacillus thuringiensis*'in 3,5 ile 21 kb olan iki plazmid DNA taşıdığı tespit edilmiştir (165).

Lepidoptera'ya karşı toksik etki gösteren *B. thuringiensis var. kurstaki* HD-3a3b suşunda 15 kb'lık plazmid DNA tespit edilmiştir. Bu plazmidin *Lepidoptera*'ya karşı toksisitesi olduğu görülmüştür (166).

Fermentasyon teknolojisinde *Bacillus stearothermophilus* önemli bir termofilik bakteridir. Bu bakterinin *Bacillus subtilis* ile tanımlanamayan bir ilişkisi vardır. Bu iki bakteride kanamisin yada tetrasikline dirençli olan genlerden birini kodlayan plazmid DNA mevcuttur. Antibiyotiğe dirençli termofilik *Bacillus*'ların plazmid DNA incelenmesi yapıldığında ise yüzlerce izolat arasında sadece 35 suşta küçük plazmid DNA (<10 kb) bulunduğu görülmüştür (167).

Tanaka ve Koshikawa (168), *Bacillus subtilis* bakterisinin 34 ve 46 Md ağırlığında büyük plazmidler ile 3,6 ve 4 Md ağırlığında küçük plazmidlere sahip olduğunu bulmuşlardır. Yapılan başka bir çalışmada ise *Bacillus thuringiensis var israelensis* bakterisinde delta endotoksin proteini ile ilişkili 72 Md ağırlığında bir plazmid ile 4-4,4 Md ağırlığında küçük plazmidlerin bulunduğu belirlenmiştir (169).

Bacillus suşuna ait 111 izolat plazmid DNA yönünden incelenmiş ve sadece 13 izolatta plazmid DNA bulunmuştur. Plazmid DNA'ların moleküler ağırlıkları 2,8-45,2 Md arasında değişmektedir. 41 izolat antibiyotiğe dirençli olup, sadece bu izolatların 5'inde plazmid DNA tespit edilmiştir (170).

Kaynaklar

1. Diler, Ö. ve Diler, A., "Eğirdir gölü sudak balıklarında (*S. lucioperca L.*) derinin bakteriyel florası", S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fak. Dergisi, 4:179-190 (1995).
2. Johnson, C. and Bishop, A., "Development of a microbial insecticide for use against the dipteran pests of traditionally processed fish", Tenth session of the working party on fish technology and marketing, *FAO Fisheries Report*, Colombo, Sri Lanka, 563:359-363 (1997).
3. Young, R. J., Won, K. K., Ik, B. K. and Hyun, Y. L., "Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from jeat-gal, salt-fermented fish", *Korean Journal of Food Science and Technology*, 30(3):655-659 (1998).
4. Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I. and Chambliss, G. H., "*Bacillus*, topley and Wilson's microbiology and microbial infections, systematic, bacteriology, by edited L. Collier, A. Balows and M. Susman", *Oxford University Press*, Ninth Edition, New York, 2:5-193 (1998).
5. Varlık, C. ve Heperkan, D., "Hamsinin buzda muhafazası", *İ.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 4(1):53-58 (1990).
6. İnal, T., "Besin hijyeni hHayvansal gıdaların sağlık kontrolü", *Final Ofset A.Ş.* (Genişletilmiş 2. baskı), İstanbul, 345-592 (1992).
7. Kuru, M., "Omurgalı hayvanlar", *Gazi Üniv. Yayınları*, Ankara, 186:841 (1994).
8. Göktan, D., "Gıdaların mikrobiyal ekolojisi, et miktobiyojisi", *E. Ü. Mühendislik Fak. Yayınları*, Bornova-İzmir, 21(1):293 (1990).
9. Küçüköner, E. ve Küçüköner, Z., "Balık mikroflorası ve balıklarda meydana gelen mikrobiyal değişimler," *100. Yıl Ü. Ziraat Fak. Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü Dergisi*, 15(6):339-341 (1990).
10. Şentürk, A., "Türkiye su ürünlerinin standardizasyonu ve diğer ülkelere göre bu günkü durumu üzerine bir araştırma", *KÜKEM DERGİSİ*, 16(2):70-71 (1993).
11. Gökoğlu, N. ve Varlık, C., "HACCP (Kritik Kontrol Noktalarında Tehlike Analizleri) ve su ürünlerine uygulanması", *Gıda Teknolojisi Dergisi*, 12:71-78 (1998).

12. Varlık, C. ve Gökoğlu, N., "İstavrit balığının (*T. mediterraneus*) satış koşullarındaki kalite değişimi üzerine bir araştırma", *İ.Ü. Su ürünleri Dergisi*, 1(2):99-106 (1991).
13. Cattaneo, P. and Cantoni, C., "Identification and rapid determination of histamine in fish samples", *Industrie Alimentari*, 17(4):303-307 (1978).
14. Ertaş, A. H., "Balık mikroflorası ve kutu konserve balıklarında bozulmaya neden olan bakteriler", *Gıda Dergisi*, 6(4):7-9 (1981).
15. Kuipers, O. P., "Genomics for food biotechnology: prospects of the use of high-throughput technologies for the improvement of food microorganisms", *Food Biotech., Elsev. Sci. Ltd.*, Netherlands, 10:511-516 (1999).
16. Çolakoğlu, M. ve Kundakçı, A., "Haskefal (*M. cephalus*) ve sazan (*C. carpio*) balıklarının dondurularak saklanması sırasında lipidlerdeki değişimler", *Doğa Bil. Dergisi, Vet. Hay./Tar.Orm.*, 5:283-289 (1981).
17. Moravali, E. H., "Balık hijyeni", *Gıda Bil. Tek. Dergisi*, 11(2) (1979).
18. Alperden, İ., "Gıda sanayiinde mikrobiyoloji ve uygulamaları: Et ve su mikrobiyolojisi; TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gıda ve Soğutma Teknolojileri Bölümü, Kocaeli-Gebze, 124 (1993).
19. Ringo, E. and Strom, E., "Microflora of arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora", *Aquaculture and Fisheries Management*, 25(6):623-629 (1994).
20. Arslan, A., "Keban baraj gölü aynalı sazandarının mikrobiyolojik ve kimyasal kriterleri", *Doğa Tr. J. Veter. and Animal Sc.*, 17:251-259 (1993).
21. Toranzo, A. E., Novoa, B., Romalde, J. L., Nunez, S., Devesa, S., Marino, E., Silva, R., Martinez, E., Figueras, A. and Barja, J. L., "Microflora associated with healthy and diseased turbot (*S. maximus*) from three farms in northwest", *Aquaculture*, Spain, 114:189-202 (1993).
22. Fuselli, S.R., Casales, M.R., Fritz, R. and Yeannes, M.I., "Microbiology of the marination process used in anchovy (*E. anchoita*) production", *Lebensmittel Wissenschaft and Technology*, 27:214-218 (1994).
23. Katırcıoğlu, H., "Gökkuşluğu alabalığı (*Onchorynchus mykiss* Richardson, 1846) ve Aynalı Sazanın (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) mide-bağırsak bölgesinden izole edilen laktik asit bakterilerinin metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi", *Doktora Tezi*, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 139 (2001).
24. Patır, B., Arslan, A. ve Güven, A. M., "Keban baraj gölü aynalı sazandarında (*C. carpio* L.) derinin bakteriyel florası", *Tr. J. of Veter. and Animal Sci.*, 17:281-284 (1993).
25. Alur, M. D., Venugopal, V. and Nerkar, D. P., "Spoilage potential of some contaminant bacteria isolated from Indian mackerel (*R. Kanagurta*)", *J. Food Sci.*, 54(5):1111-1115 (1989).
26. Kim, D. P., Chang, D. S. and Kim, S. J., "Bacterial quality of fish meat paste products and isolation of thermophilic bacteria", *Korean Journal of Applied Microbiology and Bioengineering*, 13(4):409-415 (1985).
27. Sung, H. H., "Critical review on the microbiological standardization of salt-fermented fish product", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 25(5):885-891 (1996).
28. Chen, S. C. and Wang, P. C., "In vitro activity of antimicrobial agents against *Nocardia asteroides*", *J. Fish Diseases*, 16:269-272 (1993).
29. Kramer, J. M., Gilbert, R. J. and Doyle, M. P. (ed), "*Bacillus cereus* and other *Bacillus* species", *Foodborne Bacterial Pathogens*, 240:21-70 (1989).

30. Tunail, N. ve Köşker, Ö., "Süt mikrobiyolojisi", *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, Ankara, 966:138 (1986).
31. Sneath, P. H. A., "Endospore-forming gram positive rods, and cocci, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, edited by P. H. A. Sneath, N. S., Mair, M. E., Sharpe, J. G. Holt", *Williams and Wilkins*, Baltimore, 2:1104-1139, (1986).
32. Arda, M., "Temel mikrobiyoloji", *Medisan Yayınları*, Ankara, 548 (2000).
33. Taubman, S., "Genus *Bacillus*", *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, 355-356 (1992).
34. Burke, Q. F., McDonald, K. O. and Davidson, E. W., "Effect of UV light on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593", *Applied and Environmental Microbiology*, 954-956 (1983).
35. Giffel, M. C., Beumer, R. R., Granum, P. E. and Rombouts, F. M., "Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherland", *International Journal of Food Microbiology*, 34:307-318 (1997).
36. Johnvesly, B. and Naik, G. R., "Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium", *Process Biochemistry*, 37:139-144 (2001).
37. Bilgehan, H., "Klinik mikrobiyolojik tanı", *Barış Yayınları*, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 529-542 (1995).
38. Kaleli, D. ve Özkaya, D. F., "Gıda mikrobiyoloji ve uygulamaları", *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları*, 395-401 (2000).
39. Bağcı, H., Shareef, S. R. ve Özdamar, K., "*Bacillus thuringiensis* varyetelerinin sınıflandırılmasında sayısal taksonominin uygulanması", *Doğa Tr. J. of Biology*, 5:70-81 (1991).
40. Priest, F. G., "*Bacillus*", *Biotechnology, Biological Fundamentals*, by H. Sahm, Wiley-Vch Verlag GmbH, vol. 1, Weinheim (1993).
41. Bruce, K. D. and Jordens, J. Z., "Characterization of noncapsulate *Haemophilus influenzae* by whole-cell polypeptide profiles, restriction endonuclease analysis and RNA gene restriction patterns", *J. Clin. Microbiol.*, 29(2) 291-296 (1991).
42. Pot, B., Hertel, C., Ludwig, W., Descheememaker, P., Kersters, K. and Schleifer, K., "Identification and classification of *L. acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization", *J. Gen. Microbiol.*, 139:513-517 (1993).
43. Çökmüş, C. and Yousten, A. A., "Characterization of *Bacillus sphaericus* strains by SDS-PAGE", *Journal of Invertebrate Pathology*, 64:267-268 (1994).
44. Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B. D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M. and Lindström, K., "*Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from *Leguminous* trees in Sudan and Kenya, Int.", *Syst. Bacteriol.*, 49:1359-1368 (1999).
45. Swiecicka, I., "Protein profile and biochemical properties of *Bacillus circulans* isolated from intestines of small free-living animals in Poland", *Folia Microbiologica*, 46(2):165-171 (2001).
46. Jaoua, S., Zouari, N., Tounsi, S. and Ellouz, R., "Study of the delta endotoxins produced by three recently isolated strains of *Bacillus thuringiensis*", *FEMS Microbiol. Lett.*, 145(3):349-354 (1996).
47. Ishii, T. and Ohba, M., "Characterization of mosquito specific *Bacillus thuringiensis* strains coisolated from a soil population", *Systematic Appl. Microbiol*, 16(3):494-499 (1993).

48. Yu, Y. M., Ohba, M. and Gill, S. S., "Characterization of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* crystal proteins", *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(4):1075-1081 (1991).
49. Matar, G. M., Slieman, T. A. and Nabbut, N. H., "Subtyping of *Bacillus cereus* by total cell protein patterns and arbitrary primer polymerase chain reaction", *European Journal of Epidemiology*, 12(3):309-314 (1996).
50. Çökmüş, C. and Yousten, A. A., "Bacteriocin production by *Bacillus sphaericus*", *J. Invertebr. Pathol.*, 61:323-325 (1993).
51. Çökmüş, C., Sayar, H., Saçılık, S. C., Osmanağaoğlu, Ö. and Berber, I., "Effects of UV-light on *Bacillus sphaericus* and its protection by chemicals", *Journal of Basic, Microbiology*, 40(4):215-221 (2000).
52. Jobin, M. P., Clavel, T., Carlin, F. and Schmitt, P., "Acid tolerance response is low-pH and late-stationary growth phase inducible in *Bacillus cereus* TZ415", *International Journal of Food Microbiology*, in Pres, 2495 (2002).
53. Yin, X. S., Li, Y. X. and Stark, J. R., "Amylase, β -glucanase and protease activities from a mutant of *Bacillus subtilis*", *Starch/Stärke*, 43(10):403-409 (1991).
54. Eren, Ö., "*Bacillus* sp. suşlarında antibiyotik, selulaz ve amilaz üretiminden sorumlu genlerin protoplast transformasyon tekniği ile Gram (+) bakterilere transferi ve ekspresyon düzeyinin araştırılması", *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana (1996).
55. Kunitate, A., Okamoto, M. and Ohmori, I., "Purification and characterization of a thermostable serine protease from *Bacillus thuringiensis*", *Agric. Biol. Chem.*, 53:3251-3256 (1989).
56. Çakır, İ., Doğan, H. B. ve Tükel, Ç., "Proteolitik mikroorganizmalar", *A. Ü. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları*, 477-480 (2000).
57. Cha, Y. J., Lee, E. H., Lee, K. H. and Chang, D. S., "Characterization of the strong proteolytic bacteria isolated from low salt fermented anchovy and of protease produced by that strain", *Bull. Korean Fish Soc.*, 21(2):71-79 (1988).
58. Cha, Y. J. and Lee, E. H., "Studies on the processing of rapid fermented anchovy prepared with low salt contents by adapted microorganism. I. Biochemical characterization of proteolytic bacteria and their extracellular protease isolated from fermented fish paste", *Bull. Korean Fish Soc.*, 22(5):363-369 (1989).
59. Choerit, W. and Prasertsan, P., "Characterization of proteases produced by newly isolated and identified proteolytic microorganisms from fermented fish (Budu)", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(3):284-286 (1992).
60. Rozs, M., Manczinger, L., Vagvölgyi, C. and Kevei, F., "Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*", *FEMS Microbiology Letters*, 205:221-224 (2001).
61. Kembhavi, A. A., Kulkarni, A. and Pant, A., "Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 38:83-82 (1993).
62. Kobatake, M., Tonogai, Y. and Ito, Y. J., "Proteolytic and lipolytic activities of bacteria isolated from spoiled sea foods", *Food Hyg. Soc.*, 28(1):30-31 (1987).
63. Sadchikov, A. P., Frenkel, O. A. and Gidrobiol, Z. H., "Effect of protein concentration on proteolytic activity of bacteria (on the example of *Bacillus subtilis*)", *Hydrobiol J.*, 29(4):81-85 (1993).

64. Dmitrovskij, L. G., Sadchikov, A. P. and Gidrobiol, Z. H., "Stimulation of proteolytic bacterial activity by certain algae", *Hydrobiol J.*, 30(1):53-59 (1994).
65. Kim, Y., Bae, J., Oh, B., Lee, W. H. and Choi, J., "Enhancement of proteolytic enzyme activity extracted from *Bacillus stearothermophilus* for a thermophilic aerobic digestion process", *Bioresource Technology*, 82:157-134 (2002).
66. Demain, A. L., "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52:466-463 (1999).
67. Schlegel, H., "Produktion sekundärer metabolite", *Allgemeine Mikrobiologie, Georg-Tehieme Verlag*, 362-371 (1992).
68. Eltem, R. ve Uçar, F., "Bir soda gölü olan Denizli Acıgöl 'den izole edilmiş *Bacillus* suşunun antimikrobiyal aktivite spektrumlarının saptanması", *KÜKEM Dergisi*, 21(1):57-64 (1998).
69. Perez, C., Suarez, C. and Castro, G. R., "Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* cluster", *Folia Microbiol.*, 38(1):25-28 (1993).
70. Takahashi, A., Saito, N., Hotta, K., Okami, Y. and Umezawa, H., "Bagougeramines A and B, new nucleoside antibiotics produced by a strain of *Bacillus circulans* I. Taxonomy of the producing organism and isolation and biological properties of the antibiotics", *J. Antibiot.*, 39(8):1033-1040 (1986).
71. Perez, C., Suarez, C. and Castro, G. R., "Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15", *Journal of Biotechnology*, 26:331-336 (1992).
72. Drablos, F., Nicholson, D. and Ronning, M., "EXAFS study of zinc coordination in Bacitracin A", *Biochemica at Biophysica Acta*, 1431:433-442 (1999).
73. Marahiel, M. A., "Molekular biologie und regulationmechanismer der antibiotika produktion in *Bacillus*" *Naturwissenschaften*, 79:202-212 (1992).
74. Desai, J. D. and Banat, I. M., "Microbial production of surfactants and their commercial potential", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1):47-64 (1997).
75. Patel, P. S., Huang, S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., Meyers, E., Fernandes, P. and Mayerl, F., "Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity", *Journal of Antibiotics*, 48(9):997-1003 (1995).
76. Ota, Y., Tamegai, H., Kudo, F., Kuriki, H., Koike-Tageshita, A., Eguchi, T. and Kakinuma, K., "Butirosin-biosynthetic gene cluster from *Bacillus circulans*", *Journal of Antibiotics*, 53(10):1158-1167 (2000).
77. Tamehiro, N., Okamoto-Hosoya, Y., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H. and Ochi, K., "Bacilysoicin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2):315-320 (2002).
78. Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M., "Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate", *Biotechnology Letters*, 14(9):817-822 (1992).
79. Hussain, S., Lane, S. D. and Price, D. N., "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 (1994).
80. Milner, J. L., Raffel, S. J., Lethbridge, B. J. and Handelsman, J., "Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin a by *Bacillus cereus* UW85", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(4):685-691 (1995).

81. Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeisterr, J., Jaques, P., Thonart, P. and Vater, J., "Structural and functional organization of the fengycin synthase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3", *Chemistry & Biology*, 6(1):31-41 (1999).
82. Galvez, A., Maqueda, M., Cordovilla, P., Martinez-Bueno, M., Lebbadi, M. and Valdivia, E., "Characterization and biological activity against *Naegleria fowleri* of amonebicin produced by *Bacillus licheniformis* D-13", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(6):1314-1319 (1994).
83. Lebbadi, M., Galvez, A., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M. and Maqueda, M., "Purification of amoebolytic substances from *Bacillus licheniformis* M-4", *Arch. Microbiol.*, 162:98-102 (1994).
84. Peypoux, F., Bonmatin, J. M. and Wallach, J., "Recent trends in the biochemistry of surfactin", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5):553-563 (1999).
85. Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N. and Deguchi, Y., "Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain Nm12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish", *Aquaculture*, 165:269-280 (1998).
86. Stabb, E. V., Jacobsen, L. M. and Handelsman, J., "Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils", *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12):4404-4412 (1994).
87. Pinchuk, I. V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I. B., Megraud, F. and Urdaci, M., "In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11):3156-3161 (2001).
88. Azevedo, E. C., Rios, E. M., Pukushima, K. and Campos-Takaki, G. M., "Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 42(1):1-7 (1993).
89. Nakagawa, A., Konda, Y., Hatano, A. and Omura, S., "Structure and biosynthesis of novel antibiotics, aurantinins A, and B by *Bacillus aurantinus*", *J. Org. Chem.*, 53:2660-2661 (1988).
90. He, H., Shen, B., Korshalla, J., Carter, G. T., "Circulations, new bacterial lipopeptides from *Bacillus circulans*, J2124", *Tetrahedron*, 57:1189-1195 (2001).
91. Rosado, A. S. and Seldin, L., "Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(5):521-528 (1993).
92. Kajimura, Y. and Kaneda, M., "Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity", *J. Antibiotics*, 49(2):129-135 (1996).
93. Bapat, S. and Shah, A. K., "Biological control of fusarial wilt of pigeon pea by *Bacillus brevis*", *Canadian Journal of Microbiology*, 46:125-132 (2000).
94. Kajimura, Y. and Kaneda, M., "Fusaricidins B, C and D, new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: Isolation, structure elucidation and biological activity", *J. Antibiotics*, 50(3):220-228 (1997).
95. Zweerink, M. M. and Edison, A., "Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*", *J. Antibiotics*, 12:1682-1691 (1987).
96. Galvez, A., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Lebbadi, M. and Valdivia, E., "Isolation and physico-chemical characterization of an antifungal and antibacterial peptide produced by *Bacillus licheniformis* A-12", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39:438-442 (1993a).

97. Galvez, A., Valdivia, E., Gonzalez-Segura, A., Lebbadi, M., Martinez-Bueno, M. and Maqueda, M., "Purification, characterization and lytic activity against *Naegleria fowleri* of two amonebicins produced by *Bacillus licheniformis* A-12", *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5):1480-1486 (1993b).
98. Chatterjee, S., Chatterjee, D. K., Jani, R. H., Blumbach, J., Ganguli, B. N., Klesel, N., Limbert, M. and Seibert, G., "Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. In vitro and in vivo antibacterial activity", *The Journal of Antibiotics*, 46(6):839-845 (1992).
99. Silo-Suh, L., Letbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J. and Handelsman, J., "Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85", *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(6):2023-2030 (1994).
100. Vollenbroich, D., Özel, M., Vater, J., Kamp, R.M. and Pault, G., "Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*", *Biologicals*, 25:289-297 (1997).
101. Zheng, G. and Slavik, M.F., "Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain", *Letters in App. Microbiol.*, 28:363-367 (1999).
102. Anderson, A. and Dawes, E., "Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates", *Microbiological Reviews*, 54(4):450-472 (1990).
103. Mercan, N., Mumcu, Z. N., Aslim, B. ve Beyatlı, Y., "Bazı Rhizobium bakterilerinin poly- β -hidroksibütirat (PHB) üretimleri", *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi, XI. KÜKEM-Biyoteknoloji Kongresi Özel Sayısı*, 23(2):197 (1999).
104. Madison, L. L. and Huisman, G. W., "Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63:21-53 (1999).
105. Katircioğlu, H. ve Beyatlı, Y., "Poly- β -hydroxybutyrate production in *Cyanobacteria*", *The 4th Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology, Hong Kong*, 194 (2000).
106. Braunegg, G., Lefebvre, G. and Genser, K. L., "Polyhydroxyalkanoates, biopolesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects", *Journal of Biotechnology*, 65:127-161 (1998).
107. Lafferty, R. M. and Korsatko, W., "Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid, biotechnology, edited by H. J. Rehm and G. Reed, volume 6b, Special Microbial Processes", *VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim*, 810 (1988).
108. Holmes, P. A., "Applications of PHB-A microbially produced biodegradable thermoplastic", *Phys. Technol.*, 16:32-36 (1985).
109. Poirier, Y., "Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism", *Progress in Lipid Research*, 41(2):131-135 (2002).
110. Dunlop, W. F. and Robards, A. W., "Ultrastructural study of poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*", *J. of Bacteriol.*, 114(3):1271-1280 (1973).
111. Taidi, B., Anderson, A., Dawes, E. A. and Byrom, D., "Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40:786-790 (1994).
112. Jan, S., Roblot, C., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. N. and Seguin, J. P., "¹H NMR spectroscopic determination of poly(3-hydroxybutyrate) extracted from microbial biomass", *Enzyme and Microbial Technol.*, 18:195-201 (1996).
113. Shubert, P., Steinbüchel, A. and Schlegel, H., "Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *E. coli*", *J. Bacteriol.*, 170(12):5837-5847 (1988).

114. Anderson, A.J., Haywood, G.W. and Dawes, E.A., "Biosynthesis and composition of bacterial poly(hydroxyalkanoates)," *Int. J. Biol. Macromol.*, 12:102-105 (1990).
115. Lee, S. Y., "Bacterial polyhydroxyalkanoates", *Biotechnology and Bioengineering*, 49:1-14 (1996).
116. Steinbüchel, A. and Schlegel, H. G., "Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*", *Molecular Microbiology*, 5(3):535-542 (1991).
117. Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A. and, Swings, J., "Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils", *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10):3233-3238 (1993).
118. Savenkova, L., Gercberga, Z., Nikolaeva, V., Dzene, A., Bibers, I. and Kalnin, M., "Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films", *Process Biochem.*, 35:573-579 (2000).
119. Molitoris, H. P., Moss, S. T and de Koning, G. J. M., "Scanning electron microscopy of polyhydroxyalkanoate degradation by bacteria", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46:570-579 (1996).
120. Khan, S. T. and Hiraishi, A., "Isolation and characterization of a new poly(3-hydroxybutyrate) degrading, denitrifying bacterium from activated sludge", *FEMS Microbiology Letters*, 205:253-257 (2001).
121. Sei, K., Nakao, M., Mori, K., Ike, M., Kohno, T. and Fujita, M., "Design of PCR primers and a gene probe for extensive detection of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)-degrading bacteria possessing fibronectin type III linker type-PHB depolymerases", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55:801-806 (2001).
122. Weber, C. J., "Biobased packaging materials for the food industry", *The EU Directorate 12*, Frederiksberg (2000).
123. Tanaka, K., Katamune, K. and Ishizaki, A., "Fermentative production of poly- β -hydroxybutyric acid from xylose by a two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*", *Biotechnology Letters.*, 15(12):1217-1222 (1993).
124. Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M. and Soga, K., "Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentatonic acids", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28:330, 334 (1988).
125. Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y. and Aslım, B., "Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria", *Turk. J. Biol.*, 27:37-42 (2003).
126. Aslım, B., Sağlam, N. ve Beyatlı, Y., "Topraktan izole edilen bazı *Bacillus* türlerinin poly- β -hydroxybutyrate (PHB) üretim miktarlarının belirlenmesi", *Biyoteknolojide Üniversite-Sanayi İşbirliği Sempozyumu' 98*, Anadolu Üniv. ve Biyoteknoloji Derneği, Eskişehir (1998).
127. Kato, N., Konishi, H., Shimao, M. and Sakazawa, C., "Production of 3-hydroxybutyric acid trimer by *Bacillus megaterium* B-124", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73(3):246-247 (1992).
128. Miyake, M., Erate, M. and Asada, Y., "A thermophilic *Cyanobacterium*, *Synechococcus* sp. MA 19, capable of accumulating poly- β -hydroxybutyrate", *J. Ferment. Biogeng.*, 82 (5):512-514 (1996).
129. Dave, H., Ramakrishna, C. and Desai, J. D., "Production of poly-hydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp. IPCB-403", *Ind. Jour. Exp. Bio.*, 34:216-219 (1996).

130. Palmada, F. M. and Sanchez, Rivas, C., "Survival of *Bacillus megaterium* strains in water", *Rev. Argent Microbiol.*, 28(4):170-174 (1996).
131. Benoit, T. G., Wilson, G. R. and Baugh, C. L., "Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1", *Letters in Applied Microbiology*, 10:15-18 (1990).
132. Nickerson, K. W., Zarnick, W. J. and Kramer, V. C., "Poly- β -hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis*", *FEMS Microbiology Letters*, 12:327-331 (1981).
133. Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K. and Chen, G., "Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. Jma5 cultivated in molasses media", *Antonie Van Leeuwenhoek*, 80:111-118 (2001).
134. Ahn, W. S., Park, S. J. and Lee, S. Y., "Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution", *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8):3624-3627 (2000).
135. Gouda, M. K., Swellam A. E. and Omar, S. H., "Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources", *Microbiological Research*, 156(3):201-207 (2001).
136. Bormann, E. J., Leissner, M. and Beer, B., "Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates", *App. Microbiol. Biotechnol.*, 49:84-88 (1998).
137. Ateş, M. ve Ekmekçi, S., "Pancar melası kültüründe *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 and *Azotobacter chroococcum* (TEM) 'dan PHB üretimi", *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25(3):61-70 (2001).
138. Ezura, Y., Yumato, I., Oseka, N. J. and Kimura, T., "A marine bacterium accumulating large amount of poly- β -hydroxybutyrate", *Bull. Fac. Fish.*, 39(2):133-141 (1988).
139. Hiki, S., Miyamoto, M. and Kimura, Y., "Synthesis and characterization of hydroxy-terminated [RS]-poly-(3-hydroxybutyrate) and its utilization to block copolymerization with L-lactide to obtain a biodegradable thermoplastic elastomer", *Polymer*, 41:7369-7379 (2000).
140. Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S. and Goulet, J., "Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate", *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1):165-169 (1995).
141. Gomez, J. G. C., Rodrigues, M. F. A., Alli, R. C. P., Torres, B. B., Bueno Netto, C. L., Oliveira, M. S. and da Silva, L. F., "Evaluation of soil Gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbonhydrates and propionic acid", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:785-791 (1996).
142. Chen, G. Q., König, K. H. and Lafferty, R. M., "Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*" *FEMS Mic. Lett.*, 84:174-176 (1991).
143. Nippon-Kayaku, "New *Bacillus* sp. for rapid production of poly-beta-hydroxybutyrate", *Patent no: JP06153916*, 13:19 (1994).
144. Page, W. J. and Knosp, O., "Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD", *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(6):1334-1339 (1989).
145. Mercan, N. ve Beyatlı, Y., "*Bacillus sphaericus* suşlarının poli- β -hidroksibütirat (PHB) üretimlerinin incelenmesi", *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25(2):1-7 (2001).
146. Sadettin, S., "Bazı *Bacillus* cinsi bakterilerinin PHB üretim yeteneklerinin incelenmesi", *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara (2000).
147. Law, K., Leung, Y., Lawford, H., Chua, H., Lo, W. and Yu, P. H., "Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91(93):515-524 (2001).

148. Labuzek, S. and Radecka, I., "Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85", *Journal of Applied Microbiology*, 90:353-357 (2001).
149. Beyatlı, Y., Aslım, B. ve Mumcu, Z. N., "Doğada parçalanabilen termobiyoplastiklerin üretimi", *Devlet Planlama Teşkilatı Projesi* (DPT:97K121150), Ankara, 21-37 (1999).
150. Ramsay, B. A., Sarcovan, I., Ramsay, J. A. and Marchessault, R. H., "Effect of nitrogen limitation on long side-chain poly- β -hydroxyalkanoate synthesis by *Pseudomonas resinovorans*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(2):744-746 (1992).
151. Kim, B. S., "Production of poly (3- hydroxybutyrate) from inexpensive substrates", *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 774-777 (2000).
152. Qi, Q. and Rehm, B. H., "Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*; molecular characterization of the polyhydroxybutyrate syntase", *Microbiology*, 147(12):3353-3358 (2001).
153. Chowdhury, B. and John, M., "Thermal evaluation of transgenic cotton containing polyhydroxybutyrate", *Thermochemica Acta*, 313:43-53 (1998).
154. Lee, S. Y., Yim, K. S., Chang, H. N. and Chang, Y. K., "Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*", *Journal of Biotechnology*, 32:203-211 (1994).
155. Singh, J., Batra, N. and Sobti, R. C., "Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1", *Process Biochemistry*, 36:781-785 (2001).
156. URL 1: <http://www.bact.wisc.edu / microtextbook / Bacterialstructure / DNA.html>, (2003).
157. URL 2: <http://www.bact.wisc.edu / microtextbook / BactGenetics / conjugation1.html>, (2003).
158. Woodford, N. and Johnson, A. P., "Plasmid analysis", *Molecular Bacteriology*, Humana Pres, New Jersey (1998).
159. Voskuil, M.I. and Chambliss, G.H., "Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis*," *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4):1138-1142 (1993).
160. Shakoory, A. R., "Characterization and amplification of plasmid DNA of *Bacillus thuringiensis*", *Proceedings of Pakistan Congress of Zoology* held under auspices of the Zoological Society of Pakistan Government College, Lahore, April 1992, 57:59-72, (1994).
161. Belliveau, B. H., Starodub, M. E. and Trevors, J. T., "Occurrence of antibiotic and metal resistance and plasmids in *Bacillus* strains isolated from marine sediment", *Canadian Journal of Microbiology*, 37(7):513-520 (1991).
162. Sur, B., Misra, A. K. and Basu, S. K., "Identification of a small plasmid having role in delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis* (H 14) by curing analysis", *Journal of Microbial Biotechnology*, 4(1):48-53, (1989).
163. Hillier, P., Wase, D. A. J., Emery, A. N. and Solomons, G. L., "Instability of α -amylase production and morphological variation in continuous culture of *Bacillus amyloliquefaciens* is associated with plasmid loss", *Process Biochemia*, 32(1):51-59 (1997).
164. Cordes, C., Meima, R., Twiest, B., Kazemier, B., Venema, G., Dijn, J. M. and Bron, S., "The expression of a plasmid-specified exported protein causes structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*" *Journal of Bacteriology*, 178(17): 5235-5242 (1996).
165. Chughtai, W. T. and Shakoory, A. R., "Antibiotic sensitivity of *Bacillus thuringiensis* HD-1 *kurstaki*", Fourteenth Pakistan Congress of Zoology, held 1-3 April 1994 at the University of Karachi, Pakistan, *Proceedings of Pakistan Congress of Zoology*, 14:209-219 (1994).

166. Marin, R., Tanguay, R. M., Valero, J., Letarte, R. and Bellemare, G., "Isolation and sequence of a 2 kb miniplasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-3a3b: Relationship with miniplasmid of other *B. thuringiensis* strains", *FEMS Microbiol. Lett.*, 94:263-270 (1992).
167. Hoshino, T., Ikeda, T., Narushima, H. and Tomizuka, N., "Isolation and characterization of antibiotic-resistance plasmids in thermophilic bacilli", *Can. J. Microbiol.*, 31:339-345 (1985).
168. Tanaka, T., Kuroda, M. and Sakaguchi, K., "Isolation and characterization of four plasmids from *Bacillus subtilis*" *Journal of Bacteriology*, 129(3):1487-1494 (1977).
169. Himeno, M., Ikeda, M., Sen, K., Koyama, N., Komano, T., Yamamoto, H. and Nakayama, I., "Plasmids and insecticidal activity of delta-endotoxin crystals from *Bacillus thuringiensis* avr. *israelensis*", *Agric. Biol. Chem.*, 49(3):573-580 (1985).
170. Yoshimura, K., Yamamoto, O., Seki, T. and Oshima, Y., "Distribution of heterogeneous and homologous plasmids in *Bacillus* spp." *Applied and Environmental Microbiology*, 46(6):1268-1275 (1983).