

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI *Bacillus* sp. SUŞLARININ ve BİYOAKTİF
METABOLİTLERİNİN KARAKTERİZASYONU, ANTİFUNGAL,
ANTİBAKTERİYEL ve ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Sinem VATANDAŞLAR

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

JÜRİ ÜYELERİ
Prof. Dr. İsmail DEMİR
Dr. Öğr. Üyesi Yeşim AKTÜRK DİZMAN

RİZE-2022
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BAZI *Bacillus* sp. SUŞLARININ ve BİYOAKTİF METABOLİTLERİNİN
KARAKTERİZASYONU, ANTİFUNGAL, ANTİBAKTERİYEL ve
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU danışmanlığında, Sinem VATANDAŞLAR tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile oluşturulan jüri tarafından .../.../... tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU	
Üye	: Prof. Dr. İsmail DEMİR	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Yeşim AKTÜRK DİZMAN	

Doç. Dr. Ahmet YANIK
ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bazı *Bacillus* sp. suşlarının ve biyoaktif metabolitlerinin karakterizasyonu ve antifungal/bakteriyel/oksidan aktiviteleri'nin araştırıldığı bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim sırasında ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum danışmanım sayın Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na, biyoaktif maddeleri saflaştırılma ve kimyasal yapılarını aydınlatma noktasında çalışmama katkı sağlayan sayın Prof. Dr. Nurettin YAYLI'ya, suşların antioksidan aktivitelerini belirleme noktasındaki katkıları için sayın Doç. Dr. Nimet BALTAŞ'a, diğer branş eğitimlerimde bana yardımcı olan ve deneysel çalışmalarım için araç-gereç konusunda mevcut olanaklarını benimle paylaşan bütün hocalarıma; bu süreçte yardımlarını esirgemeyen Dr. Arif BOZDEVECİ'ye, birlikte çalışmaktan keyif aldığım sevgili arkadaşım Şeyma SUYABATMAZ'a ve her koşulda beni destekleyen değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu Yüksek Lisans Tezi RTEÜ-BAP tarafından FYL-2019-1057 nolu proje ile desteklenmiştir.

Sinem VATANDAŞLAR

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Bazı *Bacillus* sp. Suşlarının ve Biyoaktif Metabolitlerinin Karakterizasyonu, Antifungal, Antibakteriyel ve Antioksidan Aktivitelerinin Değerlendirilmesi” başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi’ndeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. .../.../...

Sinem VATANDAŞLAR

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

BAZI *Bacillus* sp. SUŞLARININ ve BİYOAKTİF METABOLİTLERİNİN KARAKTERİZASYONU, ANTİFUNGAL, ANTİBAKTERİYEL ve ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sinem VATANDAŞLAR

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

Çalışmada sağlıklı bal arılarından (*Apis mellifera*) izole edilen *Bacillus* sp. suşlarının ve büyüme ortamında ürettikleri metabolitlerin karakterize edilerek kültür şartlarında, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi hedeflenmektedir. *Bacillus* sp. suşlarının karakterizasyonunda, mikroskopisi, çevresel ve fiziksel koşullara direnci, biyokimyasal testleri, antibiyogramları, antibakteriyel ve antifungal etkinlikleri test edildi. *Bacillus* sp. suşlarının, pH:8.0'de, 35°C'de, % 5 tuz'da ve % 20 glikoz içeren ortamda optimum büyüme sağladıkları belirlendi. Büyüme ortam süpernatantında ve ekstraktta Gram (+) bakterilere ve bazı mantarlara karşı antimikrobiyal etkinlik gözlemlendi. DNA izolasyonu yapılarak, 16S rRNA sekans analizine göre, *Bacillus* sp. ile benzerlik gösterdiği belirlendi. Farklı çözücülerle ekstraksiyon yapıldığında etil asetat ekstraksiyonun verimi daha yüksek olduğu için, saflaştırmada ve deneylerde etil asetat kullanıldı. Saflaştırılan 4 maddenin NMR analizi ile kimyasal ve yapısal özellikleri belirlendi. Bu saf maddelerin ($C_7H_{13}NO$, $C_{12}H_{22}O_{11}$, $C_{18}H_{34}O$, $C_8H_{11}NO$), antifungal aktivitesinin olmadığı, $C_{12}H_{22}O_{11}$ ve $C_{18}H_{34}O$ maddelerinin benzer antibakteriyel (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. pyogenes*) etkinliğinin olduğu belirlendi. $C_7H_{13}NO$ maddesi sadece *E. coli* ve *S. pyogenes*'e etkinlik gösterirken, $C_8H_{11}NO$ maddesinin tüm bakterilere karşı etkinlik gösterdiği belirlendi. *Bacillus* sp. suşlarının büyüdüğü sıvı ortamında antioksidan aktivitesi olduğu belirlendi.

2022, 102 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal, Antifungal, Antioksidan, *Bacillus* sp.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF SOME *Bacillus* sp. STRAINS and THEIR BIOACTIVE METABOLITES, EVALUATION OF ANTIFUNGAL, ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

Sinem VATANDAŞLAR

**Recep Tayyip Erdogan University
Graduate Education Institute
Department of Biology
Master Thesis**

Supervisor: Prof. Dr.Şengül ALPAY KARAOĞLU

In this study, it is aimed to determine the antimicrobial and antioxidant activities of *Bacillus* sp. strains isolated from healthy honey bees (*Apis mellifera*) and these strains metabolites produced in the growth medium under culture conditions. Characterization of *Bacillus* sp. strains; microscopy, resistance to environmental and physical conditions, biochemical tests, antibiograms, antibacterial and antifungal activities were tested. It was determined that *Bacillus* sp. strains achieved optimum growth in pH 8.0, 35 °C, and in conditions containing 5% salt and 20% glucose. Antimicrobial activity against Gram (+) bacteria and some fungi was observed in the supernatants and extracts of the strains. After DNA isolation, according to the 16S rRNA sequence analysis, it was determined that it was similar to *Bacillus* sp. Ethyl acetate was used in purification and experiments, since the efficiency of ethyl acetate extraction was higher when extraction was performed with different solvents. The chemical and structural properties of the 4 purified substances were determined by NMR analysis. It was determined that these pure substances ($C_7H_{13}NO$, $C_{12}H_{22}O_{11}$, $C_{18}H_{34}O$, $C_8H_{11}NO$) did not have antifungal activity, $C_{12}H_{22}O_{11}$ and $C_{18}H_{34}O$ substances had similar antibacterial (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. pyogenes*) activity. It was determined that $C_7H_{13}NO$ was effective only against *E. coli* and *S. pyogenes*, while $C_8H_{11}NO$ was effective against all bacteria. It was determined that *Bacillus* sp. strains had antioxidant activity in the liquid medium in which they were grown.

2022, 102 pages,

Keywords: Antimicrobial, Antifungal, Antioxidant, *Bacillus* sp.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Literatür Özeti.....	3
1.3. Bal Arısı Sınıflandırılması, Kolonideki Arı Çeşitleri ve Görevleri	6
1.4. Genel Hatlarıyla Bal Arısı Mikrobiyotası.....	6
1.5. Mikrobiyota Kompozisyonundaki Varyasyonlar ve Edinim Yolları.....	7
1.6. Bal Arılarında Mikrobiyotanın Önemi	9
1.7. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	11
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	17
2.1. Materyal	17
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	17
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri.....	18
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	20
2.2. Yöntem.....	21
2.2.1. <i>Bacillus</i> spp. Suşlarının Canlandırılması	21
2.2.2. <i>Bacillus</i> spp. Suşlarının Geleneksel Karakterizasyonu ve Farklı Besiyeri Ortamlarında Üreme Durumlarının Belirlenmesi	21
2.2.3. <i>Bacillus</i> spp. Suşlarının Farklı Kültürel Koşullara Karşı Toleranslarının Belirlenmesi	22
2.2.4. <i>Bacillus</i> spp. Suşlarının Biyokimyasal Karakterizasyonu	22
2.2.5. <i>Bacillus</i> spp. Suşlarının Antibiyogram Testi	23
2.2.6. Genomik DNA İzolasyonu	23

2.2.7. 16S rRNA Geninin PZR ile Çoğaltılması.....	24
2.2.8. DNA'ların Agaroz Jel'de Yürütülmesi.....	24
2.2.9. Suşların Süpernatantlarının ve Etil Asetat Ekstraktlarının Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivite Testleri.....	25
2.2.10. Biyoaktif Metabolitin Ekstraksiyonu İçin Uygun Çözücünün Belirlenmesi.....	26
2.2.11. Biyoaktif Metabolitlerin Kısmi Saflaştırılması ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	27
2.2.12. Suşların Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	28
2.2.13. E44/2A Suşunun SEM Görüntü Analizi.....	29
3. BULGULAR.....	30
3.1. <i>Bacillus</i> spp. Suşlarının Karakterizasyonu	30
3.2. <i>Bacillus</i> spp. Suşlarının Farklı Kültür Koşullarında Üreme Özellikleri.....	33
3.3. <i>Bacillus</i> spp. Suşlarının Antibiyogram Testi	34
3.4. Suşların Moleküler Karakterizasyonu	35
3.5. Suşların kültür filtratlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri	36
3.6. Biyoaktif Metabolitlerin Ekstraksiyonu ve Antimikrobiyal Aktiviteleri.....	38
3.7. Biyoaktif Metabolitlerin Saflaştırılması ve Antimikrobiyal Aktivite Testi.....	47
3.8. Suşların Antioksidan Aktivite Testi.....	53
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	55
5. ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR	72
EK-1 <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının 16S rRNA Gen Sekansları.....	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Mikrobiyotayı etkileyen faktörler ve sonuçları.	7
Şekil 2. Polen / Arı Ekmeği	8
Şekil 3. Trophallaxis (Oral besin transferi)	8
Şekil 4. Bal arısı larvasının morfolojisi ve ipek bezleri	9
Şekil 5. Bal arılarında yararlı mikroorganizmalar, patojenler ve bulaş yolları	11
Şekil 6. Gram pozitif basil	12
Şekil 7. İturin, surfaktin fengisinin ve krustakin yapıları.	16
Şekil 8. <i>Bacillus</i> spp. izolatlarının sırasıyla MYPGPA, MHA ve MRSB besiyerlerindeki üremelerinden görünüşleri.....	31
Şekil 9. <i>Bacillus</i> spp.suşlarının Gram ve Nigrosin boyama bakteri ve spor görünümü.	32
Şekil 10. <i>Bacillus</i> spp. suşlarının karboksi metil selüloz ve amilaz aktiviteleri	33
Şekil 11. Suşların bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları	35
Şekil 12. <i>Bacillus</i> spp. filtratlarının <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>B. cinerea</i> ve <i>F. solani</i> suşlarına karşı 3. ve 7. günde antifungal aktiviteleri.....	38
Şekil 13. Hekzan ve etil asetat ekstraktlarının agar kuyucuk testi	39
Şekil 14. <i>Bacillus</i> spp. etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliği.	40
Şekil 15. <i>Bacillus</i> spp. etil asetat ekstraktlarının PDA’da antifungal etkinlik deneyi....	41
Şekil 16. <i>Bacillus</i> spp. süpernatantlarında santrifüj sonucu oluşan tabaka, E44/2A suşunun ürettiği polimer tortu ve etil asetat ekstraksiyondan görünüşleri	42
Şekil 17. Bakteri, spor ve polimer yapıların SEM görüntüleri.....	43
Şekil 18. E44/2A suşunun <i>F. oxysporum</i> ’da hif patlama deneyi.....	44
Şekil 19. <i>F. oxysporum</i> ve <i>R. solani</i> de fazların hifal büyümeyi engelleyici etkisi	44
Şekil 20. Modifiye şekerli kültür lizatlarının hifal büyümeyi engelleyici etkisi	45
Şekil 21. Patlatılan hücre süpernatantlarının hifal büyümeye etkisi	46
Şekil 22. E44/2A suşundan saflaştırılan dört maddenin sırasıyla <i>B. cereus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> suşlarına karşı antimikrobiyal etkinliği.....	48
Şekil 23. E44/2A suşundan izole edilen moleküller ve yapıları	48
Şekil 24. 1 Nolu bileşiğin ¹ H spektrumu.	49
Şekil 25. 1 Nolu bileşiğin APT spektrumu.....	49
Şekil 26. 2 Nolu bileşiğin ¹ H spektrumu.	50
Şekil 27. 2 Nolu bileşiğin APT spektrumu.....	50

Şekil 28. 3 Nolu bileşiğin ^1H spektrumu.	51
Şekil 29. 3 Nolu bileşiğin APT spektrumu.....	51
Şekil 30. 4 Nolu bileşiğin ^1H spektrumu.	52
Şekil 31. 4 Nolu bileşiğin APT spektrumu.....	52
Şekil 32. Troloks standart grafiği	53



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. <i>Bacillus</i> spp. suşlarının bazı karakterizasyon testleri	30
Tablo 2. Suşların MHB ve MRS sıvı besiyerlerinde üreme ve polimer üretim özellikleri	31
Tablo 3. İzolatların bazı enzim üretme yeteneklerinin belirlenmesi.....	32
Tablo 4. Suşların sıcaklık ve pH değişimlerine karşı toleransları.....	33
Tablo 5. Suşların farklı tuz ve şeker konsantrasyonlarında üreme yetenekleri.....	34
Tablo 6. Test edilen antibiyotiklerin isimleri, kısaltmaları, doz içerikleri, dahil oldukları antibiyotik grupları ve etkinlik zon çapları.....	34
Tablo 7. Suşların sekans analiziyle belirlenen 16S rRNA gen benzerlikleri	36
Tablo 8. <i>Bacillus</i> spp. kültür filtratlarının agar kuyucuk diffüzyon metoduna göre etkinliği.....	37
Tablo 9. <i>Bacillus</i> spp. kültür süpernatantlarının misel gelişiminin inhibisyonu.....	37
Tablo 10. Hekzan, Kloroform ve etil asetat ekstraktlarının karşı antimikrobiyal etkinliği	38
Tablo 11. Farklı iki besiyerinde üretilen kültürlerin Etil Asetat Ekstraktların madde içeriklerinin belirlenmesi	39
Tablo 12. MRS ve MYPGP sıvı kültürlerin etil asetat ekstraktlarının agar kuyucuk yöntemine göre antimikrobiyal aktivitesi	40
Tablo 13. <i>Bacillus</i> spp. suşlarının MRSB kültür filtratının etil asetat ekstraktlarının funguslara karşı antifungal aktiviteleri	41
Tablo 14. Fazların damlatıldığı alanlarda Mantar misellerinin gelişimi.....	45
Tablo 15. Modifiye karbon kaynaklı MRSB kültür lizatlarının antifungal etkinliği	46
Tablo 16. Sonikatör işlemi sonrası patlatılan hücre kültür lizatı süpernatantlarının antifungal etkinliği.....	47
Tablo 17. Saflaştırılan maddenin bazı mikroorganizmalara karşı inhibisyon zon çapları ve MİK değerleri.....	47
Tablo 18. CUPRAC tayininde yapılan pipetleme işlemi	53
Tablo 19. Bileşiklerin CUPRAC yönteminde elde edilen antioksidan aktivite sonuçları	54

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
NCBI	Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TE	Tris-EDTA (10 mM:1mM)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
LB	Luria- Bertani Besiyeri
CMC	Karboksimetil Selüloz
CD	Siklodekstrin
CGTaz	Siklomaltodekstrin glukanotransferaz
DNase	Deoksiribonükleaz
RNase	Ribonükleaz
MHA	Müeller Hinton Agar
MYPGP	Malt Yeast Peptone Glucose
MRS	De Man, Rogosa, Sharpe Agar
EMB	Eosin Methylene Blue
PDA	Potato Dextrose Agar
BHIA	Brain-Heart Infusion Agar
EPS	Ekzopolisakkarit
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MBK	Minimal Bakterisidal Konsantrasyonu

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Arıcılık tüm dünyada gelişmekte olan bir tarımsal sektör olup, özellikle arı ürün çeşitliliğine paralel olarak giderek daha da büyük önem kazanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde arıcılık faaliyetleri tozlaşma bazında yaygın olmakla birlikte, Uzak Doğu ülkelerinde tıbbi öneriler için öne çıkmakta ve ülkemiz dahil olmak üzere Avrupa'da çoğunlukla beslenme için kullanılmaktadır (Öztürk, 2013).

Arıları, ekolojik dengenin korunmasına yardımcı oldukları için ekosistemin korunması için hayati öneme sahiptir. Çevre ve çeşitli mikroorganizmalar ile karmaşık etkileşimleri olduğu bilinmektedir. Bal arıları ile dış çevreleri arasındaki ilişkiyi anlamak, hem insanlar hem de arılar için misafirperver bir ortam sağlamak için önemlidir (Engel ve Moran, 2013; Bommuraj vd., 2021). Arılar bir taraftan bal, balmumu, arı sütü, arı zehri, polen ve propolis gibi çok sayıda hayvansal ürünler üretirken, diğer taraftan da tozlaşma yoluyla verimi ve kaliteyi artırarak bitkisel üretimde devamlılığı sağlayan vazgeçilmez üreticilerdir (Erkan ve Aşkın, 2001).

Bal arılarındaki bakteriyel topluluk, birçok canlıdaki bağırsakla ilişkili topluluklara kıyasla nispeten basittir. Bu bakteri florasının genişliği, arıların sağlıklarında, kendi bedenlerimizde olduğu gibi rol oynayabilir (Dillon ve Dillon, 2004). Bal arılarından ve ürünlerinden izole edilen; sporlu basiller içerisinde yer alan bazı *Bacillus* spp., bal arıları ile yakından ilişkilidir. İşçi arılar, gıda kaynaklarının hazırlanmasında ve bozulmadan korunmasının sağlanmasında probiyotik bakteriler ile işlevsellik sağlayarak kazanırlar (Gilliam, 1997).

Bacillus genusuna ait türlerin çoğu tarım ve endüstriyel amaçlarda başarılı şekilde kullanılmakta olan pek çok maddeyi sentezleyebilme kabiliyetine sahiptirler. Genusun, tür ve suşları tarafından üretilen doğal antimikrobiyallerin; farklı bitki patojenlerine karşı antibakteriyel/antifungal aktivite gösterdiği belirtilmektedir (Ongena ve Jacques, 2008; Katz ve Demain, 1977). Araştırmalarda mikroorganizmaların ürettikleri antimikrobiyallerin karmaşık bir biyosentetik yol izlediğini ve antimikrobiyal aktivitedeki farklılığın (kültür ortamındaki besinsel faktörler, pH ve sıcaklık gibi) üretilen sekonder metaboliti etkilediği ve doğal olarak farklı ürünlerin ortaya çıktığını belirlemiştir (Cooper vd., 1981; Iwase vd., 2009; Qilong vd., 2013).

Uzun yıllar boyunca, biyologlar sekonder metabolitlere ilgi duymuyorlardı. Bugün ise durum farklılaşmıştır. Bilimin sürekli ilerleyen ve kendini yenileyen yapısı, sekonder metabolitler hakkında birçok soruyu daha beraberinde getirdi: İkincil metabolitlerin doğadaki işlevleri nelerdir? Metabolit yolları nasıl kontrol edilir? Sekonder metabolizma genlerinin kökenleri nelerdir? Organizmaların kendilerini yok etmekten korumak için kullandıkları direnç genlerinin kökenleri nelerdir? Bunlar klinik olarak dirençli bakterilerde bulunanlarla aynı genler midir? Akademik camianın, günümüzde bu sorulara büyük ilgi gösterdiği açıktır. Sekonder metabolitlerle ilgili yapılacak olan yeni çalışmalarla, yeni biyoaktif maddelerin keşfedilmesi bu noktada büyük önem taşımaktadır (Sansinenea ve Ortiz, 2011).

Antibiyotikler, bilinçsiz ve gereksiz kullanımları sonucu ortaya çıkan çoklu antibiyotik direnci sebebiyle, günümüzde etkilerini önemli oranda kaybetmişlerdir. Ortaya çıkan bu çoklu direnç gelişimine karşı, alternatif çözüm yollarından birisi de yeni antimikrobiyal maddelerin keşfedilmesidir (Öztürk, 2008; Serpi vd., 2012). Son yıllarda antibakteriyel ve antifungal ilaçlara karşı, ikili veya çoklu dirence sahip birçok mikroorganizma klinik olarak izole edilip denendiğinde, tek yönlü antibiyotiklerin etkisinin yeterli olmadığı görülmüştür. Direnç kazanan bu mikroorganizmalara karşı, farmakolojik olarak aktif yeni bileşiklerin bulunması önem arz etmektedir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003). Dünya Sağlık Örgütü, 2014'ten sonraki dönemlerde antibiyotik direnç krizinin giderek kötüleşeceği konusunda uyarılarda bulunmuştur (Ventola, 2015). Önümüzdeki yıllarda bakteriyel enfeksiyonlara karşı dirençli bakterilerin hızlı bir şekilde ortaya çıkması mevcut antibiyotikler yerine yeni doğal ve kimyasal bileşiklerin seçim tarama programlarına ihtiyacı biraz daha artmaktadır (Ruiz, 2010; Viswanathan, 2014).

Günümüzde, sentetik antimikrobiyal bileşiklerin tanımlanması ve geliştirilmesi, yüksek maliyet ve uzun zaman almaktadır. Bundan dolayı çalışmalar doğal aktif bileşikleri bulma ve geliştirme alanına doğru yönelim göstermektedir. Antimikrobiyal maddeler küfler tarafından veya bakteriler arasında en çok aktinomisetler tarafından üretildiği bilinmektedir (Valli, 2012; Chaudhary, 2013). Doğal ürünler, hedef mikroorganizmalara penetrasyon zorluğunu aşabilirler. Günümüzde, kültürü yapılamayan mikroorganizmalardan doğal maddelerin üretimi için, kendi doğal ortamlarının kullanıldığı yeni yöntemler geliştirildi (Lewis, 2012, 2013; Ling vd., 2015).

Çalışmamızda bal arılarının (*Apis mellifera*) doğal florasından izole edilen 4 adet *Bacillus* sp. suşlarının tanımlanması ve ürettikleri metabolitlerin karakterize edilmesi (antimikrobiyal, antifungal, antioksidan aktivite) hedeflenmektedir. Çalışma sonucunda, izole edilen bu suşlardan elde edilen biyoaktif maddelerin insan ve bitki patojenlerine karşı güçlü etkinlik göstermesi ve kimyasal yapısının aydınlatılmasını beklenmektedir.

1.2. Literatür Özeti

Bacillus spp., mikroorganizmalarını bal arıları ile ilişkilendirmiş ve arıların gıda kaynaklarının hazırlanmasını ve bozulmadan korunmasını bu bakterilerin sağladığını belirtmiştir (Gilliam, 1997). Kacániová vd. (2004) işçi arılardan Midgut (orta bağırsak) ve Rektum (arka bağırsak) bölgelerini homojenleştirip nutrient besiyerinde kültüre edilmiştir. Kültür sonucunda kış mevsimindeki bal arılarının rektumunda, en çok bulunan mikroorganizmaların *Bacillus* spp. olduğu, orta bağırsakta ise mayalardan sonra en çok tanımlanan mikroorganizmaların *Bacillus* spp. olduğu bildirildi.

Mazmanian vd. (2005)'i konakla ilişkili mikroorganizmaların, konakçılarının bağışıklık sisteminin, sindirimin ve genel iyiliğin gelişmesine büyük ölçüde katkıda bulunduğu sonucuna varmışlardır. Alippi ve Reynaldi (2006) yaptıkları çalışmada, *Bacillus* spp.'nin polen fermantasyonunu, gıda korumasını ve hastalıkların önlenmesini kolaylaştırarak bal arılarına fayda sağladığını ve *Bacillus subtilis* suşlarının bal arısı patojeni *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*) ve *Ascosphaera apis*'in (*A. apis*) büyümesini engellediği bildirildi.

Snyder (2009), *Bacillus* spp. ve *Bacillus amyloliquefaciens* (*B. amyloliquefaciens*) bakterilerinin; yağlar, proteinler ve nişastalar gibi kimyasal bileşenlerin yıkımını katalize eden amilaz, lipaz ve proteaz enzimlerini üretebildikleri tespit edildi. Ayrıca Sun vd. (2010) *Bacillus subtilis* tarafından amilaz üretebildiğini çalışmalarında göstermişlerdir.

Sabaté vd. (2012), *B. subtilis* Mori2 suşu koloni performansı üzerinde faydalı etkilere sahip olduğunu bildirmiştir. *B. subtilis* üzerine yapılan önceki çalışmalarda, bakteriler tarafından üretilen bir lipopeptit olan surfaktinin, *P. larvae*, *A. apis*, ve *Nosema ceranae* (*N. ceranea*) dahil olmak üzere bazı bal arısı patojenlerini inhibe ettiğini göstermiştir. Wu vd. (2013), yaptığı çalışmada 3 farklı koloniden toplanan 10 işçi arının bağırsaklarından izole edilen *Bacillus* cinsi bakteriler, larvalarda hastalık

oluşturan *Melisococcus plutonius* DAT561 (*M. plutonius*) suşuna karşı test edildi. Moleküler olarak *Bacillus subtilis* strain A97 (AB501113) olarak tanımlanan Acja3 izolatu, *M. plutonius* DAT561 suşuna karşı inhibe edici aktivitesi bildirildi.

Kadaikunnan vd. (2015), *B. amyloliquefaciens* etil asetat ekstraktının bazı bakteri ve mantarlara karşı anlamlı aktivite gösterdiklerini belirlendi. *Bacillus subtilis*, *Enterococcus cloacae* (*E. cloacae*) ve *Staphylococcus aureus*'a (*S. aureus*) karşı MIC değeri 25.0 µg/mL, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) için 12.5 µg /mL ve *Aspergillus clavatus*, *A. fumigatus*, *A. niger* ve *Fusarium moniliforme* (*F. moniliforme*) için ise MIC değeri 25 µg/mL olarak bildirildi.

Gilyazeva vd. (2017), *B. subtilis* GM2 ve GM5 suşlarının fitopatogenik mantarlara karşı aktivitelerini incelendi. GM5 suşunun, fitopatogenik mantarların büyümesini GM2 suşundan daha etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterildi. GM5 suşu *Alternaria alternata* (*A. alternata*) TP 712, *Fusarium avenaceum* (*F. avenaceum*), *F. redolens*'in büyümesini sırasıyla %72, %66 ve %65 oranında inhibe edebilirken, GM2 suşu ise sırasıyla %48, %54 ve %55 oranında inhibe ettiği bildirildi. İki suş da bir dizi hidrolitik enzimin yanında antimikrobiyal metabolitler (amonyak ve HCN) üretebildiği belirlendi. *Bacillus subtilis* GM2 buğdayın büyümesini desteklerken, buğday fidelerini ise *Fusarium oxysporum* (*F. oxysporum*) enfeksiyonundan sadece *B. subtilis* GM5 koruduğu bildirildi.

Paudel vd. (2015) çalışmalarında, bal arılarının bağırsaklarında 'poligalakturonaz' üreten bakteri suşunu izole etmeyi amaçlamışlardır. *Bacillus* sp. HD2 olarak adlandırılan suş 72 saatlik inkübasyon sonucunda maksimum büyüme ve poligalakturonaz üretimini gösterdi. Poligalakturonaz'ın 40 °C'de optimal olduğu ve geniş (pH 5-12) bir pH aralığında enzim aktivitesi sergilediği bildirildi. Elshaghabee vd. (2017)'nin çalışmalarında *Bacillus* suşlarının probiyotik olarak kullanılabilir çok iyi potansiyel aday olduklarını belirtildi. Bu salgılanan ürünlere ek olarak, *Bacillus*'ların, probiyotik ürünlerde geleneksel probiyotiklerden çok daha uzun süre stabil kaldıklarını bildirildi. Hamdy vd. (2017)'nin *B. subtilis* HMNig-2 ve *B. subtilis* MENO2 suşlarının umut verici probiyotik özellikler sergiledikleri ve sırasıyla 94.1 ve 81.5 U/mL'lik levansükraz aktivitesi gösterebildiği bildirildi. İki izolatu levanları bazı patojenlere karşı iyi antimikrobiyal aktivite göstermiş ve *Lactobacillus casei* (*L. casei*) ve *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) ile pozitif prebiyotik etki (prebiyotik indeks >1) sergilemiştir. Sonuçlar, incelenen suşların levansükraz üretimi, levan verimi ve

probiyotik öncesi aktiviteleri arasında bir korelasyon olduğunu belirtilmiştir.

Zulkhairi Amin vd. (2019)'nin çalışmalarında iğnesiz bal arısı olan *Heterotrigona itama*'nın balından izole edilen *Bacillus* spp.'nin antimikrobiyal aktivitelerini ve probiyotik potansiyellerini araştırıldı. *B. amyloliquefaciens* HTI-19, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteler sergilemekle kalmadı, aynı zamanda *Bacillus cereus* (*B. cereus*) ve *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*)'un büyümesini de engellemişlerdir. Probiyotik potansiyelleri açısından ise, *B. amyloliquefaciens* HTI-19 ve *B. subtilis* HTI-23 suşlarının önem arz ettikleri bildirildi.

Magdalena vd. (2020), bal ve arı ürünlerinden izole edilen *Bacillus* spp.'nin gıda kaynaklı patojenlere karşı antibakteriyel aktivitelerinin analizi amaçlandı. Bakteri izolatları, *B. cereus* ATCC 14579, *Salmonella enterica* (*S. enterica*) 51741 ve *S. typhimurium* ATCC 14028'e karşı antibakteriyel aktivite gösterdi. *B. cereus* ATCC 14579 izolatına karşı en yüksek aktivite 10.3 mm inhibisyon zonu ile *B. amyloliquefaciens* Y21 izolatı, *S. enterica* 51741'e karşı 6.5 mm zon ile *Bacillus velezensis* Y12 (*B. velezensis*) izolatı ve *S. typhimurium* ATCC 14028'e karşı ise en yüksek aktivite 7.5 mm zon ile *B. velezensis* Y33 izolatının gösterdiği bildirildi. Fitri vd. (2020) yapmış oldukları çalışmada, kovandan izole edilmiş olan *Bacillus siamensis* BSL6 suşunun üretmiş olduğu sekonder metabolitin *S. aureus* ve *Echerichia coli* (*E. coli*)'ye karşı antimikrobiyal aktivitesini test edildi. Sekonder metabolitin "saponinler" grubuna ait olduğu tespit edildi. Sonuçlar, BSL6 izolatının *E. coli*'nin büyümesini inhibe edemediğini, ancak *S. aureus*'un büyümesini 17.87 mm inhibisyon bölgesi ile inhibe edebildiğini gösterildi.

Boottanun vd. (2017)'nin yapmış oldukları çalışmada, *B. amyloliquefaciens* N2-4 ve N3-8 suşlarında bulunan metabolitlerin, gram negatif fırsatçı bir patojen bakteri olan *Burkholderia pseudomallei*'yi (*B. pseudomallei*) öldürebildiğini tespit etmişlerdir. Dahası, bu metabolitler *B. pseudomallei*'nin ilaca dirençli izolatlarını öldürmeyi ve aynı zamanda *S. aureus*, *E. coli* ve *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) gibi diğer patojenik bakterileri de inhibe edebilmeyi başarmıştır. N3-8 suşunun antimikrobiyal aktivitesini, proteolitik enzimler ve otoklavın etkilemediği, N2-4 suşunun ise aktivitesinin olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir. Bu durumda iki suşun farklı bileşikler ürettiği söylenebilir. Dang vd. (2019) *Bacillus* spp. tarafından üretilen antibiyotik ve siklik lipopeptidlere ait olan iturinler, hemolitik ve antifungal özelliklerinden dolayı biyotiplendirmede ve biyokontrol uygulamalarında potansiyel kullanıma sahiptir. *B.*

amyloliquefaciens LL3, eksiksiz bir iturin A biyosentetik yolağına sahip olduğı ve birkaç yaygın bitki patojenine karşı güçlü inhibisyon aktivitesi gösterdiği bildirildi. Fermantasyon ortamında 48 saat çalkalanarak kültürlen *B. amyloliquefaciens*, kültür süpernatantı, 4 °C’de 9000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen kısım 6 M HCl ile pH 2’ye asitleştirilmiş ve gece boyunca 4 °C’de saklandı. Süpernatant, 0.22 µm’lik membran filtreden süzöldükten sonra HPLC analizi ile iturin olduğı belirlenmiştir.

1.3. Bal Arısı Sınıflandırılması, Kolonideki Arı Çeşitleri ve Görevleri

Bal arılarının sınıflandırılması, alemde cinse doğru şu şekildedir :

Alem	:	Hayvanlar (Animalia)
Şube	:	Eklembacaklılar (Arthropoda)
Alt Şube	:	Antenliler (Antennata)
Sınıf	:	Böcekler (Insecta)
Takım	:	Zar Kanatlılar (Hymenoptera)
Familiya	:	Arılar (Apidae)
Cins	:	Bal Arıları (Apis)
Tür	:	Bal Arısı (<i>Apis mellifera</i>),

İşçi arılar, çiftleşme yetenekleri olmayan dişi arılardır. 0 - 3 günlük iken yavru gözlerini temizler ve kuluçka sahasında gerekli sıcaklığı sağlarlar. 3 - 6 günlük iken petek gözlerinden aldıkları çiçek tozu ve nektar karışımı ile yaşlı larvaları beslerler. 5 - 15 günlük iken arı sütü ile genç larvaları beslerler. 12 - 18 günlük iken balmumu ile petek örerek ayrıca kovan temizliğini sağlarlar. 18 -20 günlük iken uçuş tahtası üzerinde kovan bekçiliğı yaparlar. 20 günden sonra ise “tarlacı arı” adını alırlar. Sadece kovan yönetimi ve yumurtlamadan sorumlu olan kraliçe arının (queen bee), yumurtaları döllenmiş ise dişi işçi (worker), döllenmemiş ise erkek (drone) arılar oluşur. Bal üretmeyen erkek arıların tek görevi kraliçe arı ile kovan dışında çiftleşmektir (URL-1).

1.4. Genel Hatlarıyla Bal Arısı Mikrobiyotası

Bazı canlılar ile birlikte simbiyotik olarak yaşayan mikroorganizmaların meydana getirdiğı popülasyona mikrobiyota denir. Bu mikrobiyota kalıcı ve geçici

mikrobiyota olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kalıcı mikrobiyota hayat boyu bulunurken, geçici mikrobiyota ise belirli bir dönemde ağırlıklı olarak organizmada bulunur. Bal arıları koloniler halinde yaşayan sosyal canlılar olduğundan dolayı çeşitli ortamlarla teması, çeşitli bakteri florasının bir vektörü olarak işlev görmesini sağlar (Şekil 1). Bir bal arısı kraliçesi çok sayıda erkekle eşleşir ve bu nedenle birçok farklı babadan, genetik olarak farklı işçi arıları kolonisine katar. Tarpy vd. (2004) işçi bal arılarının genetik çeşitliliğindeki artışla, kolonisi mikrobiyota genişliğinin ve aktivitesinin doğru orantılı olduğu bildirilmiştir.



Şekil 1. Mikrobiyotayı etkileyen faktörler ve sonuçları (Raymann ve Moran, 2018).

1.5. Mikrobiyota Kompozisyonundaki Varyasyonlar ve Edinim Yolları

Arı kolonileri, kovanın mikrobiyal dengesini etkileyebilecek çok sayıda çevresel değişkene maruz kalmaktadır. Bu mikrobiyal popülasyonun değişkenliği, çevreye (Mattila vd., 2012; Mrazek vd., 2008), genetik faktörlere, beslenmesine ve sosyal yaşam şekline göre değişebilmektedir (Martinson vd., 2012; Yoshiyama ve Kimura, 2009; Mohr ve Tebbe, 2006). Mikrobiyotadaki değişkenliğin, sistemin mevsimsel dönemlere göre de değişkenlik gösterebileceği bildirilmiştir (Corby-Harris vd., 2014).

Nektar ve bal, arılar için enerji ihtiyacı karşılarken, kolonide yavru yetiştirilebilmesi ve petek gözlerindeki genç arıların gelişebilmeleri için polen kullanılmaktadır. Arılar topladıkları polene, enzimlerle işleyerek petek gözlerinde depolarlar ve arı ekmeği (bee bread) oluştururlar (Şekil 2).

Lancaster Üniversitesi'nde, kovanlardan toplanan arı ekmeğindeki bakteri içeriği incelendi. Bal arılarının bulundukları habitatındaki bitki çeşitliliğinin, mikrobiyota çeşitliliğiyle doğru orantılı olduğunu gözlemlendi (Donkersley vd., 2017). Bal arısı mikrobiyotasındaki baskın olan türlerin varlığı oldukça tutarlı olsa da, bağırsak

segmentlerinde ve sosyal sınıflarda önemli değişikler görülür (Corby-Harris vd., 2014a; Powell vd., 2014; Ludvigsen vd., 2015).



Şekil 2. Polen / Arı Ekmeği (URL-3)

Tekli ot çeşitlerinden oluşan ve iğne yapraklı ormanlık alanlara yakın olan arı ekmeklerinin; bitki çeşitliliği fazla, g r otlaklık gibi habitatların yanında bulunan kovanlardaki arı ekmeklerine göre daha düşük bakteri çeşitliliği içerdiğini buldular (Donkersley vd., 2017). Bakterilerin büyük çoğunluğunun bal arısı arka bağırsağında yaŐadıęı (Martinson vd., 2012), bal midesi ve orta bağırsak mikrobiyotasının, arka bağırsak mikrobiyotasına göre ge i i/deęiŐken mikrobiyota’ya sahip olduğu bildirildi (Ludvigsen vd., 2015). Martinson vd. (2012) ile Powell vd. (2014) yaptıkları çalışmalarda larvaların ve yeni işçi arıların, neredeyse hiç bakteri kolonizasyonu göstermediğini, mikrobiyotalarını ortaya çıktıktan sonraki ilk birkaç gün içinde, diğer iŐçilerle sosyal etkileŐimler yoluyla edindiklerini belirtmiŐlerdir (Şekil 3).

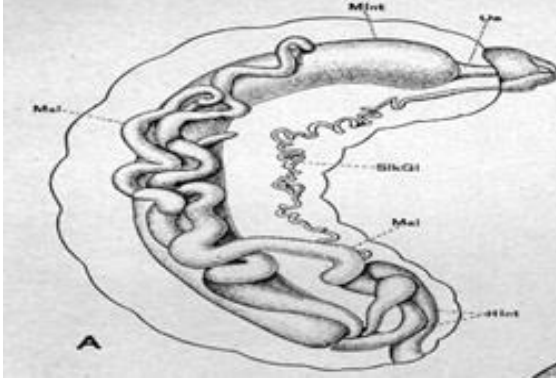


Şekil 3. Trophallaxis (Oral besin transferi) (URL-4)

Arı larvalarının kafalarında bulunan, çift taraflı ipek bezleri sayesinde, larvalar önemli bir madde üretilir (Şekil 4). Bu maddenin özelliği;

1. Hava ile temasa geçer geçmez sertleŐmesi (koza oluşumu)

2. İçerdiği "fibroin" isimli protein sebebiyle, kuvvetli bir bakteri öldürücü ve enfeksiyon önleyici olmasıdır.



Şekil 4. Bal arısı larvasının morfolojisi ve ipek bezleri (Nelson, 1924).

Moleküler metodolojileri kullanan daha yakın tarihli çalışmalarda bal arısı larvalarında bazı çekirdek dışı türler tespit edilmiştir (Ahn vd., 2012; Mohr ve Tebbe, 2006; Martinson vd., 2012). Fakat pupa evresinde gerçekleşen, kabuk (koza) değişiminin; larval mikrobiyotasının, yetişkin evreye geçişini engellediği bildirildi (Martinson vd., 2012).

1.6. Bal Arılarında Mikrobiyotanın Önemi

Bağırsak mikroorganizmaları, metabolizma için önemli işlevler sunar. Sindirilemeyen karbonhidratları ayırma işlevi bulunan bağırsak mikrobiyal toplulukları birçok konak organizma için gereklidir (Hall vd., 2017). Ayrıca bağırsak mikroorganizmaları, insan ve hayvan sağlığının yararına klinik tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olma potansiyeline sahiptir. Bazı arı kaynaklı bakteri suşları, antimikrobiyal özelliklere sahiptir ve patojenleri inhibe etmede rol oynarlar (Wu vd., 2013).

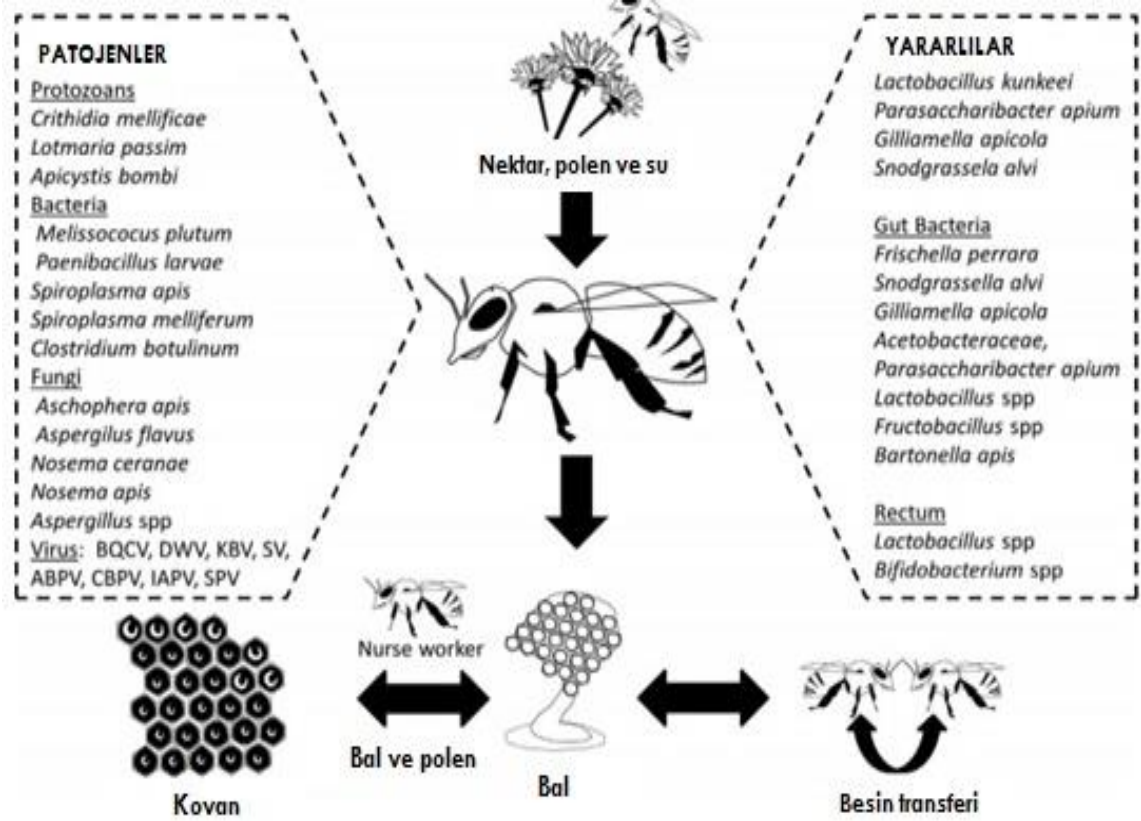
Önceki çalışmalarda, arılardaki bakteri florasının, hastalıklara karşı direnci ile olumlu etkiler gösterilmiştir (Gilliam, 1997). Bu nedenle, arıların bedenlerinde doğal olarak oluşan mikrobiyal flora desteklenirse, arıların hastalığa karşı daha dirençli olabileceği fikri ortaya çıkmaktadır (Tajabadi vd., 2013). Antibiyotik kullanımı arıların bağışıklık sistemini zayıflatır ve antibiyotiğe dirençli bakteriyel patojenlere yol açar (Doğaroğlu ve Samancı, 2006).

Bal arısı hastalıklarını kontrol etmek ve arı kolonisi sağlığını iyileştirmek için verimli ve sürdürülebilir stratejiler geliştirmek açısından çok önemlidir. Laktik asit bakterileri gibi gram pozitif bakteriler, başlıca *Lactobacillus* ve *Bacillus* spp. potansiyel probiyotik özelliklerinden dolayı umut verici seçeneklerdir. Laktik asit bakterilerinin fermentasyon özelliklerinden dolayı hem nektarın bala hem de polenin arı ekmeğine dönüşümünde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Laktik asit bakterileri, bal arısı sağlığı için büyük önem taşır, onları arı patojenlerine karşı korur ve balın antimikrobiyal özelliklerine katkıda bulunur. Bu bağlamda laktik asit bakterileri, bağırsakta immünolojik bariyer oluşturarak konakçı vücut savunmasını desteklemektedir (Olofsson ve Vasquez, 2008; Patruica ve Mot, 2012).

Bal arıları, karmaşık bir biyolojik yapıya sahip, sosyal, koloni oluşturan böceklerdir. Arı kolonileri bireysel, grup ve kovan bileşenlerinden oluşan “süper organizmalar” olarak kabul edilebilir. Kraliçe ve işçi, döllenmiş yumurtalardan doğmuş olmalarına ve aynı genotipe sahip olmalarına rağmen, bal arılarında kast belirleme fenomeni, davranış, yaşam süresi, gelişim, fonksiyon, fizyoloji, morfoloji ve metabolizma açısından büyük farklılıklar gösterir. Tipik bir kk kovanda, kraliçe, erkek arı ve işçiler olmak üzere üç tre ayrılan yaklaşık 20.000 arı bulunur. Kraliçenin ana görevi, feromon salgılayarak ve yumurtlayarak elde ettiği tüm koloninin düzenini sağlamaktır. Işçi arıların ise çeşitli sorumlulukları vardır: Karın bezlerinden mum salgırlar; kraliçe, genç erkek arılar ve kuluçka ile ilgilenir ve genellikle yılın mevsimine göre toplayıcı olarak çalışır. Yiyecek arama, kovandan uçup nektar, polen ve propolis aramak için iek ve ağaçları ziyaret etmekten ve daha sonra kovana götürüp bal üretmek için kullanmaktan ibarettir.

Bal arılarının mikrobiyotalarını polen, yiyecek tüketimi ve aynı kolonideki ya da diğer ortamlardaki yaşlı arılarla temas yoluyla elde ettiklerine inanılmaktadır (Gilliam ve Taber, 1991, Kacaniova vd., 2004; Pavlicova vd., 2009). Bununla birlikte, diğer araştırmacılar, bal arılarının (*Apis* spp.), bakterilerin doğal olarak meydana geldiği ve gıda tüketimi ile üretilmediği yaklaşık sekiz arıya özgü filotipten oluşan oldukça uzmanlaşmış bir bağırsak mikrobiyal topluluğa sahip olduğunu bildirmiştir (Martinson vd., 2011; Moran vd., 2012; Vasquez vd., 2012). Bu mikroorganizmalar (şekil 5) büyük olasılıkla polenden, bal arılarının sindirim sistemlerinden, çiçeklerden, kirden, tozdan ve havadan gelmektedir (Gilliam ve Lorenz, 1983). *Bacillus* spp. gibi potansiyel arı probiyotik mikroorganizmaları bal arılarında ve çevrelerinde yaygın olarak bulunurlar.

Bu bakteriler, yalnızca kovan başına bal verimini artırmakla kalmayıp aynı zamanda arı bağırsağının mikrobiyal ekolojisini yeniden dengeleyen, patojen kolonizasyonuna karşı koruyan ve arı immünolojisini güçlendiren umut verici, yenilikçi tedaviler sağlayabilirler.



Şekil 5. Bal arılarında yararlı mikroorganizmalar, patojenler ve bulaş yolları (Silva vd., 2017)

1.7. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Bacillus cinsi başlangıçta tüm çubuk şeklindeki bakterileri içermekteydi, ancak günümüzde; zincirler oluşturan ve genellikle aerobik, mikroaerobik veya fakültatif anaerobik olarak yetişen, endospor oluşturan gram-pozitif basilleri içermektedir (Şekil 6). Bunlar, çoğu, toprak ve kil, kayalar, toz, su ortamları, bitki örtüsü, gıda maddeleri gibi çeşitli ortamlarda, çeşitli böcek ve hayvanların gastrointestinal kanallarında bulunabilen ve laboratuvarlarda kolaylıkla izole edilebilen yaygın çevresel orjinli organizmalardır.

Bacillus cinsi; *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* gibi önemli türleri kapsar. Şarbonun nedeni olan *B. anthracis*, grubun en önemli patojen türüdür (Thwaite ve Atkins, 2012).

Bacillus suşları probiyotikler olarak kullanılmak üzere çok iyi potansiyel adaylardır. Metabolik olarak, *Bacillus* türleri çok aktiftir, bir dizi yararlı enzim ve ürettikleri çok sayıda antibiyotik önceki araştırmalarda tespit edilmiştir (Schultz ve Chanyi, 2017). Özellikle *Bacillus* suşlarının, ribozomal olarak sentezlenmiş antimikrobiyal peptitler (bakteriosinler) (Abriouel vd., 2011) ve ayrıca ribozomal olarak sentezlenmemiş peptitler (NRP'ler) ve poliketidler (PK'ler) (Finking ve Marahiel, 2004) dahil olmak üzere çok çeşitli biyokontrol metabolitleri ürettiği bilinmektedir. Aynı zamanda bakterisit olmayan ribozomal olarak üretilmiş ve post-translasyonel olarak modifiye edilmiş peptitler (RiPP'ler) de üretmektedirler. *Bacillus* tarafından üretilen bazı bakteriyosinler Laktik asit bakterilerinkine benzer olsa da RiPP'ler (Sınıf I) için ana sınıflandırma şeması Arnison vd. (2013) tarafından oluşturulmuştur.



Şekil 6. Gram pozitif basil (URL-5)

Ribozomal olarak üretilmiş ve translasyon sonrası modifiye edilmiş peptitler (RiPP'ler) modifikasyon farklılıklarına göre bu sınıf yedi alt sınıfa ayrılmıştır. Alt sınıf 1, lantibiyotikler için tipik modifikasyonlara sahip peptitleri (örneğin lantionin) içerirken, alt sınıf 2-7, diğer benzersiz modifikasyonlara sahip peptitleri içerdiği bildirilmektedir (Arnison vd., 2013; McAuliffe vd., 2001). Alt sınıf 1: Lantipeptidler Lantipeptidler, farklı PTM'ler tarafından eklenen dehidroalanin/dehidrobütirin, lantionin/metil-lantionin kalıntıları gibi olağandışı amino asitleri içeren peptitlerdir (Arnison vd., 2013). Antimikrobiyal aktiviteye sahip lanthipeptidler, lanthipeptidlerin sınıflandırma şemasına göre (Knerr ve Van Der Donk, 2012) dört alt sınıfa ayrılabilen antibiyotikleri (McAuliffe vd., 2001) oluştururlar.

Sınıf I, II, III ve IV lantipeptidler arasındaki temel farklar, ilgili PTM enzimleridir. Sınıf I lantipeptidler, Post Translasyonel Modifikasyon (PTM) işlemini gerçekleştiren iki farklı enzim tarafından değiştirilir: dehidrataz LanB ve siklaz LanC, sınıf II peptitler ise LanM adı verilen iki işlevli bir lantiyonin veren enzim tarafından değiştirilir.

Ayrıca, LanM olarak adlandırılan tek bir modifiye edici enzim tarafından işlendiklerinden sınıf II lantipeptide ait olan iki peptitten oluşan iki bileşenli lantipeptidler de vardır (McClerren vd., 2006; Caetano vd., 2014). Diğer lantipeptidler için (sınıf III ve IV), dehidrasyon ve siklizasyon reaksiyonları, çok işlevli enzimler (RamC/LabKC veya LanL) tarafından katalize edilir veya burada daha fazla açıklanmayan önemli antibiyotik aktivitesinden yoksundurlar (Khusainov vd., 2015).

Alt sınıf 2 Baştan sona siklik peptitleri içermekte olup Baştan sona peptitler, birleştirici özellikleriyle adlandırılmaktadırlar. N- ve C-terminal amino asitlerinin doğrudan bağlanmasıyla peptit omurgalarının baştan kuyruğa daireselleşmesidir ve α -sarmal biçimde katlanarak iyi tanımlanmış üç boyutlu bir yapıyla sonuçlanır (Montalbán-López vd., 2012; Van Belkum vd., 2011). Bildiğimiz kadarıyla, bu peptitler lantionin içermez, β -metil-lantiyonin ve dehidrate kalıntılar, onları lantipeptidlerden açıkça ayırt edilebilir hale getirir (Gonzalez vd., 2000). Amilosikliklinin yakın zamanda *B. amyloliquefaciens* FZB42 tarafından üretildiği yeni bir dairesel bakteriyosin olarak tanımlandığı bildirilmiştir (Scholz vd., 2014). Amilosikliklin, *B. subtilis* gibi Gram-pozitif bakterileri inhibe etme yeteneğine sahiptir, ancak Gram-negatif bakterilere karşı etkili değildir.

Alt sınıf 3 Sactipeptidler, olup bir peptid bağımlı bir şekilde radikal Sadenosilmetionin (SAM) enzimleri tarafından katalize edilen olağandışı kükürt- α -karbon çapraz bağlarına sahip bir siklik antimikrobiyal peptit sınıfını oluşturur (Azevedo vd., 2015; Yang vd., 2013). Bir tiyolün antimikrobiyal biyoaktivitelerinden sorumlu bir amino asit kalıntısının α -karbonuna posttranslasyonel bağlantısı ribozomal sentezlenmiş peptitlerde nadirdir ve bağımsız bir grup olarak sınıflandırılırlar (Flühe vd., 2013; Flühe vd., 2012). Bu olağandışı bağlantılar, sülfür içeren lantionin köprülerinden β -karbon bağlantıları ile farklıdır.

Alt sınıf 4, doğrusal azol içeren peptitler (LAP'ler) olup enzimatik siklodehidrasyon ve dehidrojenasyon yoluyla serin/treonin ve sisteinden türetilen ayırt edici bir heterosiklik oksazol ve tiyazol halkasına sahip RiPP'lerin önemli bir alt grubunu oluşturur (Li vd., 1996). LAP ailesi, *B. amyloliquefaciens* ve *B.*

methylophilus tarafından üretilen plantazolicin A ve B önemli örnekleridir (Scholz vd., 2011; Banala vd., 2013).

Alt sınıf 5, Tiopeptidler veya tiyazolil peptitler, piperidin/piridin/dehidropiperidin merkezi olan ve ek tiazoller ve susuz amino asit kalıntıları içeren altı üyeli bir nitrojen makrosiklus ile ribozomal olmayan veya ribozomal düzenek yoluyla yüksek oranda modifiye edilmiş yapılardır (Arnison vd., 2013; Just-Baringo vd., 2014; Bowers vd., 2010).

Alt sınıf 6 Glikosinler olup, glikozillenmiş kalıntılara sahip bakteriyosinlerdir. Firmicutes'de glikosinler olarak adlandırılan bakteriyosinler çok çeşitli ve benzersiz glikopeptid yapısındadırlar (Arnison vd., 2013). *B. subtilis* tarafından üretilen, sistein22'ye bağlı bir β -S bağlantılı glikoz parçası ve iki disülfide sahip sublancin 168 model glikopeptid bakteriyosinlerdir (Stepper vd., 2011; Paik vd., 1998). Sublansin 168'in antimikrobiyal aktivite spektrumu, Gram-pozitif bakterileri inhibe eden, ancak Gram-negatif bakterileri inhibe etmeyen, lantibiyotiklerinkine benzerdir. Ayrıca hem bakteri sporlarının büyümesini hem de vejetatif hücre büyümesini inhibe etme yeteneğinde lantibiyotikler nisin ve subtilin'e benzer hareket eder (McAuliffe vd., 2001).

Alt sınıf 7 Kement/düğümü (Lasso) peptides olup bir RiPP sınıfını oluşturan peptitlerdir ve ilk olarak 1991'de tanımlanmıştır (Weber, 1991). Tanımlayıcı yapısal özelliği, C-terminali kuyruğu tarafından dişli bir N-terminali makrolaktam halkasıdır.

Sınıf II: modifiye edilmemiş bakteriyosinler, küçük (10 kDa'dan az), ribozomal olarak sentezlenmiş, ısıya dayanıklı, membran aktif lineer peptitleri içerir (Cotter vd., 2013; Le Marrec vd., 2000). Bu sınıf iki alt sınıfa ayrılabilir: 1. Pediosin benzeri peptitler; 2. Diğer modifiye edilmemiş peptitler şeklindedir.

Alt sınıf 1, Pediosin benzeri bakteriyosinler, bir YGNGVXC konsensüs motifine sahip antilisteriyal peptitlerdir (Kjos vd., 2011; Cui vd., 2012). *B. coagulans* I₄ tarafından üretilen koagulin ve pediosinler (AcH ve PA-1) örneklerdir (Le Marrec vd., 2000).

Alt sınıf 2: *B. licheniformis* tarafından üretilen likenin veya *B. cereus* tarafından üretilen cereinler gibi diğer değiştirilmemiş peptitlerdir, rapor edilen tam genom dizilerinde henüz saptanmamıştır (Abriouel vd., 2011). Özellikle holinler ve holin benzeri peptit BhIA, antimikrobiyal peptit LCI ve lidersiz bakteriyosin aureosin A53 olmak üzere BAGEL3 tarafından tespit edilen *Bacillus* sınıf II bakteriyosinlerinin bazı

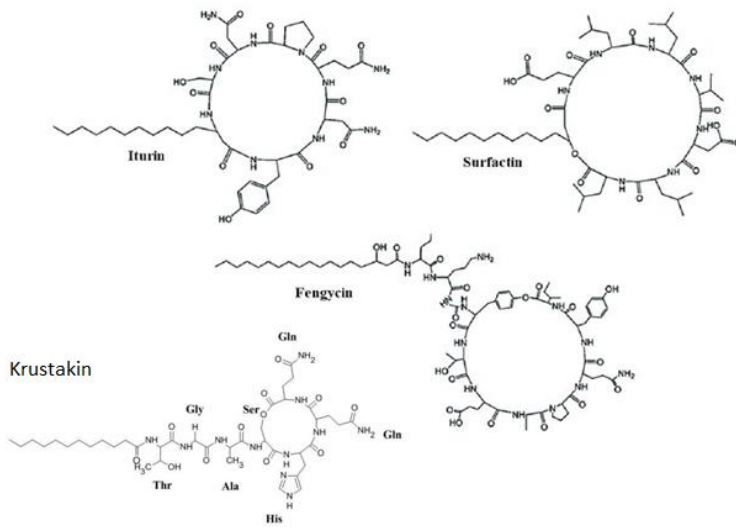
yeni üyelerini eklenmiştir. Holinler, faj parçacıklarının salınmasını kolaylaştırmak için bakteri zarının bozulmasında yer alan faj kodlu proteinlerdir. *Bacillus*'tan bakteriyosin ile ilişkili holin benzeri peptit BhIA, hücre zarlarını yok ederek Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) ve *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) dahil olmak üzere birçok Gram pozitif bakteriye karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Aunpad ve Panbangred, 2012).

Sınıf III grubu antimikrobiyal etkinlik büyük antimikrobiyal proteinler (10 kDa'dan büyük) olup *B. thuringiensis*, *B. cereus* ve *Bacillus* sp. BH072 tarafından oluşturulan kolikinler ve M23 peptidaz örnekleridir.

Ribozomal olmayan sentezlenmiş peptitler (NRP'ler) ve poliketidler (PK'ler): Bacillales takımı üyeleri sırasıyla ribozomal olmayan peptit sentetazlar (NRPS), poliketid sentetazlar (PKS) ve hibrit NRPS/PKS olarak bilinen kompleks enzimler tarafından üretilen çeşitli lineer, siklik ve dallı yapıları kapsar (Wang vd., 2014; Weissman, 2014). Önemli antimikrobiyal aktivite gösterirler (Aleti vd., 2015).

Lipopeptidler (LP'ler): Siklik veya lineer bir yapı oluşturmak üzere hidrofilik bir polipeptide bağlı hidrofobik uzun alkil zincirinden oluşan bakteri kökenli doğal bileşiklerdir (Baltz, 2014) *B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus*, *B. atrophaeus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis*, *B. pumilus*, *B. lehensis*, *B. laterosporus*, *Bacillus* spp., *Paenibacillus polymyxa*, *P. larvae*, *P. mucilaginosus*, *P. peoriae*, *P. bovis*, *P. terrae* ve *Paenibacillus* spp. türleri tarafından üretilen antifungal özellikleriyle bilinen LP'lerin ana üreticileri oldukları bildirilmektedir (Meena ve Kanwar, 2015; Cawoy vd., 2015). Surfaktin ailesi (surfaktin, likenisinler ve pumilasidinler ile örneklenmiştir) β hidroksi yağ asitleri ile bir lakton köprüsü oluşturan siklik bir heptapeptid içerir (Raaijmakers vd., 2010). Surfactin, birkaç *Bacillus* türü tarafından üretilen ve ilk kez 1969'da tanımlanan bir lipoheptapeptiddir (Kakinuma vd., 1969a). Surfaktinin peptit kısmı, NonRibozomal Peptid Sentetazlar adı verilen devasa multienzimatik proteinler kullanılarak sentezlenir. Bu mekanizma, surfaktin ailesinin üyelerinin peptit biyoçeşitliliğinden sorumludur. Yağ asidi tarafında on beş farklı izoform (C12'den C17'ye) dahil edilebilir, böylece surfaktin benzeri biyomoleküllerin sayısı artar. Surfaktinin (Şekil 7) dikkate değer fiziko-kimyasal özellikleri, çoğu durumda, membran bütünlüğünün bozulmasını veya bozulmasını içeren biyolojik aktivitelerinden de sorumludur (Kakinuma vd., 1969b). İturin grubu A, C, D ve E izoformları, basilomisin D, F ve L ve mikosubtilini içerir. Bütün bu bileşikler, β amino yağ asitleri (Pathak ve

Keharia, 2013; Zhao vd., 2014) ile açılmış bir siklik heptapeptid içerir (Şekil 7). Fengycin ailesi (Şekil 7), altıncı pozisyonda tek bir amino asitte farklılık gösteren dekaeptit fengycin A ve fengycin B'yi içerir (sırasıyla D alanin ve D-valin) (Malfanova vd., 2012). Kurstakinler (Şekil 7), yalnızca yağ asidi zincirlerinde farklılık gösteren dört kısmen siklik heptalipopeptitten oluşan başka bir LP ailesini oluşturur (Abderrahmani vd., 2011). *B. subtilis* 916 (Luo vd., 2015) tarafından üretilen bakteri ve virüslere karşı aktif bir siklik lipopeptit ailesi olan losilomisinler de (losilomisin A, B ve C türevleri), benzersiz bir peptit olmayan makrosiklik yapıdır.



Şekil 7. İturin, surfaktin, fengisinin ve krustakin yapıları.

Hepsi kısa bir siklik peptite bağlı bir lipid kuyruğundan oluşan ortak bir yapıyı paylaşır. Her gruptaki bileşiklerin türevleri, farklı amino asit bileşenlerinden gelir (Hamley, 2015; Béchet vd., 2012).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Sağlıklı arıların bağırsaklarından izole edilmiş olan *Bacillus* spp. suşları ve etkinlik testlerinde kullanılacak diğer mikroorganizmalar Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Biyoloji bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarının kültür koleksiyonundan; araştırmada kullanılan besiyerileri ve kimyasal maddeler ise ticari olarak tedarik edildi. Araştırmada; pH metre (HannaHI3220), pastör fırını (Nüve-FN-500), ısıtıcı blok (NoshengMS100), inkübatör (Memmert600), distile su cihazı (GFL-2108), çalkalayıcı (GFL-3005), otoklav (Nüve-OT-40L), vorteks (Heidolph-Reax top), soğutmalı santrifüj (Sigma, 2-16PK), etüv ve çeşitli cam (ayırma hunileri, mavi kapaklı şişeler, baget, tüpler, beher, lam, lamel, erlenmayer, mezür, pastör pipeti) ve plastik malzemeler (plastik pipetler, pipet uçları, pipet kutuları, petri kapları, falkom tüpleri, ependorf tüpleri, piset) kullanılmıştır.

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Araştırmada bakteri olarak *Bacillus* spp., *Escherichia coli* ATCC25922 (*E. coli*), *Klebsiella pneumonia* ATCC18883 (*K. pneumonia*), *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911(*Y. pseudotuberculosis*), *Staphylococcus aureus* ATCC25923(*S. aureus*), *Enterococcus faecalis* ATCC29212 (*E. faecalis*), *Listeria monocytogenes* ATCC 11994 (*L. monocytogenes*), *Bacillus cereus* ATCC43288 (*B. cereus*), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis*), *Mycobacterium smegmatis* ATCC607 (*M. smegmatis*), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa*), klinik suşlar olarak *Salmonella typhi* (*S. typhi*) ve *Lactobacillus kunkeei* (*L. kunkeei*), mantar olarak ise *Candida albicans* ATCC60193 (*C. albicans*) ve laboratuvar suşları *Penicillium* sp., *Fusarium oxysporum* (*F.oxysporum*), *Fusarium* sp. YP18B, *Rhizoctonia solani* (*R. solani*), *Sclerotinia sclerotiorum*(*S. sclerotiorum*), *Trichoderma harzianum*(*T. harzianum*) ve *Botrytis cinera* (*B. cinera*) kullanıldı.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri

Patates Dekstroz agar (PDA) besiyeri: 1 litre üretim için 20 gram (g) glikoz, 4 g patates infüzyonu, 15 g agar ve 1000 ml distile su kullanıldı. Litre başına 39 g hassas terazide tartıldı, distile suda çözüldü ve 20 dakika boyunca 121°C otoklav edilen besiyeri ortamı petrilere eşit şekilde paylaştırıldı.

De Man, Rogosa and Sharpe agar / broth (MRSA / B) besiyeri: 1 litre üretim için kazein bazlı pepton 10 g, et ekstresi 10 g, tween 80 1 gram, D(+) glikoz 20 g, dipotasyum fosfat (K_2HPO_4) 2 g, maya ekstresi 4 g, manganez sülfat ($MnSO_4$) 0,04 g, diamonyum hidrojen sitrat 2 g, sodyum asetat 5 g, magnezyum sülfat ($MgSO_4$) 0,2 g, agar 14 g ve 1000 ml distile su kullanıldı. Litre başına 68 g hassas terazide tartıldı, distile suda çözüldü ve 20 dakika boyunca 121°C otoklav edilen besiyeri ortamı petrilere eşit şekilde paylaştırıldı.

Hif patlatma deneyinde MRS Broth besiyeri modifiye edilerek karbon kaynağı olarak %2 fruktoz, %2 sükroz, %2 laktoz, %2 glikoz ve %1 nişasta ilave edilerek deneylerde kullanılmıştır.

Mueller Hinton agar/broth (MHA / B) besiyeri: 1 litre üretim için et ekstresi 2 g, kazein 17.5 g, nişasta 1.5 g, agar 17 gram ve 1000 ml distile su kullanıldı. Litre başına 27 g hassas terazide tartıldı, distile suda çözüldü ve 20 dakika boyunca 121°C otoklav edilen besiyeri ortamı petrilere eşit şekilde paylaştırıldı.

Brain-Heart Infusion agar/broth (BHIA / B) besiyeri: 1 litre üretim için beyin ekstraktı 12.5 g, kalp ekstraktı 5 g, pepton 10 g, sodyum klorid 5 g, glikoz 2 g, disodyum fosfat 2.5 g, agar 10 g ve 1000 ml distile su kullanıldı. Litre başına 52 g hassas terazide tartıldı, distile suda çözüldü ve 20 dakika boyunca 121°C otoklav edilen besiyeri ortamı petrilere eşit şekilde paylaştırıldı.

Nutrient Agar besiyeri: 1 litre üretim için et bazlı pepton 10 g, et ekstresi 10 g, sodyum klorid 5 g, agar 18 g ve 1000 ml distile su kullanıldı. Litre başına 20 g hassas terazide tartıldı, distile suda çözüldü ve 20 dakika boyunca 121°C otoklav edilen besiyeri ortamı petrilere eşit şekilde paylaştırıldı.

Eosin Methylene-Blue Lactose agar (EMB) besiyeri: 1 litre üretim için pepton 10 g, laktoz 10 g, K_2HPO_4 2 g, sarımsı eosin 0,4 g, metilen mavisi 0,065 g, agar 13,5 g ve 1000 ml distile su kullanılmıştır. Litre başına 36 g hassas terazide tartıldı, distile suda çözüldü ve 20 dakika boyunca 121°C otoklav edilen besiyeri ortamı petrilere eşit

şekilde paylaştırıldı.

MYPGP agar besiyeri: 1 litre üretim için maya ekstresi 15 g, Mueller Hinton Broth 10 g, K_2HPO_4 3 g, Sodyum pirüvat 1 g, glikoz 2 g, agar 20 g ve 1000 ml distile su kullanıldı. Belirtilen miktarlardaki maddeler hassas terazide tartıldı, distile suda çözüldü ve 20 dakika boyunca 121°C otoklav edilen besiyeri ortamı petrilere eşit şekilde paylaştırıldı.

MacConkey Agar besiyeri: 1 litre üretim için kazein bazlı pepton 17 g, et bazlı pepton 3 g, laktoz 10 g, safra tuzu 1.5 g, sodyum klorid 5 g, nötür kırmızı (neutral red) boyası 0.03 g, crystal violet 0.001 g, agar 13.5 g ve 1000 ml distile su kullanılmıştır. Litre başına 50 g hassas terazide tartıldı, distile suda çözüldü ve 20 dakika boyunca 121°C otoklav edilen besiyeri ortamı petrilere eşit şekilde paylaştırıldı.

Kanlı Agar besiyeri ve test yapılışı: 1 litre üretim için et bazlı pepton 10 g, et ekstresi 10 g, sodyum klorid 5 g, agar 18 g ve 1000 ml distile su kullanıldı. Litre başına 40 g hassas terazide tartıldı ve 20 dakika boyunca 121°C otoklav edildi. Ardından %5 oranında koyun kanı ilave edilip karıştırıldı ve eşit bir şekilde petrilere paylaştırıldı.

Sitrat besiyeri ve test yapılışı: Taze bakteri kültürlerinden öze yardımıyla sitrat besiyeri yüzeyine ekilip, 37°C'de 3-4 gün inkübeye edilir. İnkübasyon sonucunda yeşil olan sitrat besiyerinin renginin maviye dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi (Koneman vd., 1997).

Üreaz besiyeri ve test yapılışı: Üreaz enziminin varlığının belirlenmesi amacıyla üreaz besiyeri kullanıldı. İzolatların besiyerine ekimi yapıp, 30 °C'de 48–72 saat inkübe edildiğinde üreaz enzimi üretiliyorsa, ürenin amonyağa parçalanmasıyla alkali bir ortam oluşarak, besiyeri içerisindeki indikatör madde (fenol kırmızısı) aracılığı ile besiyerinin rengini koyu pembeye dönüşmesi pozitif olduğunu göstermektedir (Prescott ve Harley, 2002).

Jelatin besiyeri ve test yapılışı: Suşlardan alınan tek koloniler jelatin besiyerlerine 3-5 µL damlatılıp, 37 °C'de 3-4 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 1 saat buzdolabında bekletildi. Eğerki örnekler sıvı halde ise jelatinin hidroliz edildiği ve katılaşmadığı görüldü. Bu durum jelatin testi için pozitif kabul edilirken, tersi durum ise jelatinin katılaşması negatif olarak kabul edildi (Aygan, 2008).

DNase besiyeri ve test yapılışı: DNase enzim aktivitesi için suşlar DNase test besiyerine inkübe edildikten sonra besiyeri 1N Hidroklorik asit ile kaplandığında DNase pozitif olan kolonilerin etrafında berrak zonlar görülür (Smith vd., 1969).

Proteaz besiyeri ve test yapılışı: Suşların proteaz besiyerine ekimleri gerçekleştirip, 30 °C’de 48-72 saat inkübasyona tabi tutuldu. Petri etrafında açık zon oluşturan koloniler proteaz üretimi pozitif olarak kabul edildi (Carlisle ve Falkinham, 1989).

Lesitinaz besiyeri ve test yapılışı: Lesitinaz aktivitesi için lesitinaz besiyerlerine suşların ekimi yapıldı. Besiyerinde 37 °C’de yaklaşık 3-4 gün inkübe edilen kolonilerin etrafında lesitin hidrolizasyon sonucu oluşan zon ve opaklaşmalar lesitinaz üretimini pozitif olarak kabul edildi.

Selülaz besiyeri ve test yapılışı: Suşlar içerisinde %0.1 Karboksimetil selüloz (CMC) bulunan Luria Bertani (LB) agar (Trypton 10 g, maya ekstresi 5 g, sodyum klorid 10 g, agar agar 15 g, distile su 1000 mL) besiyerine çizgi şeklinde ekildi ve 37 °C’de 24-48 saat inkübe edildi. Petriler, yüzeyine % 0.1’lik kongo kırmızısı damlatıldı ve 15 dakika bekletildi. Sonra 1N’lik NaCl ile 15 dakika muamele edildi ve CMC’ye bağlanmamış boya ortamdan uzaklaştırıldığında, koloniler etrafında sarı hidroliz zonu oluşması, selülaz pozitif şeklinde değerlendirildi (Özcan, 1992).

Amilaz besiyeri ve test yapılışı: Amilaz besiyerine ekimleri yapılan suşlar 30 °C’de 24-48 saat inkübe edildikten sonra iyot solüsyonu petri yüzeyine damlatıldı. Kolonilerin etrafında beyaz zon oluşumu Amilaz pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 2004).

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Kristal viyole, safranin, lügol, aseton alkol, hidrojen peroksit (H_2O_2), oksidaz ayırıcı (tetrametil fenilendiamin dihidroklorid), karboksimetil selüloz (CMC), iyot solüsyonu, fenol kırmızısı, congo kırmızısı, sodyum klorür (NaCl), bromtimol mavisi, hidroklorik asit (HCl), tris EDTA, lizozim enzimi, TAE tamponu, TE tamponu, SDS, sodyum asetat, fenol, izoamilalkol, agaroz jel, etidyum bromür, RNaz, magnezyum klorür ($MgCl_2$), Taq DNA polimeraz enzimi, antibiyotikler (ampisilin, flukonazol, ceftazidim, amikasin, tetracycline, kloramfikenol, ciprofloksasin, eritromisin, penisilin, ampisilin, imipenem, nalidiksik asit, streptomisin, basitrasin, cefazolin, gentamisin, novobiyosin, vancomycin), hekzan, etanol, metanol, kloroform, etil asetat, H_2SO_4 -vanilin çözeltisi, $CDCl_3$ (döterokloroform).

2.2. Yöntem

2.2.1. *Bacillus* spp. Suşlarının Canlandırılması

Sağlıklı arılardan önceden saflaştırılan *Bacillus* spp. suşları (E38/3, L38/3-4A, E44/2A), Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerlerine ekimleri yapılarak ve 24-48 saat 37 °C’de inkübe edildi. E38/3’te tespit edilen iki farklı koloni, ayrı ayrı MHA ve PDA olmak üzere iki ayrı besiyerine tekrar pasajlandı. MHA’daki opak R tip koloni E38/3A, PDA’daki ortası şeffaf koloni E38/3C olarak isimlendirildi. Tek koloni alınarak MHB ve Patates Dekstrozu sıvı besiyerlerine pasajları yapıp, tekrar 37 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılarak diğer testler için kullanıma hazır hale getirildi.

Derin dondurucuda %20 gliserol stok kültür olarak stok edilen; *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis*, *K. pneumonia*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *S. typhi*, *L. kunkeei*, *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis* MHA besiyerinde, *M. smegmatis* ise BHIA besiyerinde 24-48 saat 37 °C’de inkübe edildi. Mantarlardan *C. albicans* PDA 48 saat 37 °C’de, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. ve *B. cinerea* PDA besiyerine 3-7 gün 28 °C’de inkübe edilerek canlandırıldı.

2.2.2. *Bacillus* spp. Suşlarının Geleneksel Karakterizasyonu ve Farklı Besiyeri Ortamlarında Üreme Durumlarının Belirlenmesi

Bacillus spp. suşlarının her birinden smear hazırlandı. Hazırlanan smeara kristal viole damlatılıp 1 dakika beklendi ve dH₂O ile yıkandı. Daha sonra lugol damlatılıp 1 dakika beklenildikten sonra Aseton-alkolle renk giderilinceye kadar yıkandı. Ardından renk kaybını önlemek için dH₂O ile yıkandı. Safraninle 30-60 saniye muamele edildi ve tekrar distile su ile yıkandı. Mor boyanan bakteriler Gram pozitif, pembe boyanan bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirildi (Claus, 1992).

Suşlardan tek kolonileri iğne öze ile alınarak, dik olarak hazırlanmış hareket besiyerine batırma kültürü yöntemiyle ekimleri yapıldı. Kültürler 37 °C’de 2-3 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra ekim çizgisi boyunca yayılma şeklinde gözlenen üremeyi hareket pozitif olarak, dikine doğru üremeyi ise negatif olarak değerlendirildi (Koneman vd., 1997).

Nutrient agara %10 oranında eritrosit süspansiyonu eklenerek kanlı agar hazırlandı ve *Bacillus* spp. kültürlerinden kanlı agara çizgi ekim yapılarak 48 saat 37 °C’de inkübe edilerek hemolitik aktiviteleri gözlemlendi. Farklı besiyeri ortamlarında üremelerinin belirlemek amacıyla PDA, PDB, MRS, EMB, MYPGP, MacConkey Agar’a ekimleri yapılarak 37 °C’de 2-3 gün inkübe edildi. Elde edilen üreme yoğunluğuna göre kültür için en uygun besi ortamları belirlendi.

MHB ve MRS sıvı besiyerlerinde 37 °C’de 2 gün boyunca çalkalamasız ortamda üreme profili ve polimer katman üretimi takip edildi. MRS sıvı besiyeri aynı zamanda sıcaklık testi için de kullanıldı.

2.2.3. *Bacillus* spp. Suşlarının Farklı Kültürel Koşullara Karşı Toleranslarının Belirlenmesi

Suşların şeker, tuz, pH ve sıcaklık toleranslarının belirlenmesi için MRS sıvı besiyeri kullanıldı. Tuz toleranslarının belirlenmesi için %5, 10, 12, 15 oranında, glikoz toleransı için %20, 30, 40, 50 oranında hazır besiyeri ortamına steril olarak solüsyon şeklinde ilave edilerek hazırlandı. Uygun pH aralığını belirlemek için MRS sıvı besiyeri pH3.0, 5.0 ve pH8.0 şeklinde ayrı ayrı hazırlandı. Sıcaklık toleransı için inkübasyon 15, 45 ve 55 °C’de inkübe edildi. Tuz, glikoz ve pH toleransını analiz edebilmek için hazırlanan özel test besiyerleri 3 ml şeklinde steril tüplere steril şartlarda tevzi edildi. Bir gecelik taze kültürün McFarland 0.5 bulanıklıktaki dilüsyonlarından 30 µl (1/10) ekim yapıldı ve 24-48 saat 37 °C’de 120 rpm çalkalamalı inkübatörde üremeleri sağlandı ve üreme yoğunluklarına göre farklı ortam koşullarına karşı toleransları değerlendirildi.

2.2.4. *Bacillus* spp. Suşlarının Biyokimyasal Karakterizasyonu

Bakterilerin, ürettikleri katalaz enzimi ile hidrojen peroksidi parçalayıp parçalamadıkları katalaz testi ile belirlenir. Lam üzerine %3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılıp, bir öze dolusu kültür ile karıştırıldı ve katalaz enziminin, hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayarak gaz kabarcıklarının meydana getirmesinin gözlenmesi testi pozitif olarak belirlendi (Koneman vd., 1997).

Oksidaz deneyi, oksidaz test ayırıcının bir miktar alınıp lam üzerindeki filtre kağıdına damlatıldı, bir öze dolusu kültür ile muamele edildi, kurutma kâğıdında

görülen mavi-mor renk oluşumu pozitif, renk değişiminin olmaması negatif olarak değerlendirildi (Koneman vd., 1997).

MRS sıvı besiyeri farklı pH da (pH 3.0, 5.0 ve 8.0) hazırlandı ve pH'nın etkinliğinin ölçümünde kullanıldı.

2.2.5. *Bacillus* spp. Suşlarının Antibiyogram Testi

Antibiyogram için suşlar MHA besiyerinde canlandırıldı ve sıvı besiyerinde her bir suşun McFarland: 0.5 bulanıklılıkta sulandırılmaları ayarlanarak steril eküvyon çubuğu yardımıyla taze hazırlanmış MHA petri yüzeyine yayıldı. Petri yüzeyine 2 cm aralıklarda antibiyotik diskleri yerleştirildikten sonra 18-24 saat 37 °C'de inkübe edildi ve zon çapları cetvel yardımıyla ölçüldü. İzolatların zon çapları NCCLS 2004 ve EUCAST 2016 profilindeki antibiyotiklerin standart zon çaplarıyla karşılaştırılarak dirençlilik ve duyarlılıkları belirlendi. Bu amaçla 16 farklı antibiyotik kullanıldı. Diskler ticari olarak temin edildi ve kullanılacağı süreye kadar -20 °C'de bekletildi (Wayne, 2004; EUCAST 2016).

2.2.6. Genomik DNA İzolasyonu

Suşların 8-16 saatlik sıvı kültürlerden alınan hücre pelletleri, steril su ile üç defa yıkanarak santrifüjle çöktürüldü ve her bir izolat steril ependorf içinde 1 ml apirojenik su ile süspanse edildi. Aşağıdaki işlemler sırasıyla yapılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi (Sambrook vd., 1989). Bakteri kültürleri 3-4 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. 500 µL TE tamponu (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH 8) pelletlere ilave edilerek çözüldü. Lizozim enziminden her bir tüpe 50 µL ilave edilerek vortekslendi. Tüpler 1 saat 37 °C'de bekletildikten sonra üzerine 50 µL %10'luk SDS eklenerek 5-6 defa yavaşça alt üst edilerek tekrar 37 °C'de 30 dakika bekletildi. Her tüpe 3 M'lık 1/10 hacimde sodyum asetat (NaAc, pH 5.2) eklendi ve 65 °C'de 10 dakika beklenerek her 10 dakikada bir alt üst edildi. Ependorf tüpe 500 µL fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Tüplerin üst sıvı kısım yeni ependorf tüplerine aktarılarak üzerine tekrar 500 µL kloroform ilave edildi ve tüpler alt-üst edilerek 13000 rpm'de 5 dakika tekrar santrifüj edildi ve bu işlem iki kez tekrar edildi.

Üstte kalan sıvı kısım temiz tüplere aktarıldı. Böylece kloroform işlemi üç defa tekrarlandı. Bu tüplere 1/10 hacim sodyum asetat ve 2 hacim (yaklaşık 900 µL) %96'lık soğuk EtOH (etil alkol) ilave edilerek -20 °C'de 45 dakika bekletildi. Tüpler 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvılar atıldı. Ependorf dibindeki pelletlerin üzerine 500 µL %70'lik soğuk EtOH ilave edilerek tekrar 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra alkol nazıkçe alındı. Pelletler 37 °C'de alkol tamamen uçtuktan sonra 75 µL TE tamponu ilave edilerek 4 °C'de kendiliğinden çözünmesi beklendikten sonra agaroz jelde kontrol ile birlikte yürütüldü.

2.2.7. 16S rRNA Geninin PZR ile Çoğaltılması

16S rRNA gen bölgeleri, universal (27F 5P-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3P ve 1492R 5P-GGTTACCTTGTTACGACTT-3P) primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı (Suzuki ve Giovannoni, 1996). PZR reaksiyonu toplam 50 µL hacimde gerçekleştirildi. PZR reaksiyon şartları; 1µL kalıp DNA, 5 µL 10X PCR tamponu, 1.5 mM MgCl₂, 1U *Taq* DNA Polimeraz, 0,3 pmol/µL Forward primeri ve 0,3 pmol/µL Reverse primeri, 200 mM dNTP mix hazırlandı ve bu karışımı steril saf su ile 50 µL'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi Termal döngü cihazında, ilk denetürasyon basamağı 94 °C'de 3 dk., daha sonra 35 döngü denatürasyonda 94 °C'de 45 sn., primer bağlanma sıcaklığında 45 sn, uzama basamağında 72 °C'de 2.5 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. PZR döngüsü ise Son uzama basamağı ise 72 °C'de 7 dk olarak ayarlanmış ve PZR ürünleri 4 °C'de korunmuştur.

2.2.8. DNA'ların Agaroz Jel'de Yürütülmesi

Genomik DNA ve PZR ürününün yürütülmesi işlemi için %1'lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz jelin mikrodalga fırınında çözünmesi sağlandı. Agaroz jel çıkarıldıktan sonra 50 °C'ye kadar soğutulunca içerisine 0,5 µL etidyum bromür (0,5 µg/mL) ilave edildi ve homojen şekilde karışması sağlandı. Agaroz jel donduktan sonra jel tırağı dikkatlice çıkarıldı. Agaroz jel elektroforez tankının içerisine düzgünce yerleştirilerek üzerini kaplayacak şekilde 1X TAE tamponu ilave edildi. Her bir izolatin DNA solüsyonundan 7 µL alındı ve 3 µL 10X yürütme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 100 V'luk elektrik alanda 25 dakika yürütüldü. İzolatlardan elde

edilen genomik DNA'lar UV ışığı altında görüntülendi. İzolatların DNA bantları agaroz jel üzerinde görüldükten sonra DNA solüsyonları üzerine 3 µL RNAaz ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat bekletildi. Daha sonra DNA'lar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

2.2.9. Suşların Süpernatantlarının ve Etil Asetat Ekstraktlarının Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivite Testleri

Agar Kuyucuk Diffüzyon metodu: Bakteri örneklerinin süpernatantlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde agar kuyucuk difüzyon metodu kullanıldı. Test edilecek bakterilerin taze kültürleri uygun besiyerleri (MHB, MRSB, PDB, MYPGPB) içinde hazırlandı. Deney esnasında yaklaşık olarak McFarland 0.5 bulanıklılıkta ya da 1×10^6 kob/ml (koloni oluşturan birim=colony forming unit) şeklinde dilüsyonları yine uygun besiyerlerinde hazırlandı. Bakteriler için MHA, BHIA ve MRSA, maya mantarları için PDA besiyeri üzerine steril eküvyon çubuğu yardımıyla kültürlerin yayma ekimleri yapıldı. Maya mantarları için McFarland 2 ya da 1×10^7 kob/ml mikroorganizma içeren dilüsyonları hazırlandı. Besiyerleri üzerinde steril cam boru yardımıyla 5 mm çapında kuyucuklar açıldı. Her kuyucuğa çözeltilerden 50 µl damlatıldı. Bakteri petrileri 24 saat, *M. smegmatis*, Laktobasil ve mayaları ihtiva eden petriler 48-72 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçüldü. Standart kontrol olarak Ampisilin (10 µg), streptomisin (10 µg) ve flukonazol (5 µg) kullanıldı.

Minimal İnhibisyon Konsantrasyon Testi (MİK): Antimikrobiyal aktivite gösteren en az madde miktarının belirlenmesi, başka bir deyişle kantitatif etki değerinin belirlenmesi için sıvı besiyerinde mikro dilüsyon sıvı yöntemi uygulandı ve MİK değeri mikrogram-mililitre (µg/ml) şeklinde belirlendi. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için Mueller-Hinton sıvı (MHB, pH.7.3) (Difco, Detroit, MI) ve antifungal aktivite belirlemek için PDB (Difco, Detroit, MI) sıvı besiyerleri kullanıldı. Mikrodilüsyon test için ELISA plakaları kullanıldı ve çözünmüş kimyasalların 0.1 ml'si, sıvı besiyerleri ile seri sulandırımı yapıldı. McFarland 0.5 bulanıklılığında (1×10^8 kob/ml) sulandırım hazırlanıp 1:10 sulandırıldı ve her bir kuyucuğa 5 µL mikroorganizma (5×10^4 kob/kuyucuk) damlatıldı. Plakalar 37 °C'de 24-48 saat süre ile etüvde bekletildi. MİK değeri, mikroorganizmanın üremesi engelleyen en düşük madde konsantrasyonu olarak belirlendi. Standart kontrol olarak bakteriler için Ampisilin (10µg), mayalar için

flukonazol (5 µg) kullanıldı.

Misel Gelişiminin Engellenmesi Deneyi: Küf mantarlarında sentezlenen bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin ölçümü için “Misel Gelişiminin Engellenmesi Deneyi” yapılmıştır. Bu metod agar difüzyon metodunun küf mantarları (patojen ve saprofit) için modifikasyonudur. Küf mantarları, önceden (7-10 gün) PDA besiyeri üzerinde taze kültürleri hazırlandı. Kültürlerden 6 mm çaplı diskler şeklinde steril cam boru yardımıyla kesildi ve test edilecek PDA agar besiyeri üzerine yerleştirildi ve 28 °C’de 3-7 gün kültürleri yapıldı.

Kültür filtratları ve ekstraktların misel gelişimi üzerine olan etkinliği için Patates Dekstroz agar besiyeri ilaveli plaklar hazırlandı. Aynı zamanda Eliza plakaları da (6 kuyucuklu) bu amaçla kullanıldı. Bu amaçla PDA besiyeri otoklavdan çıkarılarak 45 °C’ye soğutuldu ve içine kimyasalın test edilecek konsantrasyonları ilave edilerek karıştırıldı, daha sonra steril petri plaklarına yayıldı. Antimikrobiyal madde içeren PDA besiyeri donduktan sonra 6 mm çaplı tüp yardımıyla blok kesilerek çıkarıldı, yerine bir hafta önce kültür yapılan küf mantarlarının miselli kısımlarından yine aynı yöntemle kesilmiş olan bloklar yerleştirildi. Antimikrobiyal madde ve kültür blok içeren plaklar 28 °C’de 3 gün etüvde bekletildi. Eş zamanlı olarak antimikrobiyal madde içermeyen kontrol plaklar da hazırlandı. Kontrol plaktaki blok kültürün misel yayılımı ile antimikrobiyal plaktaki kültürün misel yayılımı karşılaştırılarak misel önleme test sonuçları belirlendi. Standart kontrol için flukonazol ve çözücü kullanıldı.

2.2.10. Biyoaktif Metabolitin Ekstraksiyonu İçin Uygun Çözücünün Belirlenmesi

MRS Broth gibi çeşitli besiyerlerinde üreyen *Bacillus* spp. suşlarının her biri 10.000 rpm’de santrifüjlendi ve lizat elde edildi. Lizatlar sırasıyla hekzan, etil asetat ve kloroform ekstratları elde etmek için 1:1 oranında karıştırıldı, 3 gün boyunca 80 rpm’de çalkalanarak ekstre edildi. Ekstraksiyon verimini ölçebilmek adına, mevcut ekstratlar *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* gibi bir dizi mikroorganizmalara karşı agar kuyucuk yöntemi uygulanarak test edildi. Kültürler uygun şartlarda inkübe edilerek inhibisyon zon çapları belirlendi.

Ekstraktın Kitlesel Üretimi: Büyük ölçekli ekstre üretimi için 50-250 ml arasında değişen miktarlarda çeşitli besiyerlerinde (MYPGP ve MRSB) uygun şartlarda taze *Bacillus* spp. kültürlerinden 1/100 oranında ilave edilerek 37 °C’de 120 rpm’de

çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Bakteri kültürleri 24-48 saat sonra 10 000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Daha sonra süpernatant alınarak 1:1(v/v) oranda etil asetat ile karıştırılarak 1-3 gece ekstraksiyona bırakıldı. Daha sonra ekstrakt kısmı alınarak temiz mavi kapaklı şişelere aktarıldı ve kullanılacağı süreye kadar 4 °C'de buzdolabında bekletildi.

Etil asetat ekstresinde madde miktarlarının belirlenmesi için her seferinde üretilen kültür ekstraktları 2'şer ml şeklinde her suş için darası alınmış 2 ependorf tüp içine alındı ve 55 °C'de kurutmaya bırakıldı. Kurutulduktan sonra tartımları yapılarak kuru ağırlık cinsinden madde miktarları belirlendi. Daha sonra örnekler etil asetat (500-1000 µl) etil asetatla çözüldü ve deneyler için kullanıldı.

Etil asetat ekstraksiyonundan sonra ekstraktlarda 3 faz gözlemlendi (Yüzeyden dibe doğru: etil asetatlı şeffaf faz, ara faz, besiyeri kısmı). İçinde madde bulunan etil asetat fazı, ağırlıkları önceden tartılmış olan ependorflara transfer edildi. Madde miktarının hesaplanması için ependorfların/falconların boş ağırlıkları belirlendi, etil asetatlı faz 55 °C'de 2 gece uçurulduktan sonra alınan ölçümlerden boş ağırlıklar arasındaki fark alınarak madde miktarları belirlendi.

Bakteri suşlarının en uygun ekstrakt üretim sürelerinin belirlenmesi: Bu çalışma optimum ekstrakt miktarı üretim süresinin belirlenmesi için yapıldı. Sıvı besiyerinde bir gecelik taze kültürden *Bacillus* spp. suşlarının MacFarlant 0.5 bulanıklılıkta solüsyon hazırlandı, 10 ml MRS Broth besiyerine 200 µl pasaj yapıldı ve 8 saat 120 rpm'de 37 °C'de kültür edildi. Kültürlerden (8 saatlik) santrifüj ile alınan pelletler iki seri ve süpernatant tek seri olmak üzere ependorflara toplandı. Pelletlerin bir serisi DNA izolasyonu için kullanıldı. Kalanlar taze kültürde stok kültürler hazırlandı ve -20 °C'de saklandı. Kalan kültür 24 saat ve 48 saat sonra örnek alınarak santrifüjlendikten sonra pelletler toplandı kuru ağırlıkları belirlendi. Bu kültürlerde tortu oluşumu 48 saatte daha yoğun olduğu için ekstaksiyon işleminde bu süre baz alındı ve daha sonraki uygulamalarda kullanıldı. Elde edilen süpernatantlar ve kültürler çeşitli aşamalarda kullanıldı.

2.2.11. Biyoaktif Metabolitlerin Kısmi Saflaştırılması ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Kitlesel üretilen *Bacillus* spp. suşları etil asetat (100 mL x 3) ile ekstre edildi. Çözücü evaporatörde düşük basınç altında uçurularak ham ekstre (5 g) elde edildi. Ham

karışım (4.0 g) kolon kromatografisi (silikajel-60, 320-400 mesh) ile artan polariteye göre n-hekzan (100 mL), n-hekzan:etilasetat (50:0, 0:50), etilasetat:metanol (45:5, 40:10, 35:15), etilasetat:metanol: su (35:15:0,5, 35:15:1, 35:15:2, 35:15:3, 35:15:4, 35:15:5) çözücü sistemleriyle elue edildi ve 15 fraksiyon (50 mL , herbiri) toplandı. Fraksiyonların İTK analizleri sonrasında 3-5 (328 mg) karıştırıldı. İTK analizi sonrasında 8 (40 mg) ve 9 (159 mg) nolu fraksiyonlar saf olup NMR spektrumları alındı ve 8 nolu fraksiyon 1 nolu bileşiği ve 9 nolu fraksiyondanda 2 nolu bileşik karakterize edildi. 3-5 Nolu fraksiyon karışımı (328 mg) tekrar kolon kromatografisi ile n-hekzan:etilasetat, (50:0, 45:5, 43:7, 40:10, 38:12, 36:14, 35: 15, 32:18, 30:20, 28:22, 26:24, 24:26, 20:30, 18:32, 15:35, 13:37, 10:40, 5:45, 0:50) çözücü sistemiyle elue edildi ve 30 fraksiyon (50 mL, herbiri) toplandı. Fraksiyonların İTK analizleri sonrasında 8 nolu fraksiyon 3 nolu bileşiği (32 mg) ve 13-14 nolu fraksiyon karışımı da 4 nolu bileşiği (45 mg) verdi. İTK plakalarını görüntülemek için 254 nm'lik UV lambası kullanıldı. UV aktif olmayan bileşiklerin görüntülenmesinde ise İTK plakasına H₂SO₄-vanilin çözeltisi ve devamında sıcak plaka üzerinde yakma işlemi uygulandı. Saf olduğu düşünülen fraksiyonların NMR spektrumları CDCl₃ veya CD₃OD çözücüsü kullanılarak alındı.

Antimikrobiyal aktivite testi için saflaştırılan 4 madde, agar kuyucuk difüzyon metodu ile bazı bakterilere (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. pyogenes*) ve maya mantarlarına (*C. albicans*, *S. cerevisiae*) karşı test edildi.

2.2.12. Suşların Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmada MRSB besiyerinde 37 °C'de 48 saat 120 rpm çalkalamalı inkübasyon şartlarında üretilen suşların lizatlarında antioksidan madde bakıldı. Kültür üreme süresini tamamladıktan sonra 10.000 rpm'de kültür santrifüj edildi ve hücre kısmı atılarak super natant kısmı antioksidan aktivite için değerlendirildi. Aktivite bakılacağı süreye kadar örnekler 4 °C'de muhafaza edildi.

Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC): Metod, bakır(II)-neokuproin kompleksinin ortama antioksidan çözeltisi ilave edilmesi sonucunda bakır(I)-neokuproine indirgenmesi esasına dayanır (Apak vd., 2004). Deney tüpü içerisine, 10 mM Cu (II) klorür, 7,5 mM neokuproin ve 1 M, pH sı 7,0 Amonyum asetat tamponu çözeltilerinin herbirinden 1 er mL pipetlendi. Her bir maddenin

  zeltisinden kendi deney tüpüne 5  L ilave edildi ve vortekslendi. Son hacmi 4.1 mL ye tamamlamak için 1,095 mL saf su ilave edildi ve tekrar vorteklendi. Aynı işlemler Trolox[ ] standardı içinde gerçekleştirildi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 50 dakika inkübasyona bırakılan deney tüplerinin absorbans 450 nm de ölçüldü ve standart Trolox eğrisinden her bir madde için mg madde başına d  en mg trolox e de eri antioksidan kapasite (mg TEAC/mg madde) olarak hesaplandı.

2.2.13. E44/2A Su unun SEM Görüntü Analizi

Bakteri morfolojisi, spor yapısı ve ürettiği makro metabolitlerinin g rselli inin sağlanması amacıyla kullanıldı. E44/2A su u MHA besiyerinde üretildi 48 saatlik kültür hazırlandı ve McFarland 0.5 bulanıklılıkta ve   dilüsyonları yapıldı. SEM diski üzerine her iki hücre süspansiyonundan diskin iki ayrı yanına 10  l damlatılarak oda ısısında kurutuldu.

Kültür yüzeyinde oluşan tortu katmanından da aynı şekilde su içinde suspansiyon hazırlandı ve iki ayrı dilüsyonda diskin iki ayrı yanına 10  l damlatılarak oda ısısında kurutuldu. Her iki disk önce altın ile kaplandı ve SEM mikroskopta görünümleri foto raflandı.

3. BULGULAR

3.1. *Bacillus* spp. Suşlarının Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan *Bacillus* örnekleri 2018 yılında TAGEM projesi kapsamında yapılan bir çalışmada izole edilen *Bacillus* spp. suşlarıdır. Çalışmada seçilen 4 adet suşun temel olarak güçlü antifungal aktivite göstermiş olmalarıdır. Sağlıklı, herhangi bir bakteriyel, viral ya da paraziter hastalık etmeni taşımayan arılıktan alınan ergin arı örneklerinden E38/3A ile C ve larvalarından L38/3-4A izolatları kültürel yöntemlerle izole edilmiştir. E44/2A örneği ise Varroa tespit edilmiş ergin arıdan izole edilmiştir. Bu örneklerin izole edildikleri kültür ortamında küf mantarlarına karşı anti-fungal aktivite içerdiği gözlenmesinden dolayı incelmeye değer bulunmuş, suşların karakterize edilmesine, antimikrobiyal etkinliğin belirlenmesine ve etken maddelerin saflaştırılması amaçlanmış olup bu çalışma dizayn edilmiştir.

Suşların gleneksel tür tanıları, MYPG agar besiyerinde koloni (R tipi) morfolojileri (Şekil 8), Gram boyalı preparatlarda mikroskopik özellikleri incelendi (Şekil 9). Suşların üreme özelliklerine bakıldığında 8-10 saatlik kültürlerin Gram negatif santral yada subterminal sporlu basil olarak gözlenmiş olmaları, katı agar ortamında hafif mukoid; sıvı besiyerinde çalkalamasız ortamda yüzeyde kitle üretebilmeleri dikkat çekici özellikleri olarak gözlenmiştir.

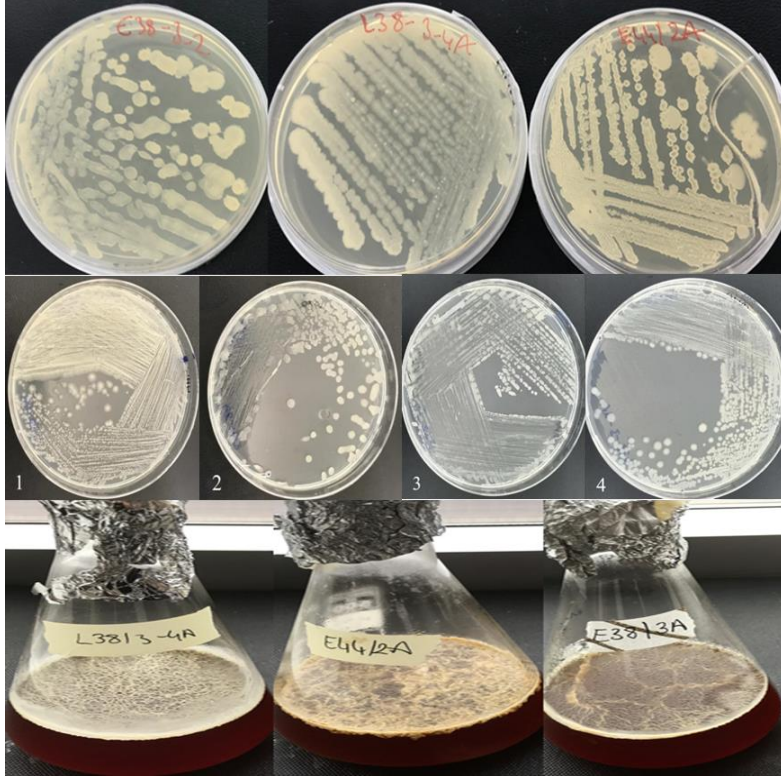
Sağlıklı arılardan izole edilmiş *Bacillus* spp. suşlarının (E38/3, L38/3-4A, E44/2A) gram boyaması, hareket testi ve farklı besiyerlerinde üreme özellikleri belirlenerek karakterizasyon çalışmaları yapıldı. MacConkey ve EMB agarda ürememesi bu suşların gram pozitif olduklarını göstermektedir. Kanlı besiyerinde L38/3-4A α -hemoliz, E38/3 ve E44/2A'nın ise β -hemoliz zonları oluşturduğu gözlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. *Bacillus* spp. suşlarının bazı karakterizasyon testleri

Suş No	Gram/ Spor	Hareket	PDA	PDB/ MRSB	MHB	MRSA	EMB	Mac Conkey	MYPGPB	Hemoliz
E38/3A	+ /Tr.	±	+	3+	3+	+	±	-	2+	β
E38/3C	+ /Tr.	2+	+	3+	3+	+	±	-	2+	β
L38/3-4A	+ /Tr.	±	+	3+	3+	+	±	-	2+	α
E44/2A	+ / STr.	2+	+	4+	4+	+	±	-	2+	β

Tr: Terminal spor, STr: Subterminal spor

E38/3A suşunun saf kültür olmadığı tespit edilmiş ve sonrasında bu suş, iki ayrı izolata ayrılarak (E38/3A, E38/3C) MHA besiyerinde canlandırma işlemi tekrar yapılarak saflaştırılmıştır (Şekil 8).



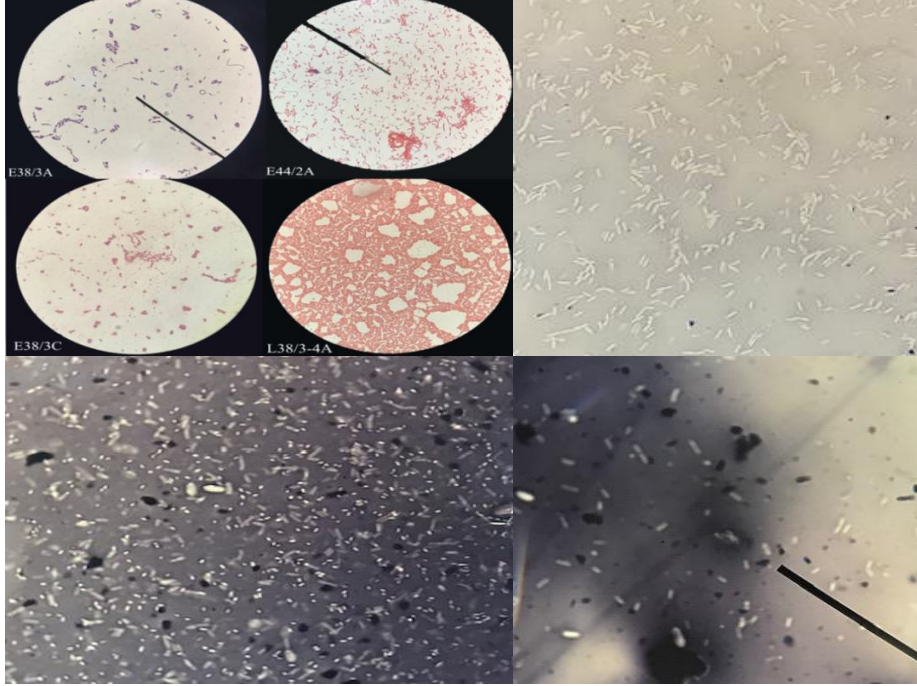
Şekil 8. *Bacillus* spp. izolatlarının sırasıyla MYPGPA, MHA ve MRSB besiyerlerindeki üremelerinden görünüşleri (1: E38/3A, 2: E44/2A, 3: E38/3C, 4: L38/3-4A)

Suşların MHA besiyerindeki kolonileri, 1 gece 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde büyütülmek üzere 5 ml MHB ve MRS Broth besiyerlerinde üreme profilleri değerlendirildi. İzolatların tamamı sıvı besiyerlerinde yoğun polimer katman üretti. En yoğun katman E44/2A suşunun MRS Broth kültüründe gözlemlendi (Tablo 2).

Tablo 2. Suşların MHB ve MRS sıvı besiyerlerinde üreme ve polimer üretim özellikleri

	MHB		MRS	
	Polimer katman	Dipte üreme	Polimer katman	Dipte üreme
E38/3A	2+	-	2+	4+
E38/3C	2+	±	+	+
L38/3-4A	2+	+	±	4+
E44/2A	2+	±	4+	2+

Gram boyama sonucuna göre E38/3A suşu, Gram (+), çok kısa çomak halinde ve terminal sporlu; E38/3C Gram (+), çok kısa çomak halinde, terminal sporlu; E44/2A Gram (+), uzun çomaklar, subterminal- terminal sporlu ve L38/3-4A suşu ise terminal sporlu normal boyutta çomaklar halinde gözlemlendi (Şekil 9).

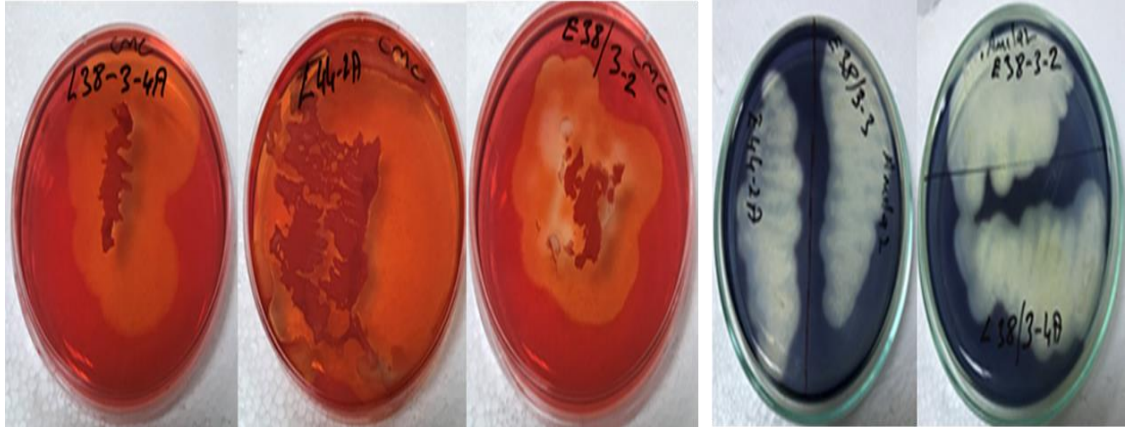


Şekil 9. *Bacillus* spp. suşlarının Gram ve Nigrosin boyamada bakteri ve spor görünümü

Bacillus spp. suşlarının kromojenik teknikler ile yapılan enzim çalışmalarında bir dizi enzim aktiviteleri taşıdıkları belirlendi. Suşların özellikle tümünün güçlü amilaz, üçünün güçlü selüloz aktivitelerinin varlığı belirlendi. Ayrıca lesitinaz, proteaz ve DNase aktiviteleri önemli olduğu gözlemlendi (Tablo 3 ve Şekil 10). Üreaz ve sitrat besiyerlerinde enzim faaliyeti görülmezken, tüm suşlarda katalaz pozitif, oksidaz ise E44/2A suşu zayıf pozitif olmakla birlikte diğer suşlarda güçlü pozitif aktivite gözlemlendi.

Tablo 3. İzolatların bazı enzim üretme yeteneklerinin belirlenmesi

	Sitrat	Jelatin	Üreaz	Selüloz	Lesitinaz	Amilaz	Proteaz	DNase
E38/3A	-	+	-	3+	+	3+	+	+
E38/3C	-	+	-	3+	+	3+	+	+
L38/3-4A	-	-	-	3+	+	3+	+	+
E44/2A	-	2+	-	+	2+	3+	2+	+



Şekil 10. *Bacillus* spp. suşlarının karboksi metil selüloz ve amilaz aktiviteleri

3.2. *Bacillus* spp. Suşlarının Farklı Kültür Koşullarında Üreme Özellikleri

MRS Broth besiyerinde üretilen kültürlerin özel test besiyerlerinde üreyebilme yetenekleri, 15-45 ve 55 °C sıcaklıkları arasında test edildi, en ideal sıcaklık ~45 °C olarak belirlendi. E38/3C ve E44/2A suşlarının 15-55°C sıcaklık değerlerinde az da olsa üreyebildikleri tespit edildi.

pH 3.0, 5.0 ve 8.0 aralıklarına bakıldığında ise uygun değer $\sim$ pH 8.0 olduğu gözlemlendi. Bu pH değerinde E38/3C suşunun yoğun polimer ürettiği belirlendi (Tablo 4).

Tablo 4. Suşların sıcaklık ve pH değişimlerine karşı toleransları

	Farklı sıcaklıklarda üreme			Farklı pH'da üreme özelliği		
	15 °C	45 °C	55 °C	pH 3.0	pH 5.0	pH 8.0
E38/3A	-	+	-	-	-	Polimer ve (+)
E38/3C	±	2+	±	-	-	Polimer ve (3+)
L38/3-4A	±	2+	-	-	-	Polimer ve (±)
E44/2A	±	2+	±	-	-	Polimer ve (+)

Suşların biyokimyasal aktiviteleri geleneksel yöntemlere göre yapıldı. Suşların yüksek şeker ve tuz toleransına sahip oldukları, %5, 8, 10, 12 ve 15 tuz oranlarına sahip besiyerlerden %5 tuz oranına sahip MRS sıvı besiyerinde, %20, 30, 40 ve 50 glikoz içeren besiyerlerden ise %20 glikoz oranına sahip MRS sıvı besiyerinde maksimum üreme gerçekleşti. %12 tuz ve %30 glikoz oranına direnç gösteren tek suş L38/3-4A oldu (Tablo 5).

Tablo 5. Suşların farklı tuz ve şeker konsantrasyonlarında üreme yetenekleri

	Tuz Konsantrasyonu					Glikoz Konsantrasyonu			
	%5	%8	%10	%12	%15	%20	%30	%40	%50
E38/3A	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	Hafif diffüz üreme	(-)	(-)	(-)
E38/3C	(+)	(+)	(±)	(-)	(-)	Diffüz üreme	(-)	(-)	(-)
L38/3-4A	(2+)	(+)	(±)	(±)	(-)	Dipte üreme	(+)	(-)	(-)
E44/2A	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	Diffüz üreme	(-)	(-)	(-)

3.3. *Bacillus* spp. Suşlarının Antibiyogram Testi

Test edilen antibiyotiklerin etkinlik zon çapları NCCLS 2004 ve EUCAST 2016 profillerine göre değerlendirildi (Tablo 6). Ölçülen zon çaplarına bakıldığında tüm suşların Basitrasine karşı dirençli oldukları belirlendi. E38/3A suşu en yüksek direnci Ciprofloksasin, Novobiyosin, İmipenem ve Nalidiksik asite karşı gösterdi.

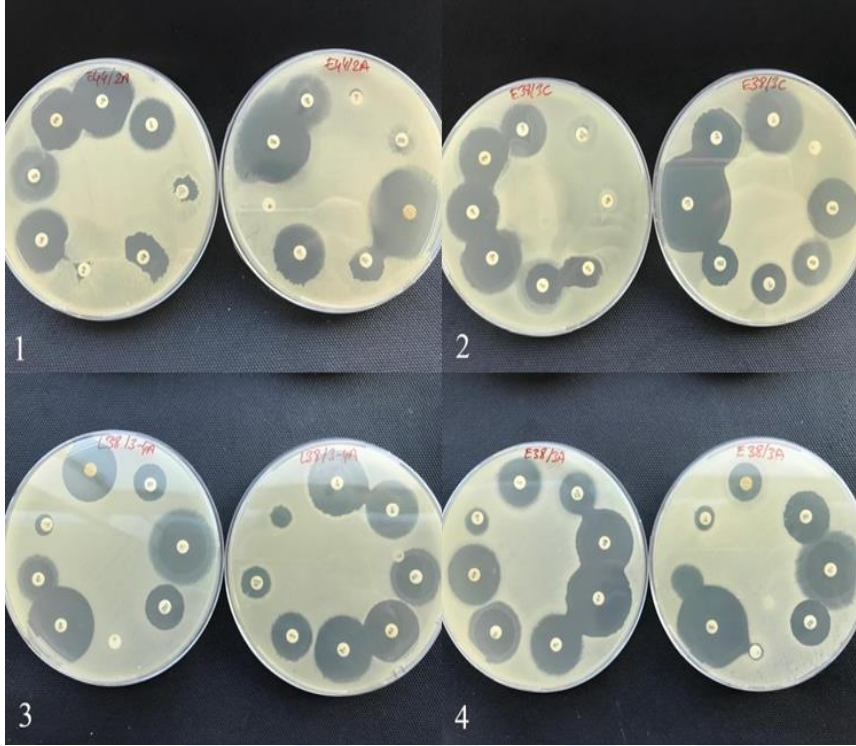
E38/3C suşu Ampisilin, Seftazidim, Gentamisin ve Penisilin'e karşı direnç sergiledi. L38/3-4A suşu Novobiyosin, Ampisilin, Nalidiksik asit ve Seftazidim'e; E44/2A suşu ise Novobiyosin, Penisilin, Ampisilin, Gentamisin, Nalidiksik asit, Vankomisin ve Seftazidim'e karşı gösterdi (Şekil 11).

Tüm suşların duyarlı oldukları antibiyotikler ise; birinci kuşak sefalosporin olan Sefazolin, Tetrasiklin, Kloramfenikol, ve Streptomisin olduğu belirlendi (Tablo 6).

Tablo 6. Test edilen antibiyotiklerin isimleri, kısaltmaları, doz içerikleri, dahil oldukları antibiyotik grupları ve etkinlik zon çapları (NCCLSI 2004; EUCAST 2016)

Antibiyotik Grubu	Antibiyotik Adı ve Kısaltması	Dozu μ g	Zon çapları (mm)			<i>Bacillus</i> spp. suşları			
			R	I	S	E38/3A	E38/3C	L38/3-4A	E44/2A
Penisilinler	Penisilin	10	≤ 14	-	≥ 15	35	13 (R)	30	10 (R)
	Ampisilin	10	≤ 16	-	≥ 17	30	0 (R)	10 (R)	12/25 (R)
Sefalosporin									
1. Kuşak	Sefazolin	30	≤ 14	15-17	≥ 18	36	24	34	25/35
3. Kuşak	Seftazidim	10	≤ 14	15-17	≥ 18	18	0 (R)	13 (R)	10 (R)
Makrolid	Eritromisin	15	≤ 13	14-22	≥ 23	22 (I)	16 (I)	20 (I)	21 (I)
Tetrasiklin	Tetrasiklin	30	≤ 14	15-18	≥ 19	28	22	26	26
	Kloramfenikol	30	≤ 12	13-17	≥ 18	26	25	25	26
Florokinolon	Siprofloksasin	5	≤ 15	16-20	≥ 21	8 (R)	26	29	30
Aminoglikozit	Gentamisin	10	≤ 12	13-14	≥ 15	16	0/17 (R)	15/18	0/22 (R)
	Streptomisin	300	≤ 11	12-14	≥ 15	25/34	15/26	25/29	15/24
	Amikasin	30	≤ 14	15-16	≥ 17	20/29	10/22 (R)	19/20	10/14 (R)
Nalidiksik asit		30	-	-	≥ 23	22 (R)	25	16 (R)	10/14 (R)
Novobiyosin		5	-	-	≥ 16	10 (R)	17	10 (R)	0 (R)
İmipenem		10	≤ 19	20-22	≥ 23	16 (R)	45	28	20/35
Basitrasin		10	≤ 8	9-12	≥ 13	0 (R)	0 (R)	0(R)	0 (R)
Vancomycin		30	≤ 14	15-16	≥ 17	20	18	19	0/11(R)

R: Dirençli, I: Orta duyarlı, S: Duyarlı



Şekil 11. Suşların bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları (1; E44/2A, 2; E38/3C, 3; L38/3-4A, 4; E38/3A).

3.4. Suşların Moleküler Karakterizasyonu

Bacillus spp. suşlarının DNA izolasyonu, Agaroz Jel Elektroforezi, PCR ve sekans analizleri yapıldı. Sekans analizi (16S rRNA genomu) sonucunda suşların benzerlikleri belirlendi (Tablo 7). L38/3-4A suşunun %99 oranında *Bacillus* sp. FYS izolatına, E38/3A'nın %99 oranında *Bacillus* spp. R43'e, E38/3C'nin %99 oranında *Bacillus* spp. CLC-F10'a ve E44/2A'nın %100 oranında *B. subtilis* QH14-11 izolatına benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 7. Suşların sekans analiziyle belirlenen 16S rRNA gen benzerlikleri

İzolat	Benzer bakteriler	Gen Bank No	Örtüşme (%)	Benzerlik (%)
L38/3-4A	<i>Bacillus</i> sp. FYS	MN865176	100	99
	<i>Bacillus halotolerans</i> KLBC XJ-5	MN853407	100	99
	<i>Bacillus halotolerans</i> KSI1507	MN519259	100	99
	<i>Bacillus halotolerans</i> MSR-H4	MN494098	100	99
E38/3A	<i>Bacillus</i> sp. strain R43	MG594630	100	99
	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. HJSF-5	MF374348	100	99
	<i>Bacillus</i> sp. 70208	KY244048	100	99
	<i>Bacillus subtilis</i> H34	KU922339	100	99
E38/3C	<i>Bacillus</i> sp. CLC-F10	MH518194	100	99
	<i>Bacillus</i> sp. BGL-37	MH647667	100	99
	<i>Bacillus</i> sp. 70201	KY244042	100	99
	<i>Brevibacterium halotolerans</i> HQB251	KT758450	100	99
E44/2A	<i>Bacillus subtilis</i> QH14-11	MT078611	100	100
	<i>Bacillus subtilis</i> 1-17	MN938175	100	100
	<i>Bacillus velezensis</i> EMP34	MN062952	100	100
	<i>Bacillus</i> sp. LQING MIAO	MN726925	100	100

3.5. Suşların kültür filtratlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri

Çalışmada farklı kültür ortamında üreyebilen *Bacillus* spp. suşlarının MHB, PDB ve MRSB sıvı besiyerinde 48 saatlik kültür filtratlarının 50 µl'sinin antimikrobiyal etkinliği bir dizi Gram negatif ile pozitif bakterilere ve *C. albicans* mantarına karşı uygun besiyerleri kullanılarak agar kuyucuk metoduyla test edildi. Kültür kontrolü amacıyla ampicilin (5 µg/ml) kullanıldı. Farklı sıvı besiyerindeki kültürlerin etkinlikleri kıyaslandı ve sonuç itibarıyla etkinlik açısından aralarında büyük ölçüde fark olmadığı belirlendi. Ancak MRSB besiyerinin daha iyi olduğu gözlemlendi. Suşlar her üç besiyerinde de *C. albicans* ve *P. aeruginosa*'ya karşı etkinlik gösterdiği gözlemlendi (Tablo 8). *B. cereus* suşuna karşı sadece MRSB kültür filtratlarının etkili olduğu ancak tüm kültürlerden elde edilen filtratların 50 µl'sinin Gram negatif ve pozitif bir çok bakteriye karşı etkili olmadığı gözlemlendi. *C. albicans* maya mantarı olup tüm suşların farklı besi ortamında ürettiği filtratların etkili olması önemli bulundu.

Tablo 8. *Bacillus* spp. kültür filtratlarının agar kuyucuk diffüzyon metoduna göre etkinliği

Suş no	Besiyi ortamı	Mikroorganizmalar ve antimikrobiyal etkinlik zon çapı (mm)							
		Ec	Yp	Kp	Pa	Sa	Ef	Bc	Ca
E38/3A	MHB	-	-	-	20	-	-	-	23
	PDB	-	-	-	10	-	-	-	19
	MRSB	-	-	-	8	-	-	20	25
E38/3C	MHB	-	-	-	10	-	-	-	20
	PDB	-	-	-	20	-	-	-	18
	MRSB	-	-	-	7	-	-	20	22
L38/3-4A	MHB	-	-	-	4	-	-	-	6
	PDB	-	-	-	4	-	-	-	6
	MRSB	-	-	-	6	-	-	10	20
E44/2A	MHB	-	-	-	12	-	-	-	10
	PDB	-	-	-	12	-	-	-	12
	MRSB	-	-	-	8	6	-	25	20
Amp.	5µg/ml	20	14	15	NT	24	30	8	-

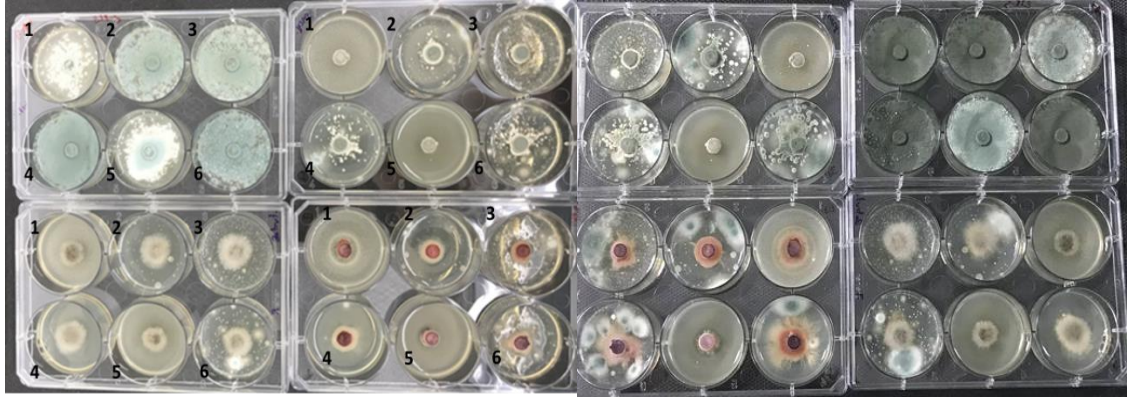
(Ec: *E. coli*, Yp: *Y. pseudotuberculosis*, Kp: *K. pneumoniae*, Pa: *P. aeruginosa*, Sa: *S. aureus*, Ef: *E. faecalis*, Bc: *B. cereus*, Ca: *C. albicans*, NT; test edilmedi, (-); etkinlik yok)

Filtratın etkinliğinin ısıya duyarlı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla farklı sıcaklık koşullarına maruz bırakıldıktan sonra tekrar test edildi. Bu amaçla 70 °C/10 dk., 90 °C/10 dk. ve 30 dk. ısıya maruz bırakıldıktan sonra *C. albicans* ve *B. cereus* suşlarına karşı test edildi ancak etkinlik gözlenmedi, bu nedenle sonuçlar tabloda verilmedi.

Bacillus spp. suşlarının antifungal aktivitesi, suşların ilk izolasyonunda gözlenmiş olup etkinlik spektrumunun belirlenmesi için bitki patojeni küf mantarları seçilmiştir. Tablo 9’da MHB besiyerinde inkübe edilen suşların sıvı kültürlerinden elde edilen süpernatantları PDA besiyeri ile karıştırıldı. Bazı mantarlara (*B. cinerea*, *R. solani*, *Fusarium* YP18B) karşı antifungal etkinlik testi plak görünüşleri ve misel gelişimi inhibisyon zonları verilmiştir (Tablo 9, Şekil 12). Deney için 4 ml’lik ELİSA plakaları kullanılmış olup lizat 1/5 oranında (600 µl / 3400 µl) besiyerine karıştırıldı.

Tablo 9. *Bacillus* spp. kültür süpernatantlarının misel gelişiminin inhibisyonu (mm)

	<i>B. cinerea</i>		<i>R. solani</i>		<i>Fusarium</i> sp. (YP18B)	
	5. gün	7. gün	5. gün	7. gün	5. gün	7. gün
E38/3A	8	8	8	10	35	35
E38/3C	-	-	-	-	24	33
L38/3-4A	-	-	15	20	30	35
E44/2A	-	-	12	20	25	30
Kontrol 5. gün	35	-	25	-	35	-
Kontrol 7.gün	-	35	-	35	-	35



Şekil 12. *Bacillus* spp. filtratlarının *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. (üst sıra), *B. cinerea* ve *F. solani* (alt sıra) suşlarına karşı 3. ve 7. günde antifungal aktiviteleri. 1; E38/3C, 2; L38/3-4A, 4; E38/3A ve 5: E44/2A, 3 ve 6; kontrol gruplarıdır.

3.6. Biyoaktif Metabolitlerin Ekstraksiyonu ve Antimikrobiyal Aktiviteleri

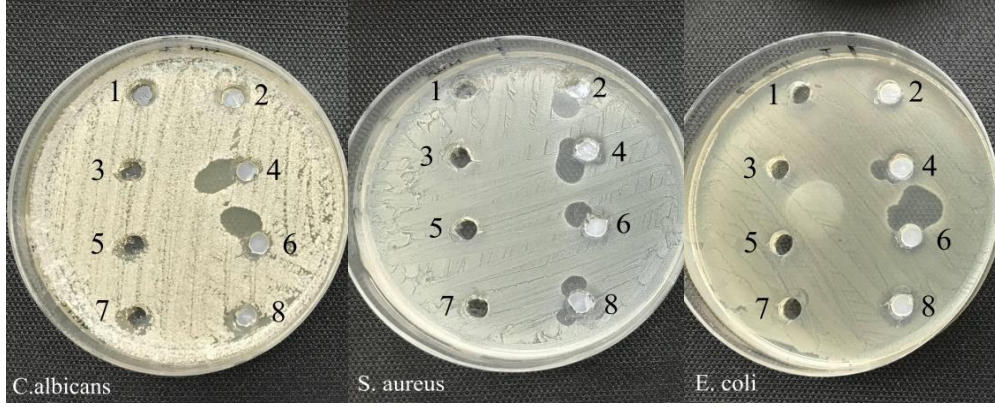
Suşların MRS Broth süpernatantları 1:1 oranda hekzan, kloroform ve etil asetatta 2 saat ekstre edildi ve önceki çalışmalarda aktivite göstermeyen *E. coli*, *S. aureus*, etkili olan *C. albicans*'a karşı agar kuyucuk metodu ile test 50 µl'de test edildi (Şekil 13).

Kloroform çözücüsü için de aynı şekilde ekstraksiyon gerçekleştirildi, fakat belirgin faz oluşumu ve antimikrobiyal aktivite gözlenmediği için çalışmalara etil asetat ile devam edildi. Hekzan ekstraktında kısmen faz gözlenmiştir, ancak belirgin bir aktivite gözlenmemiştir. Çalışmalarda etil asetat ekstraktında faz oluşumu yüksek düzeyde gözlenmiş, yoğunlaştırılmadan yapılan çalışmada her dört mikroorganizmaya karşı düşük de olsa aktivitenin var olması etil asetat kullanımını haklı kılmıştır (Tablo 10).

Tablo 10. Hekzan, Kloroform ve etil asetat ekstrelerinin karşı antimikrobiyal etkinliği

Suş No	Ekstrakt	Mikroorganizma ve inhibisyon zonları (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
E38/3A	H	-	-	-
	K	-	-	-
	EA	6	8	10
E38/3C	H	-	-	10
	K	-	-	-
	EA	6	7	7
L38/3-4A	H	-	-	-
	K	-	-	-
	EA	12	6	8
E44/2A	H	-	-	-
	K	-	-	-
	EA	7	6	-

H: Hekzan, K: kloroform, EA: Etil Asetat



Şekil 13. Hekzan ve etil asetat ekstrelerinin agar kuyucuk testi (1, 3, 5, 7: H ekstraktı; 2, 4, 6, 8: EA ekstraktı ve 1-2: E44/2A, 3-4: E38/3A, 5-6: L38/3-4A, 7-8: E38/3C

Zengin besi ortamı olan MYPGP besiyerinin antimikrobiyal etkinlik açısından farklı olup olmadığı düşünüldü ve MRS sıvı besiyeri ile karşılaştırıldı. MYPGP ve MRS sıvı besiyerlerinde üretilen *Bacillus* spp. kültürlerinden elde edilen supernatant 1:1 oranında etil asetat ile 3 gün ekstre edildi. Etil asetat ekstraksiyonu sonrası her iki besi ortamında da 3 faz gözlemlendi (etil asetatlı şeffaf faz, ara faz, besiyeri). Her suş için 2 adet ependorfta etil asetat fazı uçuruldu ve son ağırlıklar hesaplanarak madde miktarları arasındaki farklar belirlendi (Tablo 11). MYPGP besiyerinde kültür ekstraktında elde edilen madde miktarı 4.75-5.55 mg aralığında, MRSA besiyerinden elde edilen ekstrakt ise 2.2-3.85 mg aralığında belirlendi.

Tablo 11. Farklı iki besiyerinde üretilen kültürlerin Etil Asetat Ekstraktların madde içeriklerinin belirlenmesi (mg/ml)

		1. Tekerrür	2. Tekerrür	Ortalama madde miktarı
E38/3A	MYPGPB	5.2	5.9*	5.55
	MRSB	3.2*	3.5*	3.35
E38/3C	MYPGPB	4.9	5.8*	5.35
	MRSB	1.6*	2.8*	2.2
L38/3-4A	MYPGPB	4	5.5*	4.75
	MRSB	2.2*	2.5*	2.35
E44/2A	MYPGPB	4.7	5.8*	5.25
	MRSB	4*	3.7*	3.85

*: Antimikrobiyal testler için kullanılan stok ekstraktlar, MRSB ekstraktları birleştirilerek test edildi.

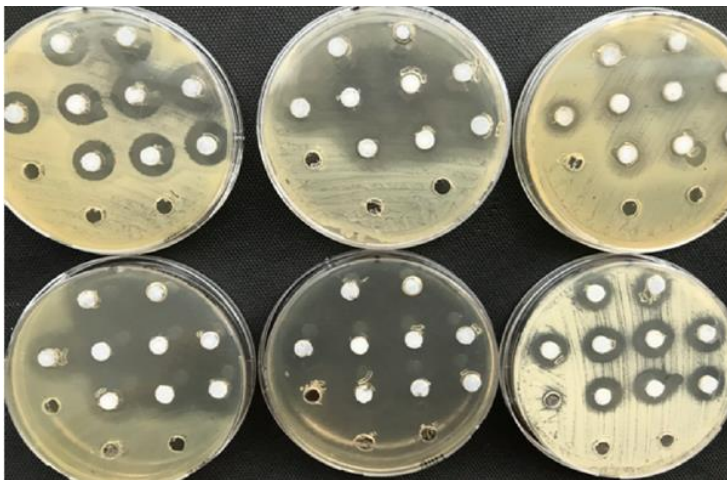
Hem MYPGPB hem de MRSB besiyerinde ayrı ayrı üretilen ve etil asetat ile ekstre edilen örnekler, 500 µl etil asetat ile çözülüp bir dizi mikroorganizmaya karşı agar kuyucuk metodu ile bir dizi mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktiviteleri test edildi (Tablo 12). Her iki besiyerinde de antimikrobiyal madde ürettikleri, ancak bu

maddelerin besiyeri kompozisyonuna göre deđiřtirđi gözlenmiştir. Genel olarak MRSA besiyerinde üretildiğinde Gram negatif bakterilere, MYPGP besiyerinde üretildiğinde ise anti-pseudomal ve Gram pozitif bakterilere karşı etkinliklerinin daha yüksek olduğu gözlendi. Ayrıca MYPGP’de maya mantarı olan *C. albicans*’a karşı da etkinliğin varlığı düşük de olsa belirlendi (Tablo 12, şekil 14). Besiyerindeki ve ekstraktaki katı fazların kurutma işlemi tam olarak gerçekleştirilemediğinden, ara faz ise etil asetatta çözünmediğinden bu fazlar agar kuyucuk testinde kullanılamadı ve etkinlik açasından değerlendirilemedi.

Tablo 12. MRS ve MYPGP sıvı kültürlerin etil asetat ekstraktlarının agar kuyucuk yöntemine göre antimikrobiyal aktivitesi (mm)

Suş no	Besiyeri	Mg/ml	Ec	Kp	Yp	Pa	Ef	Sa	Bc	Lm	St	Lk	Ca
E38/3A	MYPGP	5,9	6			12	14	10	15				13
	MRS	6,7	13	8	12		-	-	8	13	-	15	-
E38/3C	MYPGP	5,8	12			>20	>20	12	17				15
	MRS	4,4	7	6	9		-	-	7	7	8	-	-
L38/3-4A	MYPG	5,5	8			>20	16	11	14				14
	MRS	4,7	10	12	8		-	-	7	13	-	13	-
E44/2A	MYPG	5,8	10			10	15	10	14				13
	MRS	7,7	10	7	10		-	-	7	11	-	9	-
Kontrol	-	-	7	10	7	-	-	-	7	-	15	-	-
Etil Asetat	-		6			8	14	8	14				12

Ec: *E. coli*, Kp: *K. pneumonia*, Yp: *Y. pseudotuberculosis*, Ef: *E. faecalis*, Sa: *S. aureus*, Bc: *B. cereus*, Lm: *L. monocytogenes*, St: *Salmonella thypi*, Lk: *Lactobacillus kunkeii*, Ca: *C. albicans*



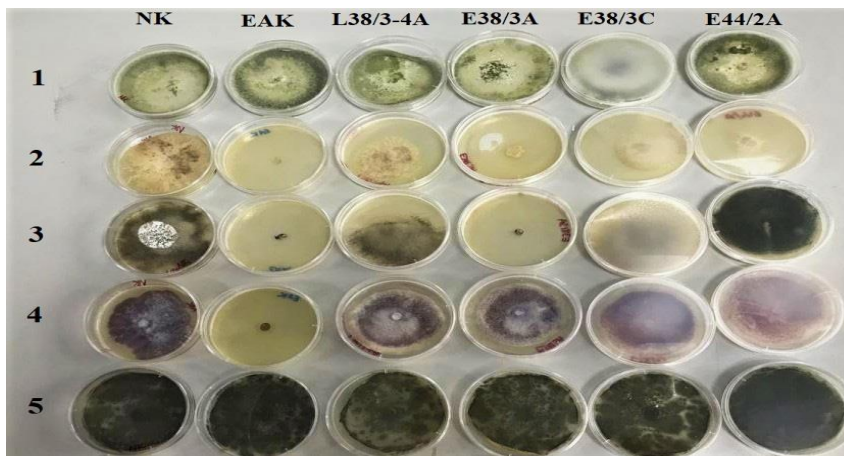
şekil 14. *Bacillus* spp. etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliği. Sırasıyla *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* (üst sıra), *P. aureginosa*, *E. faecalis* ve *C. albicans* (alt sıra).

Bacillus spp. suşlarının MRSB besiyerinde üreyen kültür filtratlarından elde edilen etil asetat ekstraktları üç farklı konsantrasyonda hazırlandı ve ekstraktlarının yaklaşık MIC değerleri belirlendi (Tablo 13). Negatif kontrol için ise sadece besiyeri kullanıldı. Kültür diskleri besiyeri ortalarına yerleştirildi, inkübasyon sonucunda petrilere antifungal etkinlik gözlemlendi (Şekil 15) ve her madde içeriğindeki mantar kültürünün üreme zon çapları kaydedildi. Üreme gözlenmeyen ya da kontrole göre düşük zon çapı ölçülen plaklardaki madde içeriğinin antifungal aktivite içerdiği yönünde değerlendirme yapıldı.

Tablo 13. *Bacillus* spp. suşlarının MRSB kültür filtratının etil asetat ekstraktlarının funguslara karşı antifungal aktiviteleri

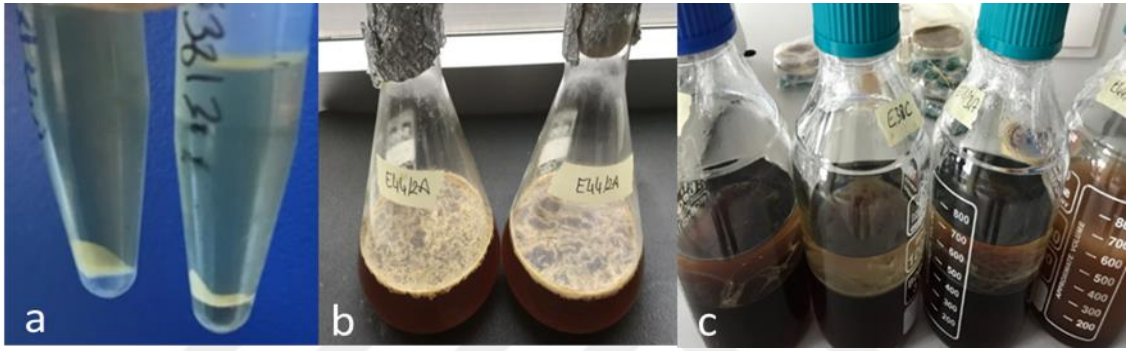
Suş No	Madde (mg/ml)	Funguslar ve radial üreme zon çapları (mm)						
		<i>Bc</i>	<i>Rs</i>	<i>Fo</i>	<i>Ss</i>	<i>An</i>	<i>Psp</i>	<i>Th</i>
E38/3A	100	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	10	-	15	10	25
	25	8	10	30	-	30	20	30
E38/3C	100	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	10	-	15	10	24
	25	-	8	30	-	22	20	30
L38/3-4A	100	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	5	15	-	15	10	25
	25	-	20	30	-	30	20	30
E44/2A	100	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	5	15	-	15	10	25
	25	-	20	30	-	30	20	30
Kültür Kontrol		30	30	30	15	30	30	30

Bc; *B. cinerea*, *Rs*; *R. solani*, *Fo*; *F. oxysporum*, *Ss*; *S. sclerotiorum*, *An*; *A. niger*, *Psp*; *Penicillium* sp., *Th*; *T. harzianum*. (-); yüksek etkinlik ya da üreme yok



Şekil 15. *Bacillus* spp. etil asetat ekstraktlarının PDA'da antifungal etkinlik deneyi (1: *T. harzianum*, 2: *R. solani*, 3: *B. cinerea*, 4: *F. oxysporum*, 5: *Penicillium* sp.)

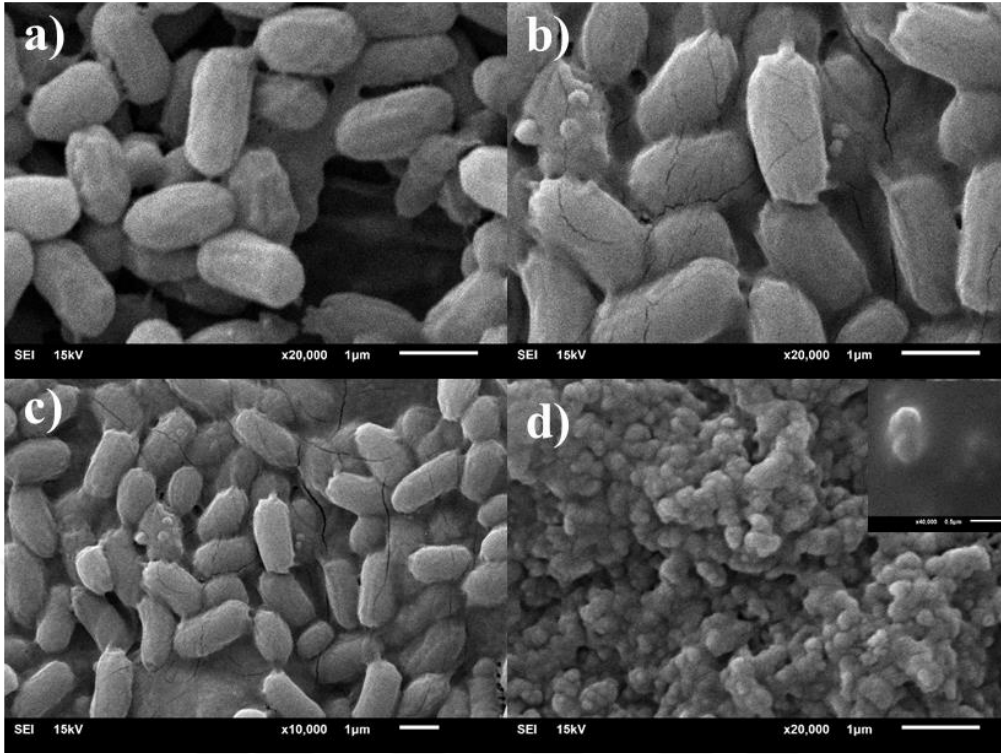
MRS Broth besiyerinde 8, 24 ve 48 saat kültüre edilen *Bacillus* spp. suşlarının, süpernatant ve pelletleri elde edildi, süpernatantlarında 4 ve -20 °C’de bekletildiğinde yoğun bir tortu/polimer yapısı olduğu gözlemlendi (Şekil 16). Süpernatantlar tekrar santrifüj edildiklerinde 3 faz gözlemlendi. Ependorfların en üst tabakasında besiyeri, ortada tortunun oluşturduğu katman görünümünde bir tabaka ve en dipte bu tabakanın arafazı olduğu düşünülen jel formunda berrak bir madde varlığı gözlemlendi. Orta hattaki tabakanın 48 saatlik kültürlerde yoğun olduğu, jel yapısının ise farklılık göstermediği belirlendi (Şekil 16a).



Şekil 16. *Bacillus* spp. süpernatantlarında santrifüj sonucu oluşan tabaka, E44/2A suşunun ürettiği polimer tortu ve etil asetat ekstraksiyondan görünümü

Her bir suştan 2’şer adet olmak üzere 250 ml MRS sıvı besiyerinde inkübasyonu tamamlanan kültürlerin yüzeyinde biriken polimer tortu alındı. Cam petride üstü açık şekilde 55 °C’de kurumaya bırakılan tortuların ağırlıkları hesaplandı. Her suş bu polimeri üretti, fakat en fazla polimer tortu E44/2A (844,5 mg) suşunda gözlemlendi (Şekil 16b). Diğer suşlarda sırayla L38/3-4A 641,5 mg, E38/3C için 263,5 mg ve E38/3A için 153,0 mg olarak belirlendi. Bu yapı santrifüjde bir yığın oluşturan ancak küçük bir müdahalede homojen yayılan bir makro molekül olduğu gözlenmektedir. Bu tortunun kimyasal/moleküler analizi yapılmaya çalışıldı ancak mevcut imkanlarda kullanılan çözücülerde çözündürülemediğinden dolayı NMR’da karakterize edilemedi.

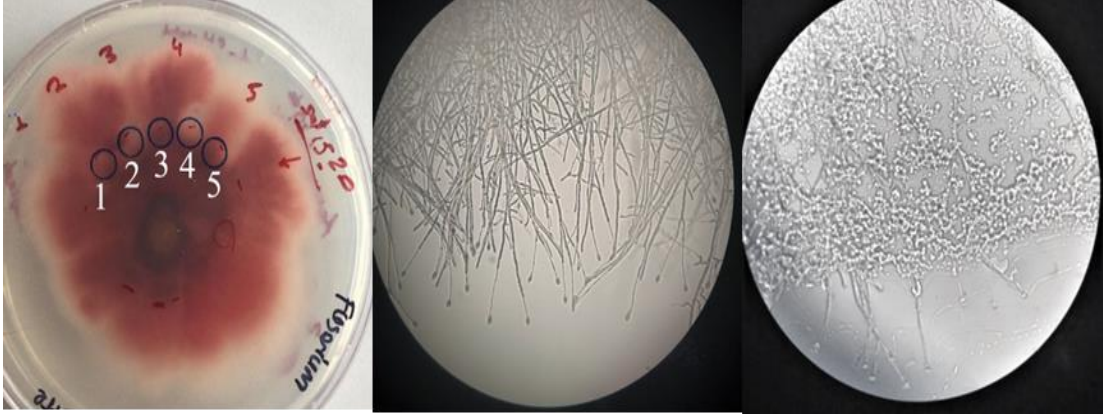
Kültürlerde gözlenen polimer yapıyı incelemek amacıyla SEM analizi yapıldı. Bu amaçla E44/2A suşunun bakteri, spor ve ekstraselüler polimer yapının Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) görünümü RTEÜ Merkez Laboratuvarında alınmıştır. Polimer yapı genel olarak düzgün boyutta yuvarlak yapıların olduğu ve hücre yüzeyinde bu polimer yapılardan da görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. Bakteri, spor ve polimer yapıların SEM görüntüleri. a) *Bacillus cereus* kontrol, b-c) *Bacillus* sp. E44/2A bakteri morfolojisi ve yüzeyin, d) *Bacillus* sp. E44/2A ekstraselüler madde.

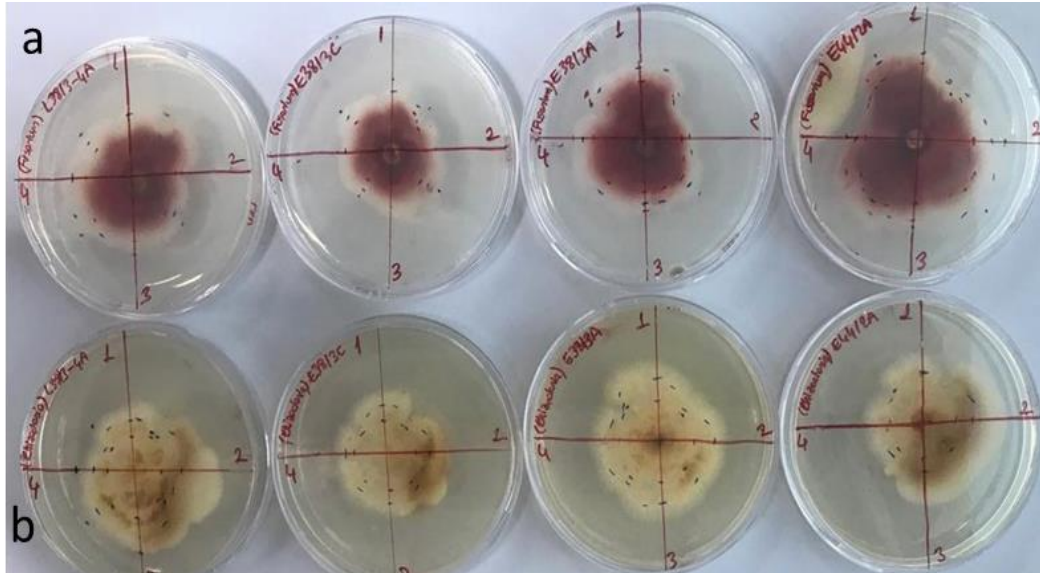
Misel Patlatma Deneyi

Antifungal aktiviteye neden olan etkenin belirlenmesinde önemli olan bir metod olan hif patlatma deneyi yapıldı. Bu amaçla farklı metodlar kullanıldı. Kültürlerin etil asetat ekstraksiyonu sonucu oluşan fazlar, modifiye MRS besi ortamındaki süpernatantlar ve hücre pelletinin sonikatör işlemi sonucu elde edilen sıvı fazları olmak üzere üç farklı ekstrakt kullanıldı. Hif patlatmada etkili olan maddelerin ekstraselüler mi yoksa intraselüler mi olduğunun belirlenmesi amacıyla yapıldı. Ön çalışma olarak ve metodolojinin standardizasyonu için ilk olarak E44/2A suşundan elde edilen fazlar, canlandırılan *Fusarium* sp. hiflerinin bulunduğu 5 bölgeye 6 saat arayla iki kez 10'ar mikrolitre olacak şekilde damlatıldı. Kültürler 24 saat 28 °C'de inkübasyonun ardından uygulama alanlarındaki hifal büyümeyi inhibe edici yönde etkili olup olmadığı besiyerinde ve mikroskop altında incelendi (Şekil 18). Yoğun inhibisyonun gözlemlendiği 2 numaralı ara faz bölgesinin mikroskopik incelemesinde hiflerin patladığı ve fazların damlatıldığı bölgelerde hiflerin patladığı, bütünlüğünün bozulduğu ve üremenin durduğu tespit edildi.



Şekil 18. E44/2A suşunun *F. oxysporum*'da hif patlama deneyi (1: etil asetat ekstraktı, 2: ara faz, 3: boş, 4: süpernatant, 5: etil asetat kontrol)

Her bir *Bacillus* spp. suşu için hif patlatma deneyinde kullanılmak üzere, önceden canlandırılmış 4 adet *Rhizoctonia* sp. ve 4 adet *Fusarium* sp. petrileri, 4 eşit alana (1: etil asetat ekstraktı, 2: ara faz, 3: süpernatant, 4: etil asetat kontrol) ayrıldı. Bu alanların merkezine fazlardan 20 µl damlatıldı ve 24-48 saat 28 °C'de inkübasyonları izlenerek damlatma alanının ve çevresindeki hifal büyümleri cetvel yardımıyla ölçüldü (Şekil 19). İnkübasyon sonrası sonuçlar *Rhizoctonia* sp. ve *Fusarium* sp. için ayrı ayrı kaydedildi (Tablo 14). Damlatma alanlarında büyümenin engellendiği görsel olarak izlendi.



Şekil 19. *F. oxysporum* (a) ve *R. solani* (b) de fazların hifal büyümeyi engelleyici etkisi

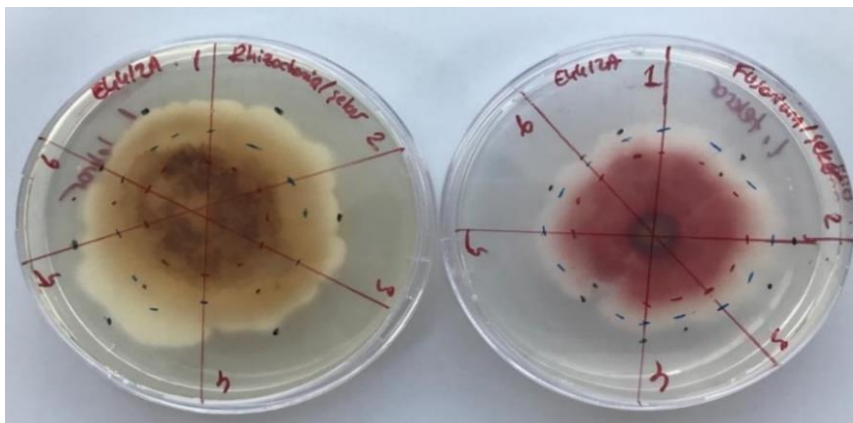
Tablo 14.Fazların damlatıldığı alanlarda mantar misellerinin (hif) gelişimi (mm)

		<i>R. solani</i>					<i>F. oxysporum</i>				
		1.alan	2.alan	3.alan	4.alan	Ort.	1.alan	2.alan	3.alan	4.alan	Ort.
L38/3-4A	24.	5	0	3	7	7	4	1	3.5	4.5	4.5
	48.	9	0	3	9.5	11	7.5	5	6.5	6.5	7
E38/3A	24.	3	1	6	2	6	5	0	3	4	4
	48.	4	3.5	11.5	7	12.5	6.5	1.5	7.5	7	6.5
E38/3C	24.	2	0	3	3	4	3	2	3	3.5	4
	48.	3.5	0	3	10	10	6.5	3.5	7	6	7
E44/2A	24.	1	0	4	3	3.5	4	0	5.5	4	4.5
	48.	1.5	0	4	8	8	5	0	9	6.5	8.5

(1. alan: Kültürlerin etil asetat ekstraktları, 2. alan: Ara faz, 3. alan: Süpernatant, 4. alan: Etil asetat kontrol, ort.: Kültür kontrol)

Misel patlatma deneyinde tüm kültürlerin ara fazlarının her iki suşta da çok etkili olduğu belirlendi. Her iki fungus için kültür süpernatlarında, ilk 24 saatte etkinliğin var olduğu belirlendi. Kültürün 48. saatinde ise E38/3A suşu dışında *R. solani* etkinliğinin devam ettiği ancak, *F. oxysporum*'da etkinliğin tamamen kaybolduğu belirlendi. *R. solani* için kültür etil asetat ekstraktının da hem 24 hem de 48. saatte çok etkili olduğu, en etkin antifungal suşun E44/2A olduğu gözlemlendi. *F. oxysporum* suşunda kültür etil asetat ekstraktlarının etkili olmadıkları belirlendi.

Antifungal aktivitenin farklı besiyerlerde az da olsa farklılık içermesinden dolayı etkenin karbon kaynağına bağlı olduğu düşünüldü ve farklı karbon kaynakları içeren besiyerleri hazırlanarak test edildi. Bu amaçla en etkili olan E44/2A suşunun kullanıldı. Modifiye MRS besiyerleri (glikoz, sükroz, laktöz, fruktoz, nişasta) hazırlanarak bakterilerin 48 saatlik kültürleri yapıldı ve birer adet *F. oxysporum* ile *R. solani* suşlarına karşı test edildi. Petri kültürlerinin her bir alanın orta hattına 20 µl olacak şekilde damlatıldı ve 24-48 saat 28 °C'de inkübasyonları izlendi (Şekil 20), sonuçlar kaydedildi (Tablo 15).

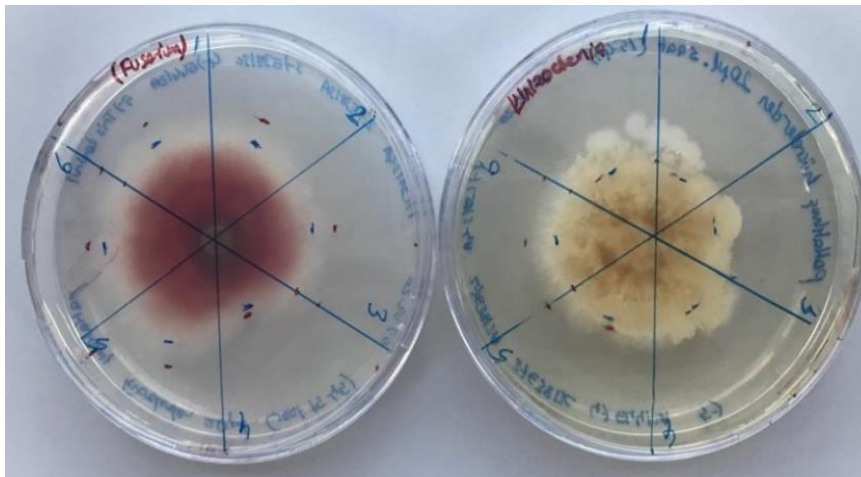
**Şekil 20.** Modifiye şekerli kültür lizatlarının hifal büyümeyi engelleyici etkisi

En yüksek antifungal aktivite *F. oxysporum* için nişastalı MRS kültürünün süpernatantında gözlenirken *R. solani* için ilk glükoz ve sükroz katkılı MRS besiyerinde gözlenmiştir. Bu sonuçlar karbon kaynağının antifungal aktivitede önemli olduğunu, farklı karbon kaynaklarında, suşlar tarafından farklı biyoaktif maddelerin üretildiğini göstermiştir.

Tablo 15. Modifiye karbon kaynaklı MRSB kültür lizatlarının antifungal etkinliği (mm)

	Mantar Türü	Saat	Glikoz	Sukroz	Laktoz	Fruktoz	Nişasta	Kontrol
E44/2A	<i>R. solani</i>	24	5.5	6	8	8.5	8.5	6.5
		48	5.5	6	8	8.5	8.5	6.5
	<i>F. oxysporum</i>	24	5	4	5	5	1.5	4
		48	7	6	9	7	5.5	8

Çalışmada antifungal etkenin ekstraselüler maddelerin olduğu gözlemlendi ancak intraselüler metabolitlerin etkinliğinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla hücre patlatma sonucu elde edilen süpernatantların etkinliği test edildi. *Bacillus* spp. suşlarının pelletlerine sonikatörde patlatma işlemi uygulandıktan sonra, 5 dakika santrifüj sonucu elde edilen üst kısımlar, yukarıda belirtildiği gibi *F. oxysporum* ile *R. solani* suşlarına karşı 20 µl olacak şekilde test edildi. Kültürler 24 saat 28°C’de inkübasyonları izlendi (Şekil 21) ve sonuçları kaydedildi (Tablo 16). *F. oxysporum* petrisinde sadece E44/2A suşunun yüksek etkinliğe sahip olduğu gözlemlendi. *R. solani* suşuna ise tüm kültür süpernatantlarının yüksek düzeyde etkili olduğu belirlendi.



Şekil 21. Patlatılan hücre süpernatantlarının hifal büyümeye etkisi (1: L38/3-4A, 2: E38/3A, 3: E38/3C, 4: E44/2A, 5: Tris-HCl kontrol)

Tablo 16. Sonikatör işlemi sonrası patlatılan hücre kültür lizatı süpernatantlarının antifungal etkinliği (mm)

	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
L38/3-4A	0	5
E38/3A	0	5.5
E38/3C	0	5
E44/2A	0	1.5
Tris-HCl Kontrol	2	5

3.7. Biyoaktif Metabolitlerin Saflaştırılması ve Antimikrobiyal Aktivite Testi

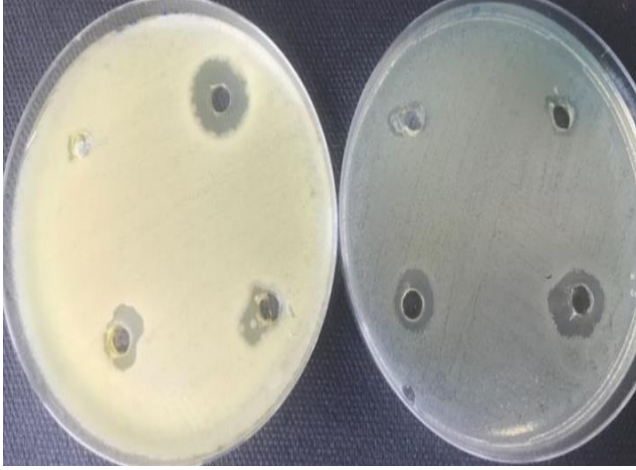
En yüksek etkinlik gösteren ve en fazla tortu oluşturan suş olan E44/2A suşunun etil asetat ekstraktı, kimyasal yöntemlerle fraksiyonlanarak biyoaktif metabolitler saflaştırıldı. NMR spektrumlarına göre 4 madde saf olarak elde edilerek antimikrobiyal etkinliği agar kuyucuk ve MİK testleriyle incelendi (Tablo 17, Şekil 22).

Tablo 17. Saflaştırılan maddenin bazı mikroorganizmalara karşı inhibisyon zon çapları ve MİK değerleri

Madde adı ve çözücüsü	Stok Kon. µg/ml	MA (g/mol)	Test birimi	Mikroorganizmalar, Agar Kuyucuk İnhibisyon Zon Çapı (mm) ve Minimal İnhibisyon Konsantrasyon Değerleri (MİK, µg/mL)							
				Ec	Pa	Sa	Bc	Ef	Sp	Ca	Sc
C ₇ H ₁₃ NO	36700	127,18	mm	8	-	-	-	-	8	-	-
Kloroform			MİK	458,8	-	-	-	-	458,8	-	-
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	65600	342,30	mm	6	6	-	16	8	12	-	-
Metanol			MİK	3280	3280	-	205	1640	205	-	-
C ₁₈ H ₃₄ O	6600	266,46	mm	6	10	-	12	10	8	-	-
Metanol			MİK	165	41,3	-	20,7	41,3	82,5	-	-
C ₈ H ₁₁ NO	4900	137,18	mm	6	12	8	10	10	8	-	-
Metanol			MİK	245	30,6	122,5	122,5	61,3	122,5	-	-
Amp.	10		mm	10	18	10	15	35	NT		
			MİK	10	128	35	15	10	NT		
Flu.	5		mm							25	25
			MİK							8	8

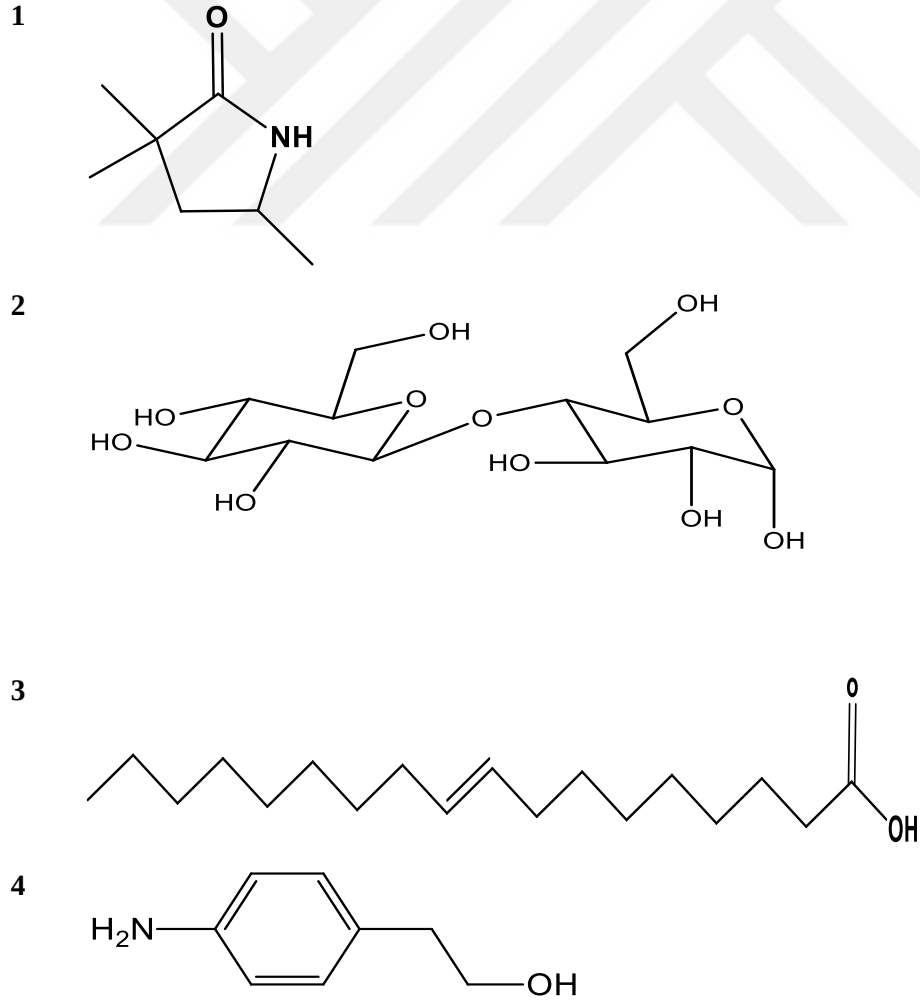
Ec: *E. coli*, Pa: *P. aeruginosa*, Sa: *S. aureus*, Bc: *B. cereus*, Ef: *E. faecalis*, Sp: *S. pyogenes*, Ca: *C. albicans*, Sc: *S. cerevisiae*, Amp.: Ampicillin, Flu.: Fluconazole, (-): No activity, MA: Molekül ağırlığı

Saflaştırılan bu maddelerin (C₇H₁₃NO, C₁₂H₂₂O₁₁, C₁₈H₃₄O, C₈H₁₁NO), antifungal aktivitelerinin olmadığı, C₁₂H₂₂O₁₁ ve C₁₈H₃₄O maddelerinin benzer antibakteriyel (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. pyogenes*) etkinliklere sahip oldukları belirlendi. C₇H₁₃NO maddesi sadece *E. coli* ve *S. pyogenes*'e karşı etkinlik gösterirken, C₈H₁₁NO maddesinin tüm bakterilere karşı etkinlik gösterdiği belirlendi.



Şekil 22. E44/2A suşundan saflaştırılan dört maddenin sırasıyla *B. cereus* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı antimikrobiyal etkinliği (madde sırası üst 1., 2. ve alt sıra 3. 4. nolu maddeler)

E44/2A suşundan saflaştırılan moleküllerin kimyasal yapısı belirlendi (Şekil 23).

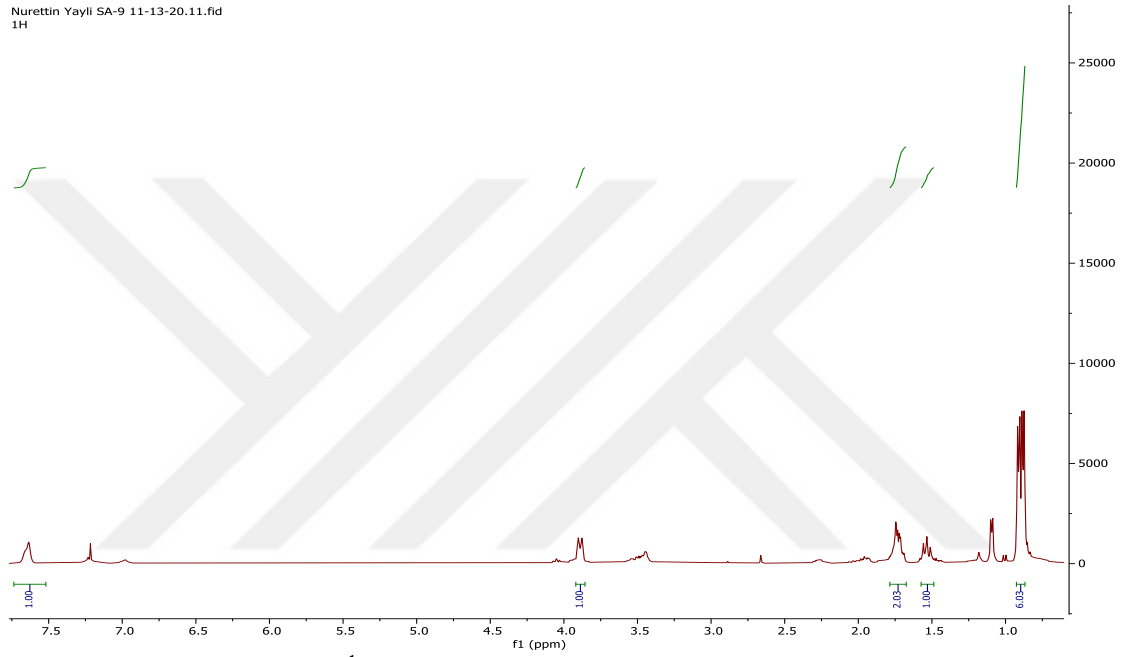


Şekil 23. E44/2A suşundan izole edilen moleküller ve yapıları

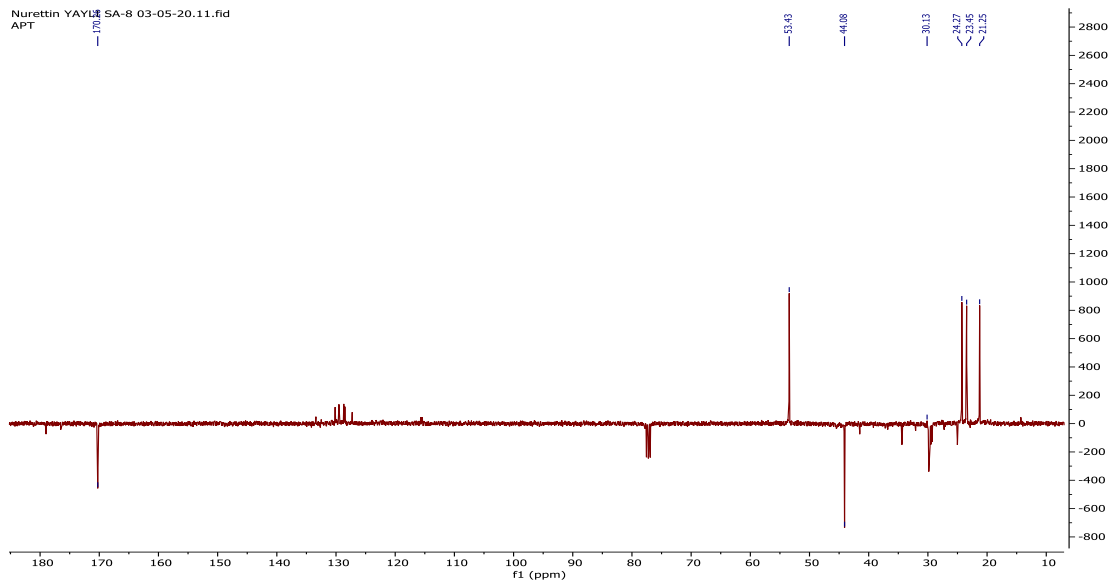
İzole edilen bileşiklerin NMR spektrumuna bakıldı. 1 no'lu bileşiğin ^1H ve APT spektrumları analiz edildi (Şekil 24 ve 25).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.73 (CH_2 , H-1); 3.89 (CH , H-2); 0.90 (3x- CH_3 , H-3, H-4, H-5); 7.64 (-NH).

^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 170.26 ($-\text{C}=\text{O}$); 53.43 (C-3); 44.08 (C-4); 31.13 (C-5); 24.27 (C-6); 23.45 (C-7); 21.25 (C-8).



Şekil 24. 1 Nolu bileşiğin ^1H spektrumu (400 MHz).

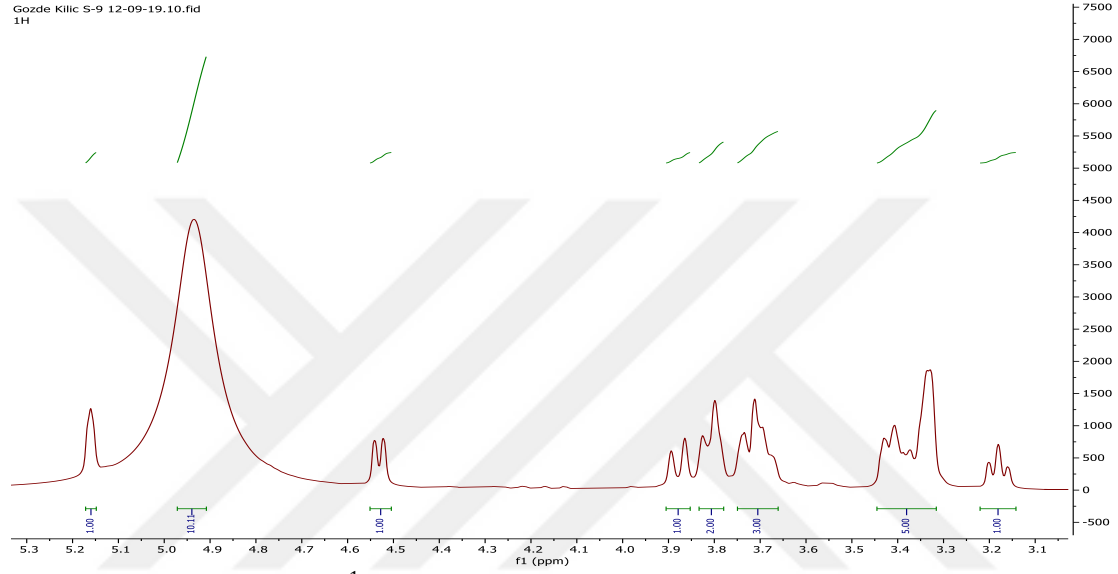


Şekil 25. 1 Nolu bileşiğin APT spektrumu (100 MHz).

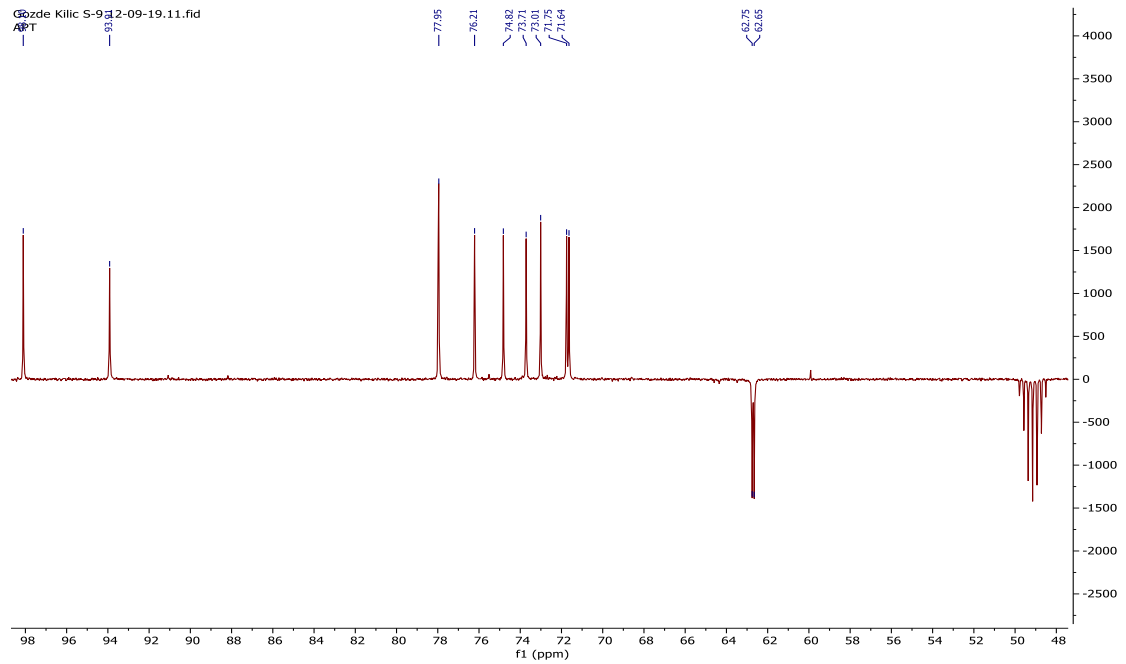
2 no'lu (şeker, di sakkarit) bileşiğin ^1H ve APT spektrumları analiz edildi (Şekil 26 ve 27).

^1H NMR (400 MHz, CD_4O , δ , ppm): 5.16 (CH, H-1); 4.54-4.52 (CH, H-1'); 3.89-3.34 (CH, H-2-5/2'-5'); 3.18 (CH₂, H-6/6').

^{13}C -NMR (400 MHz, CD_4O , δ , ppm): 98.10 (C-1'); 93.91 (C-1); 77.95-71.64 (C2-5/ C2'-5'); 62.75 (C-6); 62.65 (C-6').



Şekil 26. 2 Nolu bileşiğin ^1H spektrumu (400 MHz).

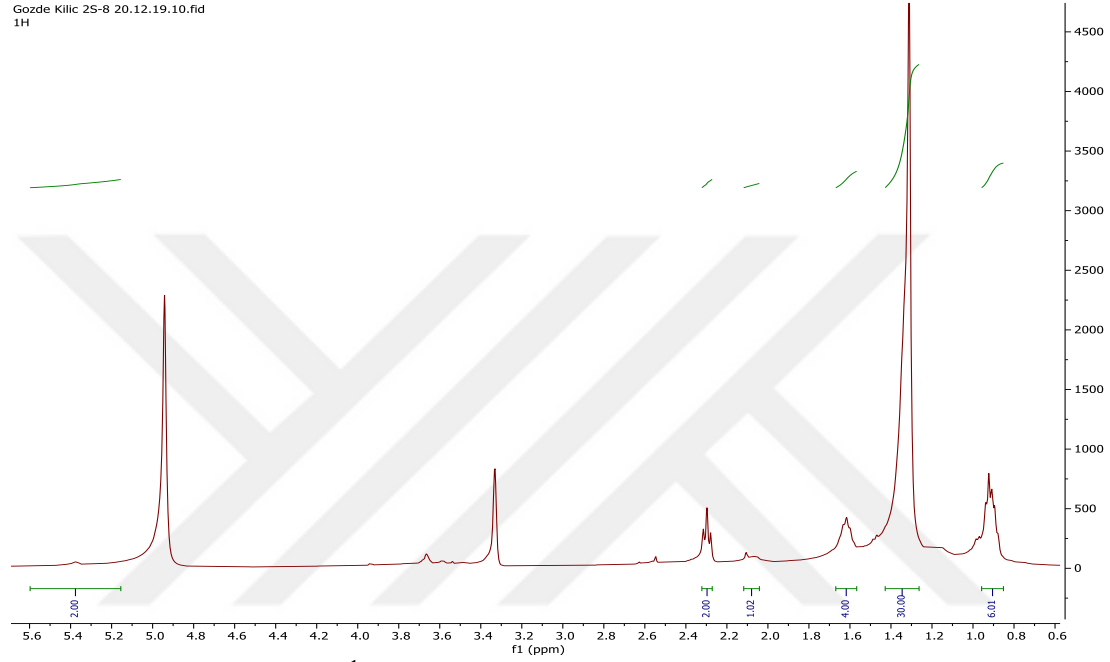


Şekil 27. 2 Nolu bileşiğin APT spektrumu (100 MHz).

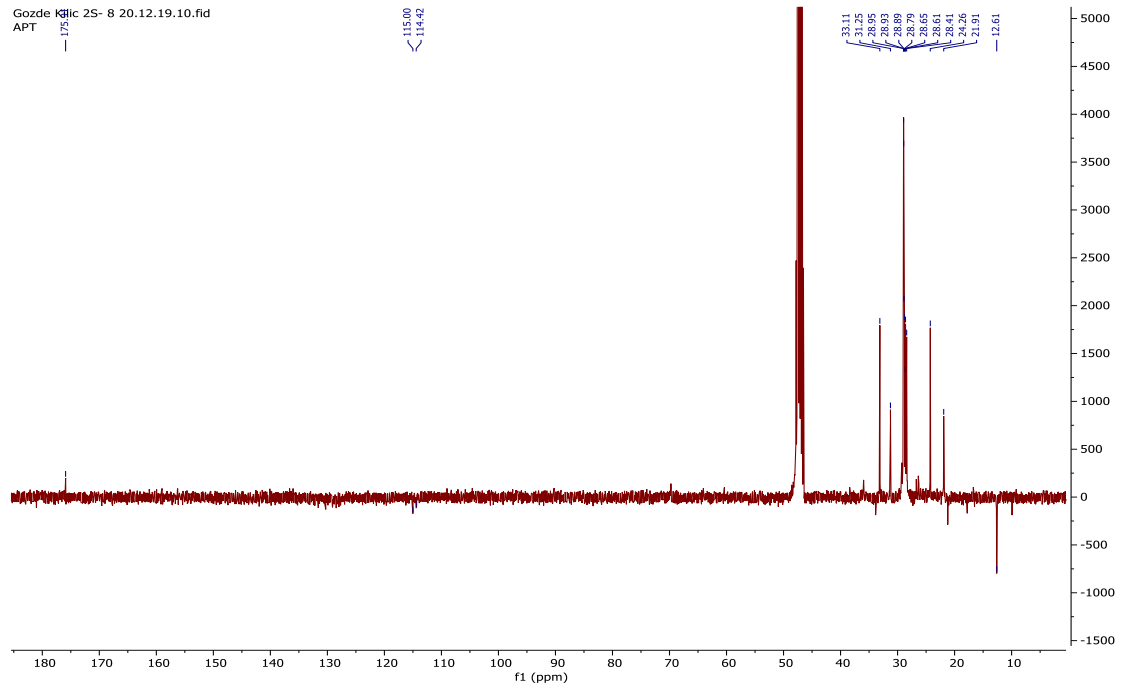
3 no'lu bileşiğin ^1H ve APT spektrumları analiz edildi (Şekil 28 ve 29).

^1H NMR (400 MHz, CD_4O , δ , ppm): 2.29 (CH_2 , H-2); 1.61 (CH_2 , H-3); 2.10 (CH_2 , H-8/11); 5.37 (CH , H-9/10); 1.32 (CH_2 , H-4-8/12-17); 0.92 (CH_3 , H-18).

^{13}C -NMR (400 MHz, CD_4O , δ , ppm): 175.91 (C-1); 115.00 (C-9); 114.42 (C-10); 33.11-21.19 (C2-8/ C10-17); 12.61 (C-18).



Şekil 28. 3 Nolu bileşiğin ^1H spektrumu (400 MHz).

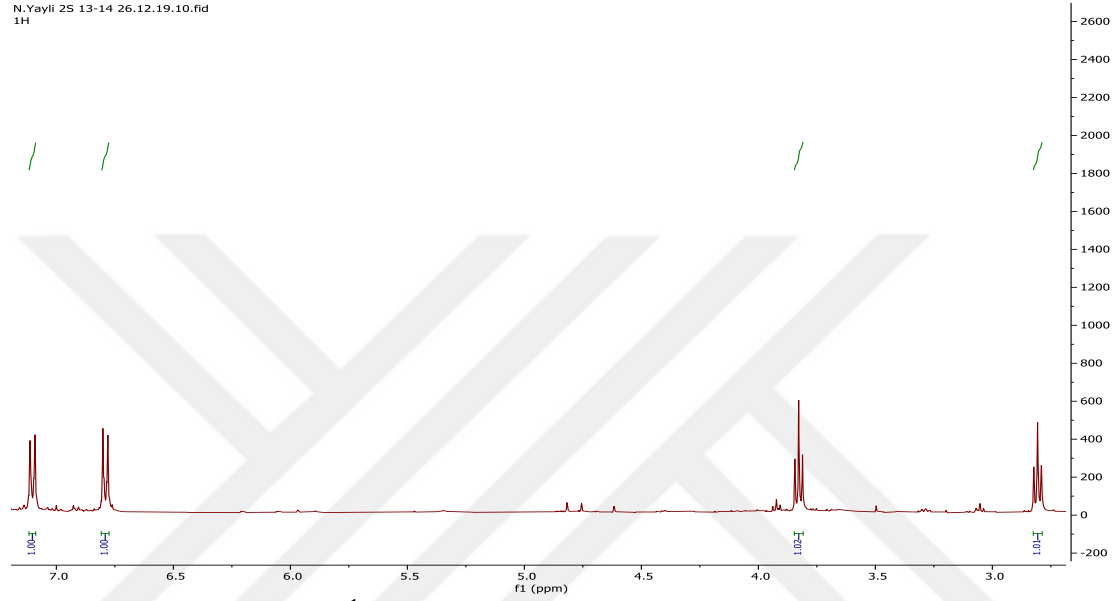


Şekil 29. 3 Nolu bileşiğin APT spektrumu (100 MHz).

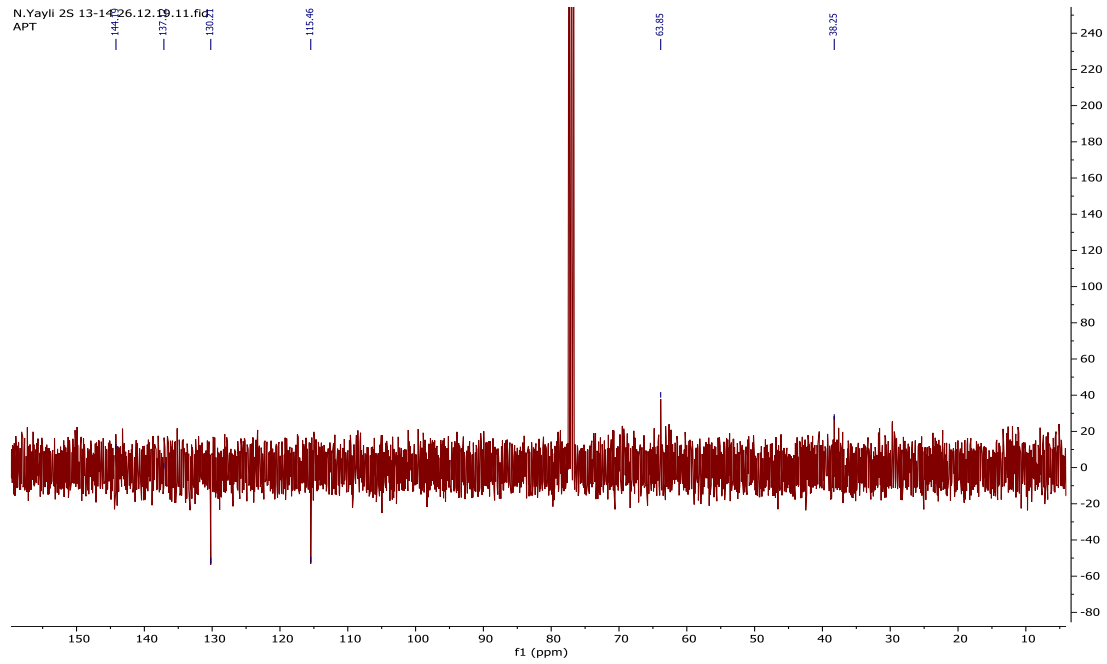
4 no'lu bileşiğin ^1H ve APT spektrumları analiz edildi (Şekil 30 ve 31).

^1H NMR (400 MHz, CD_4O , δ , ppm): 6.80 (CH, H-2,6); 7.11 (CH, H-3,5); 2.80 ($-\text{CH}_2$, t, $J=7.6$ Hz, H-3); 3.82 ($-\text{CH}_2$, t, $J=7.6$ Hz, H-4).

^{13}C -NMR (400 MHz, CD_4O , δ , ppm): 131.61 (C-3,5); 116.25 (C2/6); 39.57 (C-7); 64.79 (C-8).



Şekil 30. 4 Nolu bileşiğin ^1H spektrumu (400 MHz).



Şekil 31. 4 Nolu bileşiğin APT spektrumu (100 MHz).

3.8. Suşların Antioksidan Aktivite Testi

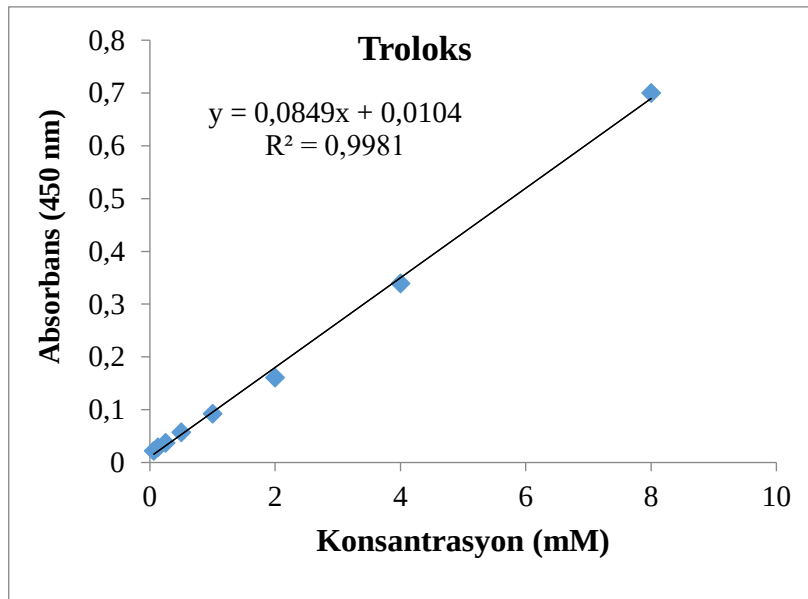
Bakterilerin MRSB besiyerinde 48 saat 37 °C’de 120 rpm’de üretilen kültürlerden alınan lizatlarda elde edilen supernatantın antioksidan aktivitesi, Tablo 18’de verilen oranlarda CUPRAC yöntemi ile test edildi.

Tablo 18. CUPRAC tayininde yapılan pipetleme işlemi

	Numune	Renk körü	Reaktif körü
10 mM CuCl ₂	1 mL		1 mL
Amonyum asetat tamponu 1M pH 7,0	1 mL		1 mL
7,5 mM etanollü neokuproin	1 mL		1 mL
Numune	5 µL	5 µL	-
Distile su	1,095 mL	1,095 mL	1,095 mL
DMSO			5 µL

50 dakika süre sonunda 450 nm’de absorbans okunur.

Bu yöntemle göre bileşiklerin antioksidan aktiviteleri 450 nm’de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak aynı yöntemle hazırlanan troloks standart grafiğinden (Şekil 32) elde edilen denklemden hesaplandı. Sonuçlar mg besiyeri başına düşen mM troloks eşdeğeri (TEAC) olarak Tablo 19’da verildi.



Şekil 32. Troloks® standart grafiği

Tablo 19. Bileşiklerin CUPRAC (mM Troloks/mg besiyeri) yönteminde elde edilen antioksidan aktivite sonuçları

Besiyeri	TEAC Değerleri
Kodu	(mM Trolox / mg besiyeri)
E38/3C	1.658±0.011
E38/3A	3.007±0.019
L38/3-4A	1.029±0.009
E44/2A	1.838±0.017

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Çalışmamızda izole edilen antifungal özellikli *Bacillus* spp. suşlarının arı florasının daimi üyeleri değil, muhtemel çevre orjinli izolatlar olup güçlü antifungal aktivite göstermiş olmalarından dolayı incelemeye ve karakterize etmeye değer bulunmuşlardır. Arı flora teması sonucu matriksinde yada beslenmesi sonucu sindirim sisteminde bulunan mikroorganizmalar ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte *Bacillus thuringiensis* (Bt) bazlı bitki koruma ürünlerinin (PPP'ler) artan kullanımı, son zamanlarda bunların çevresel birikimleri ve tozlayıcılar da dahil olmak üzere hedef olmayan türlerin beklenenden daha yüksek dozlara olası kronik maruziyeti ile ilgili bazı endişeleri gündeme getirmiş ve bu alanda yapılan yeni çalışmalar bildirilmiştir. Alkassab vd. (2022) yaptıkları çalışmada bal arısı tarafından toplanan ve depolanan matrislerin yanı sıra arı larvaları ve ölü arılar da dahil olmak üzere farklı matrislerden aldıkları örneklerde Bt sporlarının konsantrasyonu ölçülmüş ve yüksek seviyelerde Bt sporlarının olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile arıların florasında çevre orjinli mikroorganizmaların geçici flora yada kalıcı flora oluşturabileceği gözlenmiştir.

Çalışmamızda izole edilen ve fiziksel, biyokimyasal ve moleküler olarak karakterize edilen 4 adet suşun (E38/3A, E38/3C, L38/3-4A ve E44/2A) Gram pozitif terminal /subterminal spor formunda, katalaz aktivitesi pozitif, ikisi hareketli (E38/3C ve E44/2A), çeşitli besiyerlerinde üreyebilen ancak en iyi sırasıyla PDB, MHB, MYPGPB ve MRSB besiyerlerinde üreyebilen (Tablo 1, Şekil 8), sıvı ortamda polimer üretebilen (Tablo 2), bir dizi enzimi güçlü (Tablo 3, Şekil 10) üretme yeteneğine sahip olan suşlardır. Suşların üçünün (E38/3A, E38/3C ve L38/3-4A) selüloz ve amilaz aktivitesinin güçlü olduğu, E44/2A'nın ise Jelatin hidrolizi, Lesitinaz aktivitesi, Amilaz ve Proteaz aktivitelerinin güçlü olduğu gözlenmiştir. Enzimler, canlı hücreler tarafından üretilen ve spesifik biyokimyasal reaksiyonlarda görev yapan biyokatalizörlerdir ve ticari açıdan çok geniş kullanım alanları (gıdalarda, hayvansal yemlerde, kozmetik, ilaç sektöründe, kağıt sektöründe vb.) bulunmaktadır. Çalışmamızda E38/3A, C ve 3-4A suşların güçlü selüloz aktivitesi içermesi mantar hücre duvarı bileşenlerini parçalayabilmesi açısından önemli olup bitki patojeni fungusların kontrolünde biyokontrol ajan olarak kullanılabilirliklerini ortaya koymaktadır.

Genel olarak suşlara bakıldığında antifungal aktivite dışında birçok farklı özellikleri içerdikleri ve bu özellikler açısından da değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varıldı. Farklı sıvı besi ortamlarında güçlü polimer üretmesi önemli bulunmuş olup mevcut çalışmada polimer içeriği karakterize edilememiştir. Bu alanda detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Şuşların farklı ve güçlü enzim aktiviteleri içermeleri bu açıdan da değerlendirilebileceğini göstermektedir. Özellikle E44/2A suşu lesitinaz, amilaz ve proteaz üretiminde, diğer üç suş ise selüloz ve amilaz üretiminde kullanılabileceği gözlenmektedir. Suşlardan E38/3C ve E44/2A geniş sıcaklık (15 - 55 °C) sıcaklıkları ve pH (6.2->8.0) aralığında üreyebilmeleri, %8 üzeri tuz ve %20 şeker konsantrasyonunda üreyebilmeleri farklı çevre koşullarında biyokontrol ajan olarak kullanılabilirliklerini sağladığı düşünülmektedir. Ancak bu amaç kullanılabilirliği belirlemek açısından özellikle bitki gelişimini teşvik eden özelliklerin de incelenmesi için daha detaylı çalışmalar yapılmalıdır.

Khan vd. (2018) yaptıkları çalışmada, dört basilin (*Bacillus simplex* 30N-5, 11, 237 ve *B. subtilis* 30VD-1) bitki gelişimini teşvik edici (PGP) ve biyokontrol özelliklerinin analizi yapılmıştır. Fonksiyonel deneylerde selüloz, ksilanaz, pektinaz ve kitinaz üretimi incelenmiş, ardından PGP ile ilgili ve biyokontrol ile ilişkili genlerin in silico gen analizi yapılmış, *Fusarium* spp.'ye karşı in vitro koşullar altında en etkili antagonizmayı göstermiştir. Bildirilen çalışmada dahil edilen tüm basiller arasında, *B. subtilis* 30VD-1 (30VD-1), *Fusarium* spp.'ye karşı en etkili antagonizmayı göstermiştir. *Bacillus* cinsleri tarafından üretilen hücre duvarını bozan enzimler arasında kitinaz, selülozlar, pektinazlar ve ksilanazlar bulunur ve bu hidrolitik enzimleri kodlayan genler genomlarında tespit edilebilir. *Fusarium* hücre duvarları (Schoffemeer vd., 1999) kitin, α -1,3-glukan ve β -1,3-glukanlardan oluşur. *B. subtilis* 30VD-1'in hifal inceleme üzerindeki etkilerinden kitin parçalayıcı enzimlerin ve/veya glukozidazların sorumlu olabileceğini düşünülmüştür. Selüloz ile yapısal benzerlikleri paylaşan β -1,4-bağlı N-asetilglukozamin (NAG) kalıntılarının lineer bir polimeri olan kitini parçalamak için iki farklı mekanizma bilinmektedir (Beier ve Bertilsson, 2013; Chavan ve Deshpande, 2013). Bir mekanizma, 1,4-p-poli-N-asetilglukosaminidazlar (EC 3.2.1.14) olarak da bilinen endokitinazları kullanır. Ekzokitinazlar, selobiaz/ β -glukosidazlar (EC 3.2.1.21) veya ekzoglukozidazlar, şimdi β -N-asetilheksosaminidazlar (nagZ) (EC 3.2.1.52) olarak sınıflandırılır, kitinden NAG dimerleri ve monomerleri salgılar (Horsch vd., 1997).

Mantarların hücre duvarının ana bileşenleri kitin, glukon, protein ve yağlardır. *Bacillus* spp.'nin ekstrasellüler enzimleri özellikle endüstriyel açıdan oldukça büyük öneme sahip olmaları yanı sıra, fungal bitki patojenlerinin hücre duvarı biyodegradasyon enzimlerini içermeleri açısından biyokontrolünde kullanımları mevcuttur (Mauch ve ark., 1988; Reyes ve ark., 1997; Mawadza vd., 2000).

Suşılarımızın optimum üreme sıcaklıklarının 30-40 °C olduğu ancak geniş üreme sıcaklık (20-50 °C) aralığına sahip olduğu, tüm izolatlar alkali toleranslı (pH 8.0) oldukları ve bu koşullar altında maksimum hayatta kalma ve büyüme özelliği gösterdikleri belirlendi. Ayrıca optimum pH aralığı pH 6.0-7.0 olmasına rağmen polimer üretimi pH 8.0 de olduğu, hatta L38/3-4A suşunun pH 8.0 de çok yüksek seviyelerde polimer ürettiği gözlenmiştir (Tablo 4). L38/3-4A suşu özellikle optimum %5, maksimum %12 tuz varlığında ve %30 glikoz ortamında üreyebilmesi önemli bir özellik olarak gözlenmiştir (Tablo 5). *Bacillus* türleri, safra tuzuna karşı önemli ölçüde direnç gösterir ve bu nedenle, bu tür koşulların hüküm sürdüğü bağırsak ortamında daha iyi hayatta kalmalarını beklenir (Nwagu vd., 2020). Diğer üç suş ise %8 tuz ve %20 şeker konsantrasyonlarında iyi üreyebildiği gözlenmiştir. Bu özellikleri fiziksel koşullara dayanıklı olduklarının bir göstergesi olduğu düşünülmektedir.

Farklı *Bacillus* suşları spor oluşturduğundan, probiyotik formüllerde geleneksel olarak kullanılan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi bakterilere göre avantajlar sunarlar. Yüksek sıcaklıklara dayanabilirler ve uzun süreler boyunca değiştirilmeden canlı tutulabilirler (Spinosa vd., 2000). Ayrıca midenin düşük pH ortamında hayatta kalabilirler (Barbosa vd., 2005). *B. anthracis* ve birkaç *B. cereus* suşu dışında *Bacillus* cinsine ait suşların zararsızlığı kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve hiçbir yan etki gözlenmediği bildirilmektedir.

Snyder (2009), *Bacillus* spp. ve *B. amyloliquefaciens* bakterilerinin; yağlar, proteinler ve nişastalar gibi kimyasal bileşenlerin yıkımını katalize eden amilaz, lipaz ve proteaz enzimlerini üretebildikleri tespit edilmiştir. Ayrıca Sun vd. (2010) *B. subtilis*'inde amilaz üretebildiğini çalışmalarında göstermişlerdir. Wang vd. (2015) ise araştırmalarında, kanola çiçeğinin nektarında (3 farklı alandan toplandı) ve arıların bal midelerinde bulunan ballarda 'amilaz değerlerini' karşılaştırmış ve bal midelerinde en yaygın bakterilerin *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens* olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bal midesindeki amilaz miktarının, nektarinkinden daha fazla olduğunu ve bu değişimin bakteri konsantrasyonuyla ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlar, *B.*

subtilis ve *B. amyloliquefaciens*'in bal nektarını işleyerek bala dönüşümüne katkıda bulunduğunu göstermiştir. Çalışmamızda bal arılarından izole edilen *Bacillus* spp. suşlarının da amilaz, proteaz gibi enzimler üretebildikleri karakterizasyon çalışmaları ile belirlenmiştir. *B. subtilis* olarak tanımlanan E44/2A suşu, önceden yapılmış olan literatürdeki çalışmalara göre nektarın bala dönüşümüne katkı sağladığı söylenebilir.

Çalışmamızda izole edilen 4 suşun üçü β hemoliz oluştururken biri alfa hemoliz oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Suşlarımızın bu özellikleri dikkate alındığında biri (L38/3-4A) dışında probiyotik olarak kullanım için uygun olmadığını göstermektedir. Çalışma suşlarımızın L38/3-4A hariç diğer suşların kanlı besiyerlerinde beta-hemoliz yapmış olması probiyotik özelliklerinin olmayacağını göstermektedir. Bakterilerin hemolizin aktivitesi eritrositleri büyük oranda yıkıma uğratmış olmalarından dolayı patojenite faktörü olarak değerlendirilmektedir. Ancak L38/3-4A suşu alfa hemoliz özelliğinden dolayı probiyotik mikroorganizma olarak da değerlendirilebilir ve probiyotik açıdan farklı özellikleri araştırılabilir.

Hemolitik aktivite, mikroorganizmalarda hemolizin enzimlerinin ve sitotoksik fosfolipazların varlığının bir göstergesidir (Sorokulova vd., 2008; Pan vd., 2014; Garg vd., 2019). *Bacillus cereus*'un hemolitik aktiviteye sahip bir dizi protein salgıladığı bilinmektedir, ancak bunların bireysel etkilerini değerlendirmek çok zordur. Potansiyel patojenite faktörlerinden biri olan hemolizin II (HlyII), birkaç yıl önce keşfedilmiştir (Sinev vd., 1993; Budarina vd., 1994). Hemolysin II (HlyII), fırsatçı patojen *Bacillus cereus*'un gözenek oluşturan bir toksini olarak bildirilmektedir (Miles vd., 2002; Andreeva vd., 2007). İn vitro tarama sırasında gözlenen kırmızı kan hücrelerinin tam hemolizi (β), patojenik ve patojenik olmayan türleri ayırt edebilmek açısından önemlidir. Hemoliz yapmayan (γ -hemoliz) ve α -hemoliz *Bacillus* suşları için güvenli karakteristik olarak kabul edilir (Shin vd., 2012; Zulkhairi Amin vd., 2019). Bu açıdan bakteri izolatlarının kan toksisitesinin değerlendirilmesinde hemoliz özelliklerinin bilinmesi önemlidir. Saunders vd. (2007) tarafından izole edilen *Bacillus* N4 ve N5 izolatları kanlı agar plaklarında hemoliz aktivitesi göstermezken, diğer izolatlar β hemoliz tipi gösterdiği bildirilmiştir.

Katznelson (1955) *Bacillus* suşları için optimum büyüme sıcaklığının 30 ile 37 °C arasında olduğunu; 45 °C'de büyüme olmadığını tespit etmiştir. Hamdy vd. (2017) ise bal ve arı bağırsağından elde edilen *Bacillus* spp. izolatlarının, 70 °C'ye kadar sıcaklığa, üç mola kadar NaCl'ye ve %0,1 H₂O₂'ye karşı iyi tolerans gösterdikleri

tespit etmişlerdir. İzolatlar pH 9.0 ve 2.0'de sırasıyla %59 ve %64'ün üzerinde hayatta kalmayı başarmışlardır. Çalışmamızda kullanılan suşların ise farklı sıcaklıklarda (15-45-55°C) üreme profilleri değerlendirildiğinde 45°C'de maksimum verimle ürediği tespit edilmiştir. Suşlar asidik pH ortamında ürememiş (pH 3.0 ve 5.0) fakat, MRSB pH aralığı olan 5.8-6.2 aralığında iyi üredikleri, nötr/bazik pH aralığında (pH8.0) maksimum üreme gösterdikleri gözlenmiştir.

Safra kesesi, bağırsağın spesifik ve spesifik olmayan savunma mekanizmalarında önemli bir rol oynar. Bu nedenle bakterilerin gastrointestinal geçişi sırasında hayatta kalma ve asit ile safra tuzları gibi normal fiziksel ve kimyasal engellere direnme yeteneğini destekler, bu ise bir probiyotik için temel özellik olarak bilinir (Bezkorovainy, 2001; Mojgani vd., 2015). El Khoury vd. (2018) iki bal arısı bağırsak bakteri suşunun (*Parasaccharibacter apium* ve *Bacillus* sp. PC2) ve iki geniş spektrumlu probiyotik suşların (Bactocell® ve Levucell SB®) probiyotik etkisini ölçmüşlerdir. *N. ceranae* ile enfekte olan ve enfekte olmayan bal arıları, bu dört probiyotik aday ile profilaktik tedavi olarak şeker şurubunda 10^3 CFU/mL uygulanması yapılmış, iki haftalık tedaviden sonra hayatta kalma olasılıklarında önemli artışlar (%20-30) meydana geldiği bildirilmiştir. *Bacillus* sp. PC2 adayının profilaktik uygulaması kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 14., 20. ve 27. günlerde önemli ölçüde yüksek hayatta kalma olasılıkları ile korele edilmiştir. En yüksek hayatta kalma farkı 20. günde kaydedilmiş, PC2 adayının profilaktik dozunu alan arıların 83.0 ± 1.88 'i hayatta kaldığı, enfekte olmayan kontrol grubunun arılarının 50.5 ± 2.5 'i hayatta kaldığı bildirilmiştir. Çalışmamızdaki suşların asitli ortama direnç yeteneğinin bulunmaması, hemoliz aktivitelerine sahip olmaları vb. sebebiyle probiyotik mikroorganizma olarak kullanımlarının pek uygun olmadıkları, ancak antibakteriyel ve antifungal aktivite açısından değerlendirilebileceği gözlenmektedir.

Çalışmada suşların antibiyotik direnci içerip içermedikleri probiyotik suş olabilece potansiyeli için araştırıldı. Ayrıca antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi suşların risk faktörü içerip içermediklerini göstermesi açısından da önemlidir. Çoklu antibiyotik direnci içeren suşların probiyotik yada antimikrobiyal etken olarak kullanımını kısıtlamaktadır. Antibiyotik direnci aktarılabılır bir özellikte ise (plazmit veya transposon gibi) canlı suş olarak kullanımı çevre koşullarında önerilemez. Bakteriler arasında antibiyotik direncinin gelişmesi ciddi bir sağlık sorunu olmaya devam ederken, bu antibiyotiklere doğuştan veya doğal direnç içermesi konağın sağlığı için bir tehdit

oluşturmaz.

B. subtilis'in eritromisin, tetrasiklin, klindamisin ve kloramfenikol dahil olmak üzere bir dizi antibiyotiğe duyarlılığını gösteren bazı raporlar bulunmaktadır (Owusu-Kwarteng vd., 2017). Javaid vd. (2021) ipek böceği larvasından izole edilen DG1 (*B. halotolerans*), penisilin tetrasiklin amoksisilin, ampisilin, eritromisin'e duyarlı olduğu bildirilmiştir. Sorokulova (2008) çalışmasında *B. subtilis* (BS3) ve *B. licheniformis* (BL31) suşlarının ampisilin, kanamisin, vankomisin, streptomisin ve gentamisine duyarlı olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda izole edilen dört suşun çok sayıda antibiyotiğe karşı antimikrobiyal aktiviteleri disk diffüzyon yöntemiyle test edilmiş (Tablo 6, Şekil 11) ve antibiyotik direnç profilleri belirlenmiştir. Mevcut literatürlerle uyumlu olarak bu çalışmada test edilen 4 suşun antibiyotiklere karşı duyarlılıkları farklılık içermekteydi. Eritromisin ve basitrasin direnci, E38/3C ve E44/2A gentamisin direnci, E38/3A dışındaki üç suşun 3. kuşak sefalosporin olan seftazidime direnci ve E38/3C dışındakilerin nalidiksik asit ile novobiyosin direnci önemli bulunmuştur. En yüksek direnç içeren suşun E44/2A olduğu ve test edilen 16 antibiyotiğin 10'una karşı direnç içerdiği belirlendi. Suşların bazılarında ise çift zon oluşturduğu, saf suş olmalarına rağmen bazı antibiyotiğe karşı dirençli klonlar içerdikleri gözlenmektedir. Bu durumun özellikle aminoglikozit grubu antibiyotiklerde çok daha sıklıkla olduğu belirlenmiştir.

Antimikrobiyal ajanlara karşı mikrobiyal direnç, (i) içsel özelliklerden (doğal fenotipik özellikler) veya (ii) plazmitler ve transpozonlar gibi hareketli genetik elemanlar yoluyla direnç genlerinin edinilmesinden veya var olan genlerinin mutasyonundan kaynaklanır (EFSA, 2012). Bu tür kazanılmış veya içsel özellikler, bakterileri, antibiyotikleri bozundurma, antibiyotiklerin hücre dışına akış sistemi yoluyla ihraç edilmesi veya antibiyotik hedef bölgesinin değiştirilmesi yollarıyla spesifik antibiyotikleri hızlı bir şekilde etkisiz hale getirdikleri bilinmektedir (Butaye vd., 2003; EFSA, 2012; Roberts vd., 1999). Şimdiye kadar, bakteriyel antibiyotik direnci üzerine yapılan çalışmaların çoğu, esasen klinik izolatlarla (patojenik mikroorganizmalar) ve laktik asit bakterilerine odaklanılmıştır. *Bacillus* spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri hakkında genellikle az bilgi mevcuttur.

Basitrasin, *B. licheniformis* ve *B. subtilis* suşları (Neumüller vd., 2001, Ohki, 2003; Perez-Trallero vd., 2004) tarafından nonribozomal olarak üretilen dallı bir siklik dodesilpeptid antibiyotiktir. *B. licheniformis*'te biyosentetik operonun üç gen (*bacA*,

bacB ve bacC) içerdği rapor edilmiştir (Neumüller vd., 2001). Daha yakın zamanlarda, Bernard vd. (2005) bcrC ile homolojiye sahip bir genin, *B. subtilis*'te basitrasın direncinde rol oynayan undekaprenil pirofosfat fosfataz aktivitesine sahip bir proteini kodladığını bildirmiştir. Basitrasın direnci ve basitrasın biyosentez operonunun varlığı, çeşitli çalışmalarda eritromisin direnci ile ilişkilendirilmiştir (Ishihara vd., 2002; Mazza vd., 1992; Perez-Trallero vd., 2004). Ishihara vd. (2002). Basitrasın biyosentezi operon genlerini (bac) taşıyan *B. licheniformis* suşlarının eritromisine de dirençli olduğunu gözlemlemiştir. Basitrasın geçmişte hayvanların büyümesini desteklemek için kullanılmıştır. Ayrıca çoğu tropik ülkelerde belirgin bir şekilde insan ilacı olarak da kullanılmıştır (Butaye vd. 2003; Dibner ve Richards, 2005; Tsuda vd., 2002). Çalışmamızda suşların tümünde Basitrasın direnci ve Eritromisin orta duyarlılığı gözlenmesi bu çalışmalarla benzer olduğu sonucunu vermiştir. Suşların ilaç direnci taşıması probiyotik mikroorganizma olarak kullanımını kısıtlamakta, ancak enzim üretimi, antibakteriyel/antifungal madde üretimi veya ticari önemi olabilecek metabolitlerin üretimi açısından önemle ele alınması gerektiği düşünülmektedir.

Suşların geleneksel tanılarına göre sporlu ve aerobik / fakültatif aerobik bakteri olduğu ve farklı fiziksel/kimyasal özelliklere sahip olduğu belirlendi ancak günümüz koşullarında bu kriterler tür tanısı için yeterli olmadığı aşikardır. Bu nedenle 16s rRNA sekans analizi yapılmış (Tablo 7) ancak bu verilere göre de tür düzeyinde %100 belirlenememiş ve *Bacillus* spp. olarak tanımlanmıştır. Kesin tür tanısı için başka moleküler yöntemlerin kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmamızdaki *Bacillus* spp. suşlarının güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu yapılan ön çalışmalar ile belirlenmiş olup bu suşların moleküler karakterizasyonun yapılması, enzim aktivitelerinin ve ürettiği metabolitlerin antimikrobiyal etkinliklerinin kantitatif olarak belirlenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda MHB, PDA ve MRS besiyerleri farklı pH'ya ve kısmen farklı minerallere sahip besiyeri olup, bu besiyerlerinde üretilen kültürlerin filtratları antimikrobiyal aktivite açısından bir dizi Gram-negatif ve pozitif bakterilerle maya mantarına karşı test edilmiştir (Tablo 8).

MHB ve PDA besiyerinde üreyen kültür filtratlarında anti-pseudomonal aktivite ve maya mantarı olan *C. albicans*'a etkili oldukları gözlenirken, daha zengin besiyeri olan ve asidik pH değerine sahip MRSB besiyerinde üretilen kültür filtratı anti-pseudomonal aktivitesi düşük ancak sporlu basil olan *B. cereus* ve maya mantarına karşı

güçlü etkinlik içerdiği belirlendi. Bu sonuçlar kültür içindeki azot, karbon ve muhtemel mineral madde miktarı ve içeriğinin bakterilerin ürettiği antimikrobiyal metabolit özelliğini değiştirebildiğini göstermektedir. Dolayısıyla her bir bakterinin çeşitli metabolik özelliklere sahip olduğu, istenen özelliğe göre farklı besi ortamlarında üretilerek farklı bileşiklerin elde edilebileceği ve endüstriyel açıdan önemli olabilecekleri düşünülmektedir. Antimikrobiyal etkinliğin dar spektrumlu olması antimikrobiyal maddenin spesifik olabileceğini dolayısıyla daha önemli olabileceğini göstermektedir. Antimikrobiyal etken maddenin 55-60 °C ve üzeri sıcaklıklardan etkilenmiş olması etken maddenin organik bir bileşik olabileceğini göstermektedir.

Antimikrobiyal aktivite, izolatların gastrointestinal sistemdeki patojenik bakterileri inhibe etme kapasitesini değerlendirmek için önemlidir. Manhar vd. (2016) tarafından *B. subtilis* AMS6'nın *Salmonella entericatyphimurium*'a (MTCC 1252) karşı yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Toutiaee vd. (2022) çalışmasında *Bacillus* izolatları *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* ve *S. mutans* dahil olmak üzere hem Gram pozitif hem de Gram negatif patojenleri inhibe ederken, hiçbir *L. monocytogenes*'i inhibe edemediğini bildirmişlerdir. Belirtilen çalışmada da izolatlar arasında *B. subtilis* ZH05, ZB03 ve ZG025 test edilen antibiyotiklerin çoğuna dirençli olduğu belirtilmiştir.

Chalasanı vd. (2015) *Bacillus* spp. süpernatantlarını antimikrobiyal aktivite açısından test etmişlerdir. Agar difüzyon testiyle 24-48 saatlik inkübasyondan sonra mm cinsinden inhibisyon bölgesi kaydedilmiş, Gram negatif mikroorganizmalara karşı aktivite gözlemlendiği bildirilmiştir. Antimikrobiyal bileşik, 1 ila 10 arasında geniş bir pH aralığında stabil ve pH 12.0'da aktivitede hafif bir azalma olduğu, ayrıca farklı sıcaklıklarda stabil kaldığı (1 saat 80 °C'de % 80 aktivite, 30 dakika 100 °C'de % 75 ve 20 dakika 121 °C'de % 60 aktivite) tespit edildiği bildirilmiştir.

Efremenkova vd. (2019) *B. subtilis* 534 suşunun süpernatantın antimikrobiyal aktivitesi agar difüzyon yöntemi ile test edilmiş. *S. aureus* FDA 209P(MSSA) suşunda 22-30 mm, *S. aureus* INA 00761(MRSA) 25-27 mm, *S. epidermidis* INA 01121 suşunda 22-23 mm, *Aspergillus niger* INA 00760 suşunda 18-22 mm, *S. cerevisiae* RIA 259 suşunda ise 19-25 mm inhibisyon zonu tespit edildi. *E. coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşlarında antimikrobiyal aktivite gözlemlendiği bildirilmiştir.

Çalışmamızda *Bacillus* spp. suşlarının supernatantlarının maya mantarına olan etkinliği antifungal aktivitesini göstermektedir. Bu nedenle küf mantarlarına karşı kültür

filtratının test edilmesi önemli olup bitki patojeni üç küf mantarına karşı test edilmiştir (Tablo 9, Şekil 12). Kültür filtratının test edilen küf mantarlarına karşı güçlü antifungal aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Tüm suşların en yüksek antifungal aktiviteyi *B. cinerea*'ya karşı gösterdiği, *B. cinerea* ve *R. solani* için en iyi suşun E38/3A ve E38/3C olduğu, *Fusarium* sp. YP18B izolatu için ise E38/3C ve E44/2A suşları olduğu gösterdi. Tüm suşlara ait süpernatantların özellikle *B. cinera*'ya karşı çok güçlü, *R. solani*'ye karşı güçlü, ancak *Fusarium* sp.'ye karşı ise düşük düzeyde etkili olduğu belirlenmesi önemli bulunmuştur. Bu sonuç süpernatantın antifungal madde içerdiğini ve bitki hastalıklarına karşı mücadelede etkili olabileceğini göstermektedir. Suşlarda belirlenen bu özellik önemli bulunmuş bitki patojenlerine karşı kullanım düşünülürse başka testlerin de yapılması gerekmektedir. Bitki fungal hastalıklarıyla mücadelede kullanılması için bitki gelişimini teşvik edebilen bazı enzim aktivitelerine de bakılabilir.

Elkahoui vd. (2012) mantar önleyici aktivite, kültür ortamının bileşimi değiştirilerek optimize edilmiştir. Bu amaçla 1. ortam LB ortamı, 2. ortam glikoz (4 g/L) ve %50 yapay deniz suyu ile desteklenmiş LB ve 3. ortam M2 (10 g Malt özü, 4 g glikoz ve 1 L'de 4 g Maya özütü) %50 yapay deniz suyu olmak üzere üç sıvı ortam kullanılmıştır. Kültürlerin ekstraktları kağıt disklere emdirilip steril koşullar altında kurutulmuş ve *R. solani* inoküle edilmiş PDA plakalarına uygulanmıştır. Plakalar 25°C'de 24 saat inkübe edilmiş, ardından inhibisyon bölgesinin çapı değerlendirilmiştir. 1. ortam *B. subtilis* SE15 kültürünün aktivitesinin optimum seviyede etkinlik gösterdiği, 2. ortamın düşük antifungal etkinlik gösterdiği, 3. ortamın ise antifungal etkinlik göstermediğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar çalışmamız ile benzer olup besiyeri içeriğine göre farklı maddeleri üretebildiklerini göstermektedir.

Grata ve Nabralık (2012) yapmış oldukları çalışmada *Bacillus* KF2 ve *Bacillus* BK2'nin kültürlerinden elde edilen süpernatantların *Fusarium* spp.'ye karşı antifungal aktivitelerini, PDA ve Czapek-Dox ortamında test etmişlerdir. KF2 kültürünün aktivitesi, BK2'ye göre daha yüksek bulunmuştur. Ortam açısından değerlendirme yapıldığında Czapek-Dox, PDA ortamından daha yüksek antifungal aktiviteye sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Abdelmoteleb vd. (2017) beş patojenik mantarın büyümesi üzerine *B. subtilis* suşu 'ALİCA'nın antifungal etkinliği test edilmiş, 75 ml PDA ortamı ile karıştırılmış 25 ml süpernatant petri kaplarına dökülmüş ve her bir mantardan diskler alınarak besiyeri ortasına inoküle edilmiş. Anlamlı olarak en yüksek inhibisyonun (68.6 ± 0.69) A.

alternata için elde edildiği, bunu *Sclerotium rolfsii* (*S. rolfsii*) (58.8 ± 1.2), *B. cinerea* (47.86 ± 1.3), *Macrophomina* sp. (43.53 ± 1.1) izlediği bildirilmiştir. *Colletotrichum gloeosporioides* (*C. gloeosporioides*) (38.43 ± 2.9), *B. subtilis* suşu “ALİCA”nın süpernatantından en az etkilenen tür olmuştur.

Çalışmamızda biyoaktif metabolitin çeşitli çözücüler kullanılarak ekstre edilmesi amaçlandı, ancak en uygun ekstraksiyon solusyonu olarak etil asetat belirlendi ve kültür süpernatantın etil asetat ekstraktının antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri araştırıldı (Tablo 10, Şekil 13). Çalışmada mineral ve karbon içeriği zengin iki farklı (MYPGP ve MRS) besiyerlerinde üretilen kültürün süpernatantı etil asetat ile ekstre edildi ve kuru ağırlık cinsinden üretilen metabolitlerin miktarı belirlendi (Tablo 11). Antimikrobiyal aktivite MRS agarda iyi olduğu belirlenmişti ancak MYPGP agarda metabolit üretiminin daha zengin içeriğine paralel olarak daha fazla olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla her iki besiyerinin metabolit üretimi için iyi olduğu ancak MYPGP'nin daha uygun olduğu gözlemlendi. Antimikrobiyal aktivite açısından 11 farklı mikroorganizmaya karşı test edildiğinde her iki besiyerinde farklı metabolit ürettiği ve farklı grup bakteriyeye karşı etkili olduğu belirlendi (Tablo 12, Şekil 14). Bu sonuç bakterilerin çok farklı antimikrobiyal etkili maddeler üretebildiğini göstermiştir.

Etil asetat ekstraktları yedi farklı bitki patojeni ve saprofit küf mantarına karşı 25, 50 ve 100 mg/ml konsantrasyonlarda test edildiğinde, konsantrasyon oranına göre ekstraselüler ortama bırakılan metabolitlerinin güçlü antifungal aktivite içerdiği gözlemlenmiştir (Tablo 13, Şekil 15). Tüm suşların 25 mg/ml konsantrasyonundaki ekstraktına karşı *B. cinerea* ve *S. sclerotiorum*'un çok duyarlı olduğu, saprofit ve yararlı mantar türlerinin etkilenmediğinin gözlemlenmesi önemli bulunmuştur. Bu sonuçlar *Bacillus* metabolitinin güvenli bir şekilde bitki patojeni suşlara karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Eğer suşların ticari kullanımında temel hedef antifungal aktivite açısından değerlendirilecek olursa ilave bazı enzim özelliklerinin de bakılması gerekmektedir. Bu amaçla özellikle bitki gelişimini teşvik eden indol asetik asit, ACC deaminaz gibi bazı aktiviteler de test edilmelidir. Eğer bu tür aktiviteleri varsa suşların güçlü bir bitki gelişimini teşvik eden ve antifungal aktiviteye sahip olan biyokontrol ajan olarak kullanımı söz konusu olacaktır. Suşların farklı yapıda polimer madde (Şekil 16) üretiminin de endüstriyel açıdan irdelenmesi gerektiği düşünülmektedir. SEM analizi ile yapılan incelemede (Şekil 17) hücre yüzeyinde tomurcuklanma şeklinde yaklaşık 0.3 mikrometre büyüklüğünde veziküler yapılar

oluştugu belirlenmiştir. Bu yapıların control *B. cereus* suşunda olmadığı ancak E44/2A suşunda gözlenmiştir. Bu polimer yapıların daha detaylı çalışmalarla aydınlatılması gerekmektedir. Desmyttere vd. (2019) çalışmalarında mikroskobik gözlemlere dayanarak, fengycin tedavileri altında olan bitki patojeni mantarı olan *Venturina inaequalis* üzerinde tutarlı morfolojik değişiklikler yaptığı belirlenmiş. *B. subtilis* lipopeptitlerinin morfolojik hasarları diğer mantarlarda da bildirilmekle birlikte *Venturina* suşlarında çok sayıda vezikül benzeri şiş yapılar oluşturduğu gözlenmiştir.

Günümüzde antifungal duyarlılık testleri, yeni geliştirilen ilaçların in vitro etki spektrumunu belirlemek direnç oranlarına ilişkin epidemiyolojik veriler elde etmek ve antifungallerle klinik izolatların in vitro duyarlılıklarını inceleyerek klinik yanıtla ilişkin öngöründe bulunmak için kullanılmaktadır (Espinell-Ingroff ve Pfaller, 2008). Antifungal duyarlılık testi için kullanılan yöntemler (Arendrup vd., 2011; Espinell-Ingroff vd. 2011); Makrodilüsyon, Mikrodilüsyon, Kolorimetrik mikrodilüsyon, Spektrofotometrik mikrodilüsyon, Agar makrodilüsyon, Agar difüzyon, Disk difüzyon ve E test şeklinde tanımlanabilir. Bu testlerin geliştirilmesi ve standardizasyonu mikoloji alanında önemlidir. Çalışmamızda antifungal aktivite belirlemek için agar dilüsyon ve agar difüzyon yöntemleri kullanılmıştır. İlave olarak son yıllarda kullanılan bir metod olarak misel patlatma deneyi de etkenin etki şeklini makroskobik olarak gözlenebilen önemli bir parametre olarak bildirilmektedir (Revathi vd., 2013). Özellikle bitki patojeni mantarların gelişiminin inhibisyonunda etkinlik testi olarak kullanılabilecek önemli bir metod olarak gözlenmektedir.

Fusarium, tarımsal önemi olan bitki patojenlerinden oluşan karmaşık bir ascomycete mantar cinsidir. Ekinlerde önemli verim kayıplarına yol açan *Fusarium* enfeksiyonunu kontrol etmek zordur. Çalışmamızda E44/2A suşunun ekstraktı, ara faz ve kültür supernatantlarının *F. oxysporum*'da hif patlatma deneyi yapılmış (Şekil 18) ve suşun ekstrakt ile supernatantlarının hem kültürün üremesini hem de hifaların patlattığı görsel olarak belirlenmiştir. Bu sonucun gözlenebilir olduğunun belirlenmesinden sonra *Bacillus* spp. suşlarının hem kültür süpernatantı hem de etil asetat ekstraktı ve ara fazı olarak etil asetatla elde edilen kısımları bitki patojeni *R. solani* ve *F. oxysoprum* (Tablo 14, Şekil 19) hem de ekstraktı test edilmiş 24 ve 48. saatleri incelenmiştir. Ekstrakt ve süpernatantların her iki suşta da büyümenin engellendiği görsel olarak izlenmesi anti fungal aktivitenin varlığını ve hücre lizisini göstermektedir. Tüm kültürlerin ara fazlarının her iki suşa karşı güçlü etkili olması etken maddenin ara fazda olduğunu yani

kültürlerde gözlene polimer yapıların aslında güçlü antifungal aktivite içerdiğini göstermektedir. *Bacillus* cinslerinde antifungal aktivite olarak iturin, sürfaktan vb. polimerler olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda da suşlarımızın üretmiş oldukları ve elimizde olan imkanlar ile karakterize edemediğimiz büyük yapılı polimerlerin, muhtemelen iturin, sürfaktan vb. bileşiklere benzer oldukları düşünülmektedir ancak bu konuda başka çalışmaların yapılması gerekmektedir. Dang vd. (2019) yaptıkları çalışmada izole ve karakterize ettikleri *Bacillus* spp. suşlarını antibiyotik ve siklik lipopeptitlere ait olan iturinler ürettiği, hemolitik ve antifungal özellikleri gösterdiği belirtilmiştir. Bu sonuç çalışmamızda gözlenen antimikrobiyal, antifungal ve hemolitik aktivite içermeleri açısından benzer olduğu düşünülmektedir. Ancak makro yapıların karakterize edilmesi gerekmektedir. Revathi vd. (2013) çalışmalarında *Bacillus* sp.101 ve *Bacillus* sp. 102 suşlarının antifungal aktivitesini belirlemek amacıyla, bazı funguslara (*Benjaminiella poitrasii*, *S. rolfsii*, *A. niger*, *Fusarium* sp.) karşı, kültür filtratlarını kullanarak hif patlatma testi uygulamış, bu iki suşun tüm funguslara karşı antifungal aktivite gösterdiğini (kitinaz aktivitesi) ve *Bacillus* sp. 102 suşunun maksimum aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca *Bacillus* sp. 102 suşuna ait biyoaktif maddenin etil asetat ve kloroform ekstraktlarında, hif patlatma aktivitesinin etkilenmediği gözlenmiştir. Kloroform ekstraktının, etil asetatdan daha verimli hif patlatma aktivitesi sergilemesinden ötürü, ekstraksiyon için en uygun çözücü olduğunu tespit etmişlerdir. Mycosubtilin'in birkaç fitopatojenik mantarı inhibe ettiği zaten gösterilmiştir (Leclère vd., 2005; Mejri vd., 2017).

Kumar Singh vd. (2014) yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. AR2 suşunun, suda çözünür karbon kaynakları üzerinde büyürken lipopeptit tipi biyosüpfaktan ürettiğini bildirmiştir. Sükroz takviyeli minimal tuz ortamında (MSM) maksimum biyosüpfaktan üretimi gözlemlemişlerdir. Dekstroz, sakaroz ve gliserol takviyeli MSM'de, AR2 suşu, süpfaktin, iturin ve fengisinin bir karışımı olarak lipopeptitleri üretti. Ancak maltoz, laktoz ve sorbitol varlığında sadece iturin üretilmiştir. Lipopeptitlerdeki bu substrata bağlı kompozisyon varyasyonu, antifungal aktiviteyi önemli ölçüde etkilemiştir (Kumar Singh vd., 2014). Çalışmamızda MRSB içine ekstradan farklı karbon kaynakları eklenerek yapılan kültür süpernatantın antifungal aktivitesinin farklı olduğu belirlenmiştir (Tablo 15). *R. solani* suşuna etkinlik en yüksek glikoz ve sükroz varlığında, *F. oxysporum* suşuna ise nişastanın varlığında en etkin antifungal aktivite gösterdikleri belirlendi. Bu sonuç farklı karbon kaynaklarına göre farklı antifungal

maddeleri ürettiği gözlenmektedir.

Çalışmamızda *Bacillus* spp. türlerinin invitro antifungal madde içeriklerinin belirlenmesi amacıyla taze kültür hücrelerinin sonikatör yardımıyla patlatılmasından elde edilen “hücre kültür lizatı süpernatantlarının” antifungal aktivitelerine bakıldı (Tablo 16, Şekil 21). Tüm suşların *R. solani*'ye karşı güçlü etkili olduğu, E44/2A suşunun ise her iki fungusa karşı güçlü antifungal etkiye sahip olduğu belirlendi. Bu sonuç antifungal aktiviten içeren maddelerin bakterinin hem ekstraselüler hem de intraselüler maddeleri olarak varlığı gözlenmiştir. Park vd. (2019), *C. gloeosporioides* üzerinde surfaktinli (*B. velenzenis*'ten) vezikül benzeri yapılar göstermiştir. Miselyumun yüzeyi engembeli ve alışılmadık şekilde şişmiş ve pürüzlü olduğu, bu da peptidin mantar hücre duvarı bileşenlerini (kitin, glukanlar ve glikoproteinler) antifungal aktivite sergilemek için doğrudan etkilediğini düşündürdüğü bildirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar bu verilerle uyumlu olduğu gözlenmektedir.

Çalışmada E44/2A suşunun sıvı kültür filtratının asetat ekstraktı, kimyasal yöntemlerle kısmi saflaştırıldı ve NMR spektrumlarına göre 4 madde karakterize edildi. Ancak maddelere in hiçbirisi maya mantarına karşı antifungal aktiviteye sahip olmadığı gözlemlendi. En güçlü antibakteriyel aktivite $C_{18}H_{34}O$ ve $C_8H_{11}NO$ nolu maddelerin Gram negatif ve pozitif bakterilere karşı içerdiği belirlendi (Tablo 17, Şekil 22). Bu maddelerin aslında polimer yapı olarak SEM'de gözlenen yapıların dalları ya da kısımları olduğu düşünülmektedir. Metanol çözücünde elde edilen $C_{18}H_{34}O$ maddesi en etkili antibakteriyel bileşik olduğu belirlendi. Ancak bu alanda öncelikle polimer yapıların aydınlatılması gerekmektedir. Elde edilen 4 maddenin şekli incelendiğinde (Şekil 23), 1 nolu maddenin azot halkası, iki nolu maddenin disakkarit bileşiği, üç nolu maddenin hidrokarbon ve dört nolu bileşiğin ise benzen halkası içeren bir madde olduğu gözlenmektedir. Kaynaklarda yapılan incelemede bu yapıların sürfaktanların aksesuar molekülleri olduğu gözlenmektedir. Maddelerin HNMR ve C-NMR analizleri Şekil 24-31 olarak verilmiştir.

Test edilen suşların süpernatantlarında antioksidan aktivite araştırıldı (Tablo 18-19, Şekil 32). Hesaplanan TEAC değerlerine bakıldığında antioksidan aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi. En aktif olandan daha az aktif olana doğru suşların lizatları sıralandığında $E38/3A > E44/2A > E38/3C > L-38-3/4A$ şeklinde olduğu belirlenmiştir.

Fenolik bileşikler, diyet proteinlerinden türetilen aromatik aminoasitlerin deaminasyonu ile sindirim süreci yoluyla gastrointestinal kanalda salınır (Singhal vd.,

2019). DPPH ve ABTSC serbest radikal süpürme deneyleri, doğal antioksidanları (LAB'nin antioksidan aktivitesi) değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır (Sun vd., 2020). Kolesterol azaltma, a-glukozidaz inhibisyonu ve radikal temizleme aktiviteleri üzerine yapılan in vitro çalışmalar, sağlığı geliştirici çeşitli faydaları olan probiyotik suşların seçiminde önemli parametreler olarak kabul edilmiştir. Reaktif oksijen türleri (ROS), insan vücudunda çeşitli koşullar altında farklı endojen sistemler tarafından üretilir. İnsan sistemindeki aşırı serbest radikaller, lipidler, proteinler ve deoksiribonükleik asit (DNA) dahil olmak üzere makromolekülleri olumsuz etkileyerek yaşlanmaya, artrit, kardiyovasküler hastalıklara, kansere, diyabete ve nörodejeneratif hastalıklara yol açar (Ragul vd., 2020). İzolatların antioksidan kapasitesini yansıtmak için tek bir antioksidan özellik testinin sınırlandırılması nedeniyle, probiyotik suşların antioksidan aktivitelerini araştırmak için hem ABTSC hem de DPPH radikal süpürme kapasiteleri kullanıldı (Cao vd., 2019; Ragul vd., 2020).

Bu çalışma ülkemizde arılardan izole edilen, antifungal/bakteriyel metabolit ürettiği ve antioksidan aktivite içerdiği bildirilen ilk çalışma olduğu belirlenmiştir. Her bir suşun özellikle moleküler olarak tanımlanması için daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği gözlenmiştir. Suşların farklı besi ortamında üretildiklerinde farklı bileşikler üretebildikleri, geniş sıcaklık, tuzluluk ve pH değerlerinde üreyebildikleri gözlenmiştir. Dolayısıyla amaca özgü hedefler belirlenerek farklı kullanım sahaları olabileceği ortaya konmuştur. Çalışmada antifungal aktivite belirlemek amacıyla yola çıkılmış, güçlü bitki patojeni suşlara karşı antifungal aktivite yolları belirlenmiştir. Ayrıca güçlü enzim aktiviteleri de belirlenmiştir ancak suşların fungal hastalıkların biyokontrolünde kullanılması düşünüldüğünde bitki gelişimini teşvik eden bazı enzim ve aktivitelerin de bakılması gerektiği ortaya çıkmıştır. Çeşitli enzimleri üretebilme becerileri dikkate alındığında önemli bir endüstriyel materyal olabilecekleri gözlenmiştir. Ürettiği metabolitlerin karakterizasyonunun önemli olacağı ve daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği belirlenmiştir. Mevcut çalışmada sadece bir izolatta 4 yeni madde saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Ancak çalışmanın geneline bakıldığında çok sayıda maddeler içerdikleri ve ekonomik önemi olabilecek bu maddelerin saflaştırılması çalışmalarının devam ettirilmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Bal arılarında, bal ve arı ekmeği gibi ürünlerinde çok çeşitli bakteri türleri bulunur (Wang vd. 2014; Lozo vd. 2015). Bu bakterilerin çoğunun bal arısı bağırsak mikrobiyomu ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Arı ve arı ürünlerinin bozulmadan

patojenik bakterilerden koruyan ve nihayetinde bir dizi bakteriyel, viral ve mantar hastalığına karşı dirençlerini artıran biyokontrol ajanları olarak hareket ettiği varsayılmaktadır (Hamdi vd., 2019; Ngalimat vd., 2019; Daisley vd., 2020). *Bacillus* türleri için ele alınan en önemli probiyotik etkiler arasında, konakçıyı birçok hastalığa karşı koruma sağlayan antibakteriyel potansiyel içermeleridir (Urdaci ve Pinchuk, 2004). Ancak suşlarımızın gerek hemolitik aktivitelerinin varlığı gerekse bir çok antibiyotiğe karşı olan dirençlilikleri nedeniyle insan yada arılar için probiyotik mikroorganizma olarak önerilememektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından sağlanan kılavuzlara dayanarak, bir suşun etkili bir probiyotik mikroorganizma olarak değerlendirilmesi için bazı temel gereksinimler bulunmaktadır. Bunlar; gastrointestinal koşulları tolere etme, mide asidi ve safra konsantrasyonlarında hayatta kalma, bağırsak epitel hücrelerine yapışma, antimikrobiyal aktivite ve antibiyotiğe dirençli genlerden yoksun olmaları şeklinde özetlenmektedir (FAO/WHO, 2006). Dolayısıyla suşlarımızın bu açıdan değerlendirilemeyeceği ortaya konmuştur.

Çalışma sonucumuz özet olarak değerlendirilecek olursa elde edilen ve kısmi karakterizasyonu yapılan suşlarımızın güçlü bitki patojeni funguslara karşı etkin biyokontrol ajanı olabilecekleri ve de endüstriyel önem arzeden bir dizi enzim üreticileri olarak kullanılabilecekleri gözlenmektedir.

5. ÖNERİLER

Zararlı mikroorganizmalara karşı kimyasal uygulamalarda; ilaç kalıntılarının insanlara ve diğer canlılara olumsuz etkileri, patojenlerin kullanılan kimyasallara dayanıklılık kazanması, bazı patojen sporlarının ilaç kullanımına rağmen uzun yıllar toprakta canlı kalması gibi olumsuz faktörler bulunmaktadır. Bu nedenle gelişmiş ülkelerde hızla kimyasal uygulamalar yerine, doğal biyolojik kontrol etmenlerinin kullanımına yönelik çalışmalar ağırlık kazanmıştır (Mukerji and Garg, 1988). Bu sebeple çalışmamız doğal, yeni, yerli ve ekonomik şartlarda üretilebilen biyoaktif maddeleri bilime kazandırmak açısından büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki öneriler dikkate alınarak daha kapsamlı çalışmalar yapılabilir ve biyolojik maddelerin kullanıma sunulması sağlanabilir.

1. Çalışmada kullanılan *Bacillus* sp. suşları *Apis mellifera*'dan (Avrupa Bal Arısı) izole edilmiştir. Belirlenen *Bacillus* cinsi bakterilerin geçici floraya ait oldukları düşünülmekte ancak arı sağlığı üzerine olumlu yada olumsuz etkinliği olup olmadığı araştırılabilir.

2. *Bacillus* spp. suşlarının biyoaktif metabolit üretim potansiyelleri çeşitli çalışmalarda bilinmektedir. Bu çalışmada her ne kadar geçici flora elemanı olarak düşünülmüş olsalar da şeker toleranslarının yüksek olması sebebiyle, arıların bal üretim sürecine katkı sağlayabilecekleri düşünülmektedir. Bu açıdan değerlendirilerek yeni çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

3. Suşlardan L38/3-4A ve E38/3C'nin yüksek tuz toleransına sahip olmaları dikkate değer bulunmuştur.

4. Suşların özellikle amilaz ve selüloz aktivitelerinin güçlü olması, enzim üretiminde endüstriyel açıdan kullanılabilir olduklarını düşündürmektedir. Ancak enzim karakterizasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

5. Suşların özellikle bitki patojeni funguslara karşı güçlü etkili biyoaktif metabolit üretimi bu çalışmanın ana temasını oluşturmakta olup, üretilen metabolitin her ne kadar kaynaklarda sürfaktan grubu bileşikler olduğunu düşündürse de kesin tanıları için ekstra çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. Çalışmada suşların biyoaktif metabolit üretimi optimize edilmiş olmasına rağmen kitlesel üretimi yapılarak ekstraktın karakterizasyonu daha detaylı yapılması gerekmektedir.

7. Antibakteriyel aktivite belirlenen metabolitlerin ekonomik açıdan kazanım sağlanabilir bir madde olup olmadığı konularında da detaylı çalışma yapılması gerekmektedir.

8. Bitki patojeni mantarlara karşı antifungal aktiviteleri bitki ile birlikte yapılacak denemelerde gözlenmelidir. Bu amaçla saksı yada toprak denemeleri ile patojenlere karşı anti fungal biyolojik preparat olabilme özellikleri araştırılmalıdır.

9. Sağlıklı arı bağırsaklarından izole edilen *Bacillus* spp. suşlarından elde edilen biyoaktif metabolitlerin, bazı arı hastalıklarının etkeni olan mikroorganizmalara karşı önleyici ve tedavi edici potansiyelleri araştırılabilir.

10. Suşların moleküler karakterizasyonu amacıyla 16s rRNA sekans analizi yapılmış olup tür tanısı olarak yeterli bulunmamıştır. Yalnızca E44/2A suşu %100 benzerlik ve örtüşme ile *B. subtilis* olarak tanımlanmıştır. Diğer suşların kesin tanıları için diğer moleküler karakterizasyon testleri yapılarak kesin tür tanımlarının yapılması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdelmoteleb, A., Troncoso-Rojas, R., Gonzalez-Soto, T., González-Mendoza, D. (2017). Antifungal Activity of Autochthonous *Bacillus subtilis* Isolated from *Prosopis juliflora* against Phytopathogenic Fungi. *Mycobiology*, 45(4),385–391.
- Abderrahmani, A., Tapi, A., Nateche, F., Chollet, M., Leclere, V., Wathelet, B. (2011). Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 92(3),571–81. 146.
- Abriouel, H., Franz, C.M., Ben, N., Galvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Reviev*, 35(1),201–32.
- Acet, T., Özcan, K. (2018). Investigation of some biological activities of horsetail (*Equisetum arvense*) plant used for medicinal purposes in Gümüşhane province. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 5(13),1810–1814.
- Ahn, J.H., Hong, I.P., Bok, J.I., Kim, B.Y., Song, J., Weon, H.Y. (2012). Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *Journal of Microbiology*, 50,735–745.
- Aleti, G., Sessitsch, A., Brader, G. (2015). Genome mining: prediction of lipopeptides and polyketides from *Bacillus* and related Firmicutes. *Comput Struct Biotechnol Journal*, 13,192–203.
- Alippi, A.M., Reynaldi, F.J. (2006). Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood of honey bees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91,141–146.
- Andreeva, Z.I., Nesterenko, V.F., Fomkina, M.G., Ternovsky, V.I., Suzina, N.E., Bakulina, A.Y., Solonin, A.S., Sineva, E.V. (2007). The properties of *Bacillus cereus* hemolysin II pores depend on environmental conditions. *Biochim Biophys Acta*, 1768,253–263.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26),7970–7981.
- Arendrup MC, Park S, Brown S, Pfaller M, Perlin DS. (2011). Evaluation of CLSI M44-A2 disk diffusion and associated breakpoint testing of caspofungin and micafungin using a well-characterized panel of wild-type and fks hot spot mutant candida isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(5),189–15. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01373-10> PMID:21357293 PMCID:3088242
- Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep*, 30(1),108–60.
- Aunpad, R., Panbangred, W. (2012). Evidence for two putative holin-like peptides encoding genes of *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr Microbiol*, 64(4),343–

8.

- Aygan, A. (2008). Haloalkalofil *Bacillus* sp. izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi. FBE. Çukurova, Türkiye, 200 s.
- Azevedo, A.C., Bento, C.B., Ruiz, J.C., Queiroz, M.V., Mantovani, H.C. (2015). Distribution and genetic diversity of bacteriocin gene clusters in rumen microbial genomes. *Appl Environ Microbiol*, 81(20),7290–304.
- Baltz, R.H. (2014). Combinatorial biosynthesis of cyclic lipopeptide antibiotics: a model for synthetic biology to accelerate the evolution of secondary metabolite biosynthetic pathways. *ACS Synth Biol*. 3(10),748–58.
- Banala, S., Ensle, P., Sussmuth, R.D. (2013). Total synthesis of the ribosomally synthesized linear azole-containing peptide plantazolicin a from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Angew Chem Int Ed*, 52(36),9518–23.
- Barbosa, T.M., Serra, C.R., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., Henriques, A.O. (2005). Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*, 71,968–978.
- Béchet, M., Caradec, T., Hussein, W., Abderrahmani, A., Chollet, M., Leclère, V., Dubois, T., Lereclus, D., Pupin, M., Jacques, P. (2012). Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp.. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer Verlag, 95 (3), pp.593–600. ff10.1007/s00253-012-4181- 2ff.
- Beier, S., and Bertilsson, S. (2013). Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. *Front. Microbiol*, 4,149. doi: 10.3389/fmicb.2013.00149
- Benzie, I. F., and Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*, 15–25.
- Bernard, R., Ghachi, M.E., Mengin-Lecreux, D., Chippaux, M., Denizot, F. (2005). BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J Biol Chem*, 280,28852–28857.
- Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr*, 73,399–405.
- Bommuraj, V., Chen, Y., Birenboim, M., Barel, S., Shimshoni, J.A. (2021). Concentration- and time-dependent toxicity of commonly encountered pesticides and pesticide mixtures to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Chemosphere*, 266, 128–974.
- Boottanun, P., Potisap, C., Hurdle, J.G., Sermswan, R.W. (2017). Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. *AMB Express*, 7,16. doi:10.1186/s13568-016-0302-0.
- Bowers, A.A., Walsh, C.T., Acker, M.G. (2010). Genetic interception and structural characterization of thiopeptide cyclization precursors from *Bacillus cereus*. *J Am*

Chem Soc, 132(35),12182–4.

- Budarina, Z.I., Sinev, M.A., Mayorov, S.G., Tomashevski, A.Y., Shmelev, I.V., Kuzmin, N.P. (1994). Hemolysin II is more characteristic of *Bacillus thuringiensis* than *Bacillus cereus*. *Arch Microbiol*, 61,252–257.
- Butaye, P., Devriese, L.A., Haesebrouck, F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 16,175–188.
- Caetano, T., Barbosa, J., Moesker, E., Sussmuth, R.D., Mendo, S. (2014). Bioengineering of lanthipeptides in *Escherichia coli*: assessing the specificity of lichenicidin and haloduracin biosynthetic machinery. *Res Microbiol*, 165(7),600–4.
- Can, Z., Baltas, N. (2016). Bioactivity and Enzyme Inhibition Properties of *Stevia rebaudiana*’. *Current Enzyme Inhibition*, 12,188–194.
- Cao, Z., Pan, H., Li, S., Shi, C., Wang, S., Wang, F., et al. (2019). In vitro evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from yunnan de’ang pickled tea. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 11,103–112. doi: 10.1007/s12602-018-9395-x
- Carlisle, G.E., Falkinham, J.O. (1989). Enzyme activities and antibiotic susceptibility of colonial variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11),3026–3028. doi: 10.1128/aem.55.11.3026-3028.1989.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyoliquefaciens*. *Microb Biotechnol*, 8(2),281–95.
- Chalasani, A.G., Dhanarajan, G., Nema, S., Sen, R., Roy, U. (2015). An antimicrobial metabolite from *Bacillus* sp.: significant activity against pathogenic bacteria including multidrug-resistant clinical strains. *Front. Microbiol.* 6,1335. doi: 10.3389/fmicb.2015.01335.
- Chaudhary, H.S., Yadav, J., Shrivastava, A.R., Singh, S., Singh, A.K., Gopalan, N. (2013). Antibacterial activity of Actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 4(2),118–123.
- Chavan, S. B., and Deshpande, M. V. (2013). Chitinolytic enzymes: an appraisal as a production of commercial potential. *Biotechnol Prog*, 29,833–846. doi: 10.1002/btpr.1732
- Claus, D. (1992). A standardized Gram staining procedure. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 8(4),451–452. doi: 10.1007/bf01198764. PMID: 24425522.
- Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J.B., Kosaric, N. (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl Environ Microbiol*, 42(3),408–412.
- Corby-Harris, V., Maes, P., Anderson, K.E. (2014). The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS ONE*, 9,e95056.

- Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2013). Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*, 11(2),95–105.
- Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z. (2012). Class IIa bacteriocins: diversity and new developments. *Int J Mol Sci*, 13(12),16668–707.
- Dang, Y., Zhao, F., Liu, X., Fan, X., Huang, R., Gao, W., Wang, S., Yang, C. (2019). Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 through metabolic engineering and culture conditions optimization. *Microb Cell Fact*, 18,68. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1121-1>
- Desmyttere, H., Deweer, C., Muchembled, J., Sahmer, K., Jacquin, J., Coutte, F., Jacques, P. (2019). Antifungal Activities of *Bacillus subtilis* Lipopeptides to Two *Venturia inaequalis* Strains Possessing Different Tebuconazole Sensitivity. *Front Microbiol*, 10,1–10. | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02327>
- Dibner, J.J., Richards, J.D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci*, 84,634–643.
- Dillon, R.J., Dillon, V.M. (2004). The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol*, 71–92.
- Doğaroğlu, M., Samancı, T. (2006). Balda yörelere göre kalıntı hile ve orijin tespit projesi, Teknoloji ve Yenilik Destek Programları Başkanlığı (TEYDEB) Arıcılık Raporu, Ankara, Türkiye.
- Donkersley, P., Rhodes, G., Pickup, R.W., Jones, K.C., Power, E.F., Wright, G.A., Wilson, K. (2017). Nutritional composition of honey bee food stores vary with floral composition. In : *Oecologia*. 185,4, p.749–761.
- Earl, A.M., Losick, R., Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol*, 16,269–275.
- Efremenkova, O., Gabrielyan, N., Malanicheva, I., Demiankova, M., Efimenko, T., Rogozhin, E., Sharapchenko, S., Krupenio, T., Davydov, D., Kornilov, M. (2019). Antimicrobial Properties of the Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 534. *SL Gastroenterology*, 2(1),119.
- El Khoury, S., Rousseau, A., Lecoœur, A., Cheaib, B., Bouslama, S., Mercier, P., Demey, V., Castex, M., Giovenazzo, P., Derome, N. (2018). Deleterious Interaction Between Honeybees (*Apis mellifera*) and its Microsporidian Intracellular Parasite *Nosema ceranae* Was Mitigated by Administering Either Endogenous or Allochthonous Gut Microbiota Strains. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6–58, DOI=10.3389/fevo.2018.00058
- Elkahoui, S., Djébalı, N., Tabbene, O., Hadj-Brahim, A., Mnasri, B., Shaaban, M., Limam, F. (2012). Evaluation of antifungal activity from *Bacillus* strains against *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Biotechnology*, 11,4196–4201.
- Elshaghabe, F.M.F., Rokana, N., Gulhane, R.D., Sharma, C., Panwar, H. (2017). *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Front Microbiol*, 8,1490. doi: 10.3389/fmicb.2017.01490.
- Engel, P., Moran, N.A. (2013). Functional and evolutionary insights into the simple yet specific gut microbiota of the honey bee from metagenomic analysis. *Gut Microbes*, 4,60–65.

- Erkan, C., Aşkın, Y. (2001). Van İli Bahçesaray İlçesinde Arıcılığın Yapısı ve Arıcılık Faaliyetleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, *Tarım Bilimleri Dergisi*, 11(1),19-28.
- Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Fuller, J., Johnson, E., Pelaez, T., Turnidge, J. (2011). Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for caspofungin and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 Document), *Antimicrob Agents Chemother*, 5(6),2855–9. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01730-10> PMID:21422219 PMCID:3101428
- Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M. (2007). Susceptibility tests methods: yeasts and filamentous fungi ‘‘Murray PR, Baron EJ, Jorgensen HJ, Pfaller MA (ed). Manual of Clinical Microbiology, 9. baskı’’ s.1972–86, ASM Press, Washinton DC.
- EUCAST, (2016). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0.
- European Food Safety Authority (2012). Scientific opinion on guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J*, 10,2740.
- Finking, R., Marahiel, M.A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu Rev Microbiol*, 58,453–88.
- Fitri, L., Yasmin, Y., Fauziah, Septiani, D.A., Suhartono. (2020). Characterization of BSL6 isolates isolated from honeybee hive and to determine its antibacterial activity. *Biodiversitas*, 21,4859-4865.
- Flühe, L., Knappe, T.A., Gattner, M.J., Schäfer, A., Burghaus, O., Linne, U. (2012). The radical SAM enzyme AlbA catalyzes thioether bond formation in subtilisin A. *Nat Chem Biol*, 8(4),350–7.
- Flühe, L., Marahiel, M.A. (2013). Radical S-adenosylmethionine enzyme catalyzed thioether bond formation in sactipeptide biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 17(4),605–12.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Lebbadi, M., Valdivia, E. (1993). Isolation and physico-chemical characterization of an antifungal and antibacterial peptide produced by *Bacillus licheniformis* A12. *Appl Microbiol Biotechnol*, 39(4-5),438–442.
- Garg, A., Kumari, B., Singhal, N., Kumar, M. (2019). Using molecular-mimicry-inducing pathways of pathogens as novel drug targets. *Drug Discov Today*, 24, 1943–1952.
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155(1),1–10.
- Gilliam, M., Lorenz, B.J. (1983). Gram-positive cocci from apiarian sources. *J Invert Pathol*, 42,187–195.
- Gilliam, M., Morton, H.L. (1978). Bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from honey bees, *Apis mellifera*, 2,4-D and Antibiotics (1). *Apidologie*, Springer Verlag, 9 (3), pp.213-222.
- Gilliam, M., Taber, S. (1991). Diseases, pests, and normal microflora of honeybees,

- Apis mellifera*, from feral colonies. *J Invert Pathol*, 58,286–289.
- Gonzalez, C., Langdon, G.M., Bruix, M., Galvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M. (2000). Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(21),11221–6.
- Grata, K., Nabralık, M. (2012). Antifungal activity of *Bacillus* spp. against *Fusarium* spp. *Proceedings of ECOpole*, 6(1). DOI: 10.2429/proc.2012.6(1)020
- Hall, A.B., Tolonen, A.C., Xavier, R.J. (2017). Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nature Reviews Genetics*, 18,690–699.
- Hamdy, A.A., Elattal, N.A., Amin, M.A. (2017). Possible correlation between levansucrase production and probiotic activity of *Bacillus* sp. isolated from honey and honey bee. *World J Microbiol Biotechnol*, 33,69.
- Hamley, I.W. (2015). Lipopeptides: From self-assembly to bioactivity. *Chem. Commun.* 51,8574–8583.
- Harley, J.P., Prescott, L.M. (2002). Laboratory Exercises in Microbiology. Fifth Edition, The McGraw-Hill Companies, New York
- Horsch, M., Mayer, C., Sennhauser, U., and Rast, D. M. (1997). β -N-Acetylhexosaminidase: a target for the design of antifungal agents. *Pharmol. Ther*, 76,187–218. doi: 10.1016/S0163-7258(97)00110-1
- Ishihara, H., Takoh, M., Nishibayashi, R., Sato, A. (2002). Distribution and variation of bacitracin synthetase gene sequences in laboratory stock strains of *Bacillus licheniformis*. *Curr Microbiol*, 45,18–23.
- Iwase, N., Rahman, M.S., Ano, T. (2009). Production of iturin A homologues under different culture conditions. *J Environ Sci, (China)*, 21,S28-S32.
- Thwaite, J.E. Atkins, H.S. in Medical Microbiology (Eighteenth Edition), 2012.
- Javaid, A., Hussain, M., Aftab, K., Malik, M. F., Umar, M., Iqbal, T. (2021). Isolation and characterization of bacteria associated with silkworm gut under antibiotic-treated larval feeding. *Braz J Biol*, 84,e249664. doi: 10.1590/1519-6984.249664. PMID: 34787236.
- Johnvesly, B., Manjunath, B.R., Naik, G.R. (2002). Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *Bioresour Technol*, 82(1),61–64.
- Just-Baringo, X., Albericio, F., Alvarez, M. (2014). Thiopeptide antibiotics: retrospective and recent advances. *Mar Drugs*, 12(1),317–51.
- Kacaniova, M., Chlebo, R., Kopernicky, M., Trakovicka, A. (2004). Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiol*, 49,169–171 27.
- Kacaniova, M., Pavlicova, S., Hascik, P., Kociubinski, G., Kmazovicka, V., Sudzina, M., Sudzinova, J., Fikselova, M. (2009). Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 56,285–295.
- Kadaikunnan, S., Rejiniemon, T.S., Khaled, J.M., Alharbi, N.S., Mothana, R. (2015). In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14,9. Doi:10.1186/s12941-015-0069-1.

- Kakinuma, A., Hori, M., Isono, M., Tamura, G., and Arima, K. (1969a). Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem*, 33,971–972. doi: 10.1080/00021369.1969.10859408.
- Kakinuma, A., Sugino, H., Isono, M., Tamura, G., Arima, K. (1969b). Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. *Agric Biol Chem*, 33,973–976. doi: 10.1080/00021369.1969.108594
- Katz, E., Demain, A.L. (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological reviews*, 41(2),449–474. <https://doi.org/10.1128/br.41.2.449-474.1977>
- Katznelson, H. (1955). *Bacillus apiarius*, n. sp., an aerobac spore-forming organism isolated from honeybee larvae. *Journal of Bacteriology*, 70(6),635-636. DOI: 10.1128/jb.70.6.635-636.1955. PMID: 13271306; PMCID: PMC386264.
- Khan, N., Martínez-Hidalgo P., Ice T.A., Maymon M., Humm E.A., Nejat, N., Sanders, E.R., Kaplan, D., Hirsch, A.M. (2018). Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Front Microbiol*, 9, 2363. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>
- Khusainov, R., Van Heel, A.J., Lubelski, J., Moll, G.N., Kuipers, O.P. (2015). Identification of essential amino acid residues in the nisin dehydratase NisB. *Front Microbiol*, 6,102.
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 157(12),3256–67.
- Knerr, P.J., Van Der Donk, W.A. (2012). Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annu Rev Biochem*, 81,479–505.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C. (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th edition. Lippincott-Raven Publisher, New York, 1296–1395.
- Singh, A.K., Rautela, R., Cameotra, S.S. (2014). Substrate dependent *in vitro* antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2. *Microb Cell Fact*, 13, 67. <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/67>
- Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B., Urdaci, M.C. (2000). Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I(4). *Appl Environ Microbiol*, 66(12),5213–20.
- Leemhuis, H., Kelly, R.M., Dijkhuizen, L. (2010). Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85,823–835. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2221-3>
- Lewis, K. (2012). Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. *Nature*; 485(7399), 439–40.
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 12(5), 371–87.

- Li, Y.M., Milne, J.C., Madison, L.L., Kolter, R., Walsh, C.T. (1996). From synthase. *Science*, 274(5290),1188–93.
- Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P. (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535),455–9.
- Ludvigsen, J., Rangberg, A., Avershina, E., Sekelja, M., Kreibich, C., Amdam, G. (2015). Shifts in the midgut/pyloric microbiota composition within a honey bee apiary throughout a season. *Microbes and Environments*, 30,235–244.
- Luo, C., Liu, X., Zhou, H., Wang, X., Chen, Z. (2015). Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions. *Appl Environ Microbiol*, 81(1),422–31.
- Luo, C., Liu, X., Zhou, X., Guo, J., Truong, J., Wang, X. (2015). Unusual biosynthesis and structure of Locillomycins from *Bacillus subtilis* 916. *Appl Environ Microbiol*, 81(19),6601–9.
- Schultz, M., Chanyi, R.M., (2017). Edited by Martin H. Floch, Yehuda Ringel and W. Allan Walker, The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics and Dysbiosis. In The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology, Elsevier, ISBN: 978-0-12-804024-9, 409-419.
- Magdalena, S., Anggelia, Yogiara. (2020). Characterization of antibacterial activity produced by *Bacillus spp.* isolated from honey and bee-associated products against foodborne pathogens. *Biotechnologi*, 17,51-59.
- Malfanova, N., Franzil, L., Lugtenberg, B., Chebotar, V., Ongena, M. (2012). Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Arch Microbiol*, 194(11),893–9.
- Mardanov, A.M., Hadieva, G.F., Lutfullin, M.T., Khilyas, I.V., Minnullina, L.F., Gilyazeva, A.G., Bogomolnaya, L.M. and Sharipova, M.R. (2017). *Bacillus subtilis* Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi. *Agricultural Sciences*, 8, 1–20. <http://dx.doi.org/10.4236/as.2017.81001>
- Martin, F.P.J., Wang, Y., Sprenger, N., Yap, I.K.S., Lundstedt, T. (2008). Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Molecular Systems Biology*, 4:157.
- Martinson, V.G., Moy, J., Moran, N.A. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and Environmental Microbiology*, 78,2830–2840.
- Martinson, V.G., Danforth, B.N., Minckley, R.L., Rueppell, O., Tingek, S., Moran, N.A. (2011). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol Ecol*, 20,285–295.
- Mattila, H.R., Rios, D., Walker-Sperling, V.E., Roeselers, G., Newton, I.L.G. (2012). Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. *PloS One*, 7,e32962. doi: 10.1371/journal.pone.0032962 PMID: 22427917.
- Mauch, F., Mauch, M.B., Boller, T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue 2. inhibition of fungal growth by combination of chitinase and β -1,3- glucanase.

Plant Physiol, 88,936-942.

- Mawadza, C., Kaul, R.H., Zvauya, R., Mattiason, B. (2000). Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*, 83,177–187.
- Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O., Kasper, D.L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122,107–118.
- Mazza, P., Zani, F., Martelli, P. (1992). Studies on the antibiotic resistance of *Bacillus subtilis* strains used in oral bacteriotherapy. *Boll. Chim. Farm.*131:401–408.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev*, 25,285–308.
- McClerren, A.L., Cooper, L.E., Quan, C., Thomas, P.M., Kelleher, N.L., Van Der Donk, W.A. (2006). Discovery and in vitro biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(46),17243–8.
- Meena, K.R., Kanwar, S.S. (2015). Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *Biomed Res Int*, 1,9. doi: 10.1155/2015/473050
- Miles, G., Bayley, H., Cheley, S. (2002). Properties of *Bacillus cereus* hemolysin II: a heptameric transmembrane pore. *Protein Sci*,11,1813–1824.
- Mohr, K.I., Tebbe, C.C. (2006). Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environ Microbiol*, 8,258–272. PMID: 16423014.
- Mojgani, N., Hussaini, F. and Vaseji, N. (2015). Characterization of indigenous *Lactobacillus* strains for probiotic properties. *Jundishapur J Microbiol*, 8,1–8.
- Montalbán-López, M., Sánchez-Hidalgo, M., Cebrián, R., Maqueda, M. (2012). Discovering the bacterial circular proteins: bacteriocins, cyanobactins, and pilins. *J Biol Chem*, 287(32),27007–13.
- Moran, N.A., Hansen, A.K., Powell, J.E., Sabree, Z.L. (2012). Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS ONE*, 7,1–10 33.
- Mrazek, J., Strosova, L., Fliegerova, K., Kott, T., Kopečný, J. (2008). Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiol (Praha)*, 53,229–233. doi: 10.1007/s12223-008-0032-z PMID: 18661298.
- Mukerji, K.G., Garg, K.L. (1988). Biocontrol of Plant Diseases. Vol. I CRC Pres, Florida, USA.
- Nelson, J.A. (1924). Morphology of honeybee larvae. *Journal of Agricultural Research*, 12,1167–1215.
- Neumüller, A.M., Konz, D., Marahiel, M.A. (2001). The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin “self-resistance” of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur J Biochem*, 268,3180–3189.
- Nwagu, T.N., Ugwuodo, C.J., Onwosi, C.O., Inyima, O., Uchendu, O.C. and Akpuru, C. (2020). Evaluation of the probiotic attributes of *Bacillus* strains isolated from

- traditional fermented African locust bean seeds (*Parkia biglobosa*), “daddawa”. *Ann Microbiol*, 70, 1–5.
- Ohki, R. (2003). A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. *J Bacteriol*, 185,51–59.
- Olofsson, T.C., Alejandra Vázquez, A. (2008). Detection and identification of a novellactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol*, 57,356–363.
- Ongena, M., Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*, 16(3),115–25.
- Owusu-Kwarteng, J., Wuni, A., Akabanda, F., Tano-Debrah, K., Jespersen, L. (2017). Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *B. cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. *BMC Microbiol*, 17,1–8.
- Özcan, N. (1992). Cloning and Sequencing of a Cellulose Gene from *Fibrobacter succinoogenes* SD35, Doktora Tezi, Aberdeen Üniversitesi, İngiltere.
- Öztürk, F.G. (2013). Beekeeping Sectoron the Structure of Economic in Ordu ProvinceRegion: A Case Study. Ms. Thesis, Atatürk University, Graduate College of Natural and Applied Sciences, Erzurum.
- Öztürk, R. (2008). Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Ülkemizde Antimikrobik Maddelere Direnç Sorunu. Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlara Pratik Yaklaşımlar. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi, 7–8 Şubat, İstanbul.
- Paik, S.H., Chakicherla, A., Hansen, J.N. (1998). Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J Biol Chem*. 273(36),23134–42.
- Pan, X., Chen, X., Su, X., Feng, Y., Tao, Y. and Dong, Z. (2014). Involvement of SpoVG in hemolysis caused by *B. subtilis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 443, 899–904.
- Park, G., Nam, J., Kim, J., Song, J., Kim, P. I., Min, H. J. (2019). Structure and mechanism of surfactin peptide from *Bacillus velezensis* antagonistic to fungi plant pathogens. *Bull. Korean Chem. Soc.* 40, 704–709. doi: 10.1002/bkcs.11757.
- Pathak, K.V., Keharia, H. (2013). Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *Biotech*, 4(3),283–95, 143.
- Pătruică, S., Mot, D. (2012). The effect of using prebiotic and probiotic products on intestinal micro-flora of the honeybee (*Apis mellifera carpatica*). *Bull Entomol Res*, 102(6),619-23. doi: 10.1017/S0007485312000144.
- Paudel, Y.P., Lin, C., Shen, Z., Qin, W. (2015). Characterization of pectin depolymerising exo polygalacturonase by *Bacillus* sp. HD2 isolated from the gut of *Apis mellifera* L. *Microbiology Discovery*,3(2), 1-8.

- Perez-Trallero, E., Garcia, C., Orden, B., Marimon, J.M., Montes, M. (2004). Dissemination of emm28 erythromycin-, clindamycin- and bacitracin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23,123–126.
- Podlesek, Z., Grabnar, M. (1989). Sporulation of a bacitracin-sensitive mutant of *Bacillus licheniformis* is self-inhibited by bacitracin. *J Gen Microbiol*,135,2813–2818.
- Podlesek, Z., Herzog, B., Comino, A. (1997). Amplification of bacitracin transporter genes in the bacitracin producing *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol Lett*,157,201–205.
- Porrini, M.P., Audisio, M.C., Sabaté, D.C., Ibarguren C., Medici, S.K., Sarlo, E.G., Garrido, P.M., Eguaras, M.J. (2010). Effect of bacterial metabolites on microsporidian *Nosema ceranae* and on its host *Apis mellifera*. *Journal of Parasitology Research*, 107,381–388.
- Powell, J.E., Martinson, V.G., Urban-Mead, K., Moran, N.A. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80,7378–7387.
- Qilong, R., Huabin, X., Zongbi, BAO., Baogen, SU., Qiwei, YANG., Yiwen, YANG., ZHANG, Z. (2013). Recent advances in separation of bioactive natural products. *Chin J Chem Eng*, 21(9),937–952.
- Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev*, 34(6),1037–62.
- Ragul, K., Kandasamy, S., Devi, P. B., and Shetty, P. H. (2020). Evaluation of functional properties of potential probiotic isolates from fermented brine pickle. *Food Chem*, 1,311. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.126057
- Raymann, K., Moran, N.A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science*, 26,97–104. DOI: 10.1016/j.cois.2018.02.012.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10),1231–1237.
- Revathi, N., Kalaiselvi, M., Gomathi, D., Ravikumar, G., Uma, C. (2013). Antifungal activity of *Bacillus* species in bio-control of different plant pathogens. *The Journal of Phytopharmacology*, 2(6),14–18.
- Reyes, M.P., Corona, F.G. (1997). The biofunctional enzyme chitosanase-cellulase produced by th gram-negative microorganism *Myxobacter* sp. AL1 is highly ,similar to *Bacillus subtilis* endoglucanases. *Arch Microbiology*, 168321- 327.
- Ridderhof, J.C., Woods, G.L., Brown-Elliott, B.A., Desmond, E.P., Hall, G.S., Heifets, L., Pfyffer, G.E., Wallace, R.J., Warren, N.C., Witebsky, F. (2003). Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and other aerobic *Actinomycetes*; Approved Standard. NCCLS document, M24-A, 23(18).
- Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*, 43,2823–2830.

- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crit Rev Microbiol*, 36(2),146–67. doi: 10.3109/10408410903489576.
- Sabaté, D.C., Carrillo, L., Audisio, M.C. (2009). Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honey bee gut and honey samples. *Research in Microbiology*, 160,193–199.
- Sabaté, D.C., Cruz, M.S., Benitez, M.R., Audisio, M.C. (2012). Beneficial effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* Mori2, a honey-associated strain, on honey bee colony performance. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4,39–46.
- Salomón, V.M., Gianni De Carvalho, K., Arroyo, F., Maldonado, L.M., Gennari, G., Vera, N., Romero, C.M. (2021). Biopolymer production by bacteria isolated from native stingless bee honey. *Scaptotrigona jujuyensis*. 42,101077.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sansinenea, E., Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus spp.* *Biotechnol Lett*, 33,1523–1538.
- Saunders, S., Bocking, A., Challis, J., Reid, G. (2007). Effect of *Lactobacillus* challenge on *Gardnerella vaginalis* biofilms. *Colloids Surf B*, 55,138–142.
- Schoffemeer, E. A. M., Klis, F. M., Sietsma, J. H., and Cornelissen, B. J. C. (1999). The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol*, 27,275–282. doi: 10.1006/fgbi.1999.1153
- Scholz, R., Molohon, K.J., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A.L., Sussmuth, R.D. (2011). Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacteriol* 193(1),215–24.
- Scholz, R., Vater, J., Budiharjo, A., Wang, Z., He, Y., Dietel, K. (2014). Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacteriol*, 196(10),1842–52.
- Serpi, M., Özdemir, Z.Ö., Salman, Y. (2012). Bazı Bitki Ekstrelerinin *Propionibacterium acnes* Üzerine Antibakteriyel Etkilerinin Araştırılması. *KSÜ Doğa Bil Derg*, 15(1),7–12.
- Shafi, J., Tian, Hui., Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3),446–459, DOI: 10.1080/13102818.2017.1286950
- Silva, M.D., Rabadzhiev, Y., Eller, M.R., Iliev, I., Ivanova, I., Santana, W.C. (2017). Microorganisms in honey. In Vagner de Alencar Arnaut de Toledo (Ed.). *Honey Analysis*, pp.240. doi: 10.5772/67262.
- Sinev, M.A., Budarina, Z., Gavrilenko, I.V., Tomashevskii, A.I., Kuz'min, N.P. (1993). Evidence of the existence of hemolysin II from *Bacillus cereus*: cloning the genetic determinant of hemolysin II. *Mol Bio*, 127,1218–1229.
- Singhal, N., Singh, N.S., Mohanty, S., Singh, P. and Viridi, J.S. (2019). Evaluation of probiotic characteristics of LAB isolated from two commercial preparations available in Indian market. *Indian J Microbiol*, 59,112–115.

- Smith, P.B., Hancock, G.A., Rhoden, D.L. (1969). Improved Medium for Detecting Deoxyribonuclease-Producing Bacteria. *Appl Microbiol*, 18,991–993.
- Snyder, A. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* Strain. US patent application US 12/492,816. Publication no. US20090324533.
- Sorokulova, I.B., Pinchuk, I.V., Denayrolles, M., Osipova, I.G., Huang, J.M., Cutting, S.M., Urdaci, M.C. (2008). The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Dig Dis Sci*, 53,954–963.
- Spinosa, M.R., Braccini, T., Ricca, E., de Felice, M., Morelli, L., Pozzi, G., Oggioni, M.R. (2000). On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res Microbiol*, 151,361–368.
- Stepper, J., Shastri, S., Loo, T.S., Preston, J.C., Novak, P., Man, P. (2011). Cysteine Sglycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Lett*, 585(4),645–50.
- Sun, H., Zhao, P., Ge, X., Xia, Y., Hao, Z., Liu, J., Peng, M. (2010). Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Appl Biochem Biotech*, 160,988–1003.
- Sun, L. P., Shi, F. F., Zhang, W. W., Zhang, Z. H., Wang, K. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory activities of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) honey extract. *Foods*, 9,1039. doi: 10.3390/foods9081039
- Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 62,625–630.
- Szejtli, J. (2004). Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem*, 76, 1825-1845.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M.Y.A., Mustafa, S. (2013). Molecular identification of *Lactobacillus* spp. Isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Apicultural Research*, 52(5), 235–241.
- Tarpy, D.R., Nielsen, R., Nielsen, D.I. (2004). A scientific note on the revised estimates of effective paternity frequency in *Apis*. *Insectes Soc*, 51,203–204.
- Toutiaee, S., Mojgani, N., Harzandi, N., Moharrami, M., Mokhberosafa, L. (2022). In vitro probiotic and safety attributes of *Bacillus* spp. isolated from beebread, honey samples and digestive tract of honeybees *Apis mellifera*. *Letters in Applied Microbiology*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/lam.13650>
- Tsuda, H., Yamashita, Y., Shibata, Y., Nakano, Y., Koga, T. (2002). Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 46,3756–3764.
- URL-1, 2019. <http://www.marmarisbalevi.com.tr/tr/bal-arisi/koloni-bireyleri-ve-gorevleri>
- URL-2, 2019. <https://anlasilabiliraricilik.blogspot.com/2017/09/erkek-ar.html>
- URL-3, 2019. <https://healthywithhoney.com/what-is-the-difference-between-beebread-aka-bee-bread-and-bee-pollen/>
- URL-4, 2019. <https://adventuresinbeeland.com/2012/04/28/national-bee-unit->

warning/img_3456/

URL-5, 2020. <https://www.ral-diagnostics.fr/en/ressources/>

- Valli, S., Suvathi, S.S., Aysha, O., Nirmala, P., Vinoth, K.P., Reena, A. (2012). Antimicrobial Potential of Actinomycetes Species Isolated From Marine Environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(6),469–473.
- Van Belkum, M.J., Martin-Visscher, L.A., Vederas, J.C. (2011). Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends Microbiol*, 19(8),411–8.
- Vasquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R.J., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T.C. (2012). Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*, 7,e33188 35.
- Velusamy, P., Gnanamanickam, S.S. (2008). The Effect of Bacterial Secondary Metabolites on Bacterial and Fungal Pathogens of Rice. In: Karlowsky P (ed) Soil biology, vol 14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 93–106.
- Ventola, C.L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4),277.
- Villiers, M.A. (1891). Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Comptes Rendus*, 112,536–537.
- Viswanathan, V.K. (2014). Off-label abuse of antibiotics by bacteria. *Gut Microbes*, 5(1),3–4.
- Wang, H., Fewer, D.P., Holm, L., Rouhiainen, L., Sivonen, K. (2014). Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(25),9259–64.
- Wang, M., Zhao, W.Z., Xu, H., Wang, Z.W., He, S.Y. (2015). *Bacillus* in the guts of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) mediate changes in amylase values. *Eur J Entomol*, 112(4),619–624. doi: 10.14411/eje.2015.095.
- Wang, Y., Ma, L.T., Xu, B.H. (2015). Diversity in life history of queen and worker honey bees, *Apis mellifera* L. *J Asia-Pacific Entomol*, 18,145–149.
- Wayne, P.A. (2004). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline M44-A2, 29(19).
- Weber, W., Fischli, W., Hochuli, E., Kupfer, E., Weibel, E.K. (1991). Anantin—a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 44(2),164–71.
- Weissman, K.J. (2014). The structural biology of biosynthetic megaenzymes. *Nat Chem Biol*, 11(9),660–70.
- Wu, M., Sugimura, Y., Takaya, N., Takamatsu, D., Kobayashi, M., Taylor, D., Yoshiyama, M. (2013). Characterization of bifidobacteria in the digestive tract of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*. *J Invertebr Pathol*, 112(1),88–93.
- Yang, X., Van Der Donk, W.A. (2013). Ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptide natural products: new insights into the role of leader and core peptides during biosynthesis. *Chemistry*, 19(24),7662–77.
- Yılmaz, M., Beyatlı, Y. (2003). *Bacillus* cinsi bakterilerde antimikrobiyal aktivite ve

antibiyotik üretimi. *Orlab on-Line Mikrobioloji Derg*, 7,35-49.

- Yoshiyama, M., Kimura, K. (2009). Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *J Invertebr Pathol*, 102,91–96. doi: 10.1016/j.jip.2009.07.005 PMID: 19616552.
- Zhao, X., Han, Y., Tan, X.Q., Wang, J., Zhou, Z.J. (2014). Optimization of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology. *J Microbiol*. 52(4):324–32. 144.
- Zhao, X., Kuipers, O.P. (2016). Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics*, 17,882. doi:10.1186/s12864-016-3224-y
- Zulkhairi Amin, F.A., Sabri, S., Ismail, M., Chan, K.W., Ismail, N., Mohd Esa, N., Mohd Lila, M. A., Zawawi, N. (2019). Probiotic Properties of *Bacillus* Strains Isolated from Stingless Bee (*Heterotrigona itama*) Honey Collected across Malaysia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(1),278. <https://doi.org/10.3390/ijerph17010278>

EKLER

EK-1. *Bacillus* sp. Suşlarının 16S rRNA Gen Sekansları

>SY7_27F (E44/2A)

GCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAA
GGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTA
CCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGCAG
AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTA
ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAA
GGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGAT
AGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAG
CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATC
TTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTA
AGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT
GCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACAC
CCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTAGGAGCCAGCC

>SY20_27F (E38/3C)

TATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACT
CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAA
CATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA
ACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTG
AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACG
CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCT
GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCT
AGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGC
GAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA
CTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT
GTAACACCCGAAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAG

>SY21_27F (L38/3-4A)

GCAAGTTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTCAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGAGTGGGATAACTCCGGGA
AACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAA
AGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
ACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCA
GAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCT
AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGA
TAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGAT
CTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTT
AAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGAC
TGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACA
CCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGC

>SY28_27F (E38/3A)

TACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACAT
AAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGATTCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCC
TGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAA
GTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGA
AAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTG
CAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG
GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGC
TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAG
ATAGGACGTCCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTG
ATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGG
TTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
ACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA
ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTA
CACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGC