



Topraktan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması ve Bakteriosin Üretimlerinin Belirlenmesi

Fadime Topçal*, Metin Dıđrak, Recep Gündođan

*Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Kahramanmaraş*

ela_asteroidea@hotmail.com

Özet

Bu çalışmada Gaziantep ili Oğuzeli ilçesinde *Hordeum sp.* (arpa) ve *Vicia sp.* (fiğ) ekilmiş topraklardan *Bacillus sp.* izole edilmiş ve tanımlaması yapılmıştır. Toprak örneklerinden 121 adet *Bacillus* suşları izole edilmiştir. İzolatların 114 tanesinin *Bacillus* genusuna özel 16S rRNA primerleriyle PZR ürünü verdiği tespit edilmiştir. Klasik yöntemlerle yapılan tür teşhisinde *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *B. megaterium* ve *B. amyloliquefaciens* türleri belirlenmiştir. Dört izolatın metabolik ürünlerinin *Escherichia coli* ve *Micrococcus luteus* gelişimini engellediği tespit edilmişti. Antimikrobiyal etkinin plazmit varlığı ile ilişkili olup olmadığı düşünülerek plazmit içerikleri incelenmiştir. Yalnızca *B. subtilis*'te plazmit varlığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bacillus, Bakteriosin, PCR tanımlama.

Identification of *Bacillus* Species Isolated from Soil and Determination of Bacteriocin Production

Abstract

In this study, *Bacillus sp.* was isolated from the soil seeded with *Hordeum sp.* and *Vicia sp.* and was identified. 121 *Bacillus* isolates were derived from soil samples. It was determined that 114 isolates gave 16SrRNA pcr products with primers specific for *Bacillus* genus. Classical methods were used to identify the species: *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *B. megaterium* and *B. amyloliquefaciens* species. It was determined that metabolic products of

four isolates inhibited *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* growth. The relationship between antimicrobial effect of species and plasmid presence was tested and plasmid contents was only observed in *B. subtilis*.

Keywords: Bacillus, Bacteriocin, PCR identification.

Giriş

Toprak mikroflorasının önemli bir kısmı *Bacillus* cinsi bakterilerdir. *Bacillaceae* familyası içerisinde yer alan *Bacillus* türleri, aerop ve fakültatif anaerop, gram pozitif endosporlu, bakterilerdir [1,2,3]. *Bacillus* genusuna ait türlerin çoğu güvenli mikroorganizmalardır. Tarım ve endüstriyel amaçlarda başarılı şekilde kullanılmakta olan pek çok maddeyi sentezleyebilme kabiliyetine sahiptirler. Çoğu mikroorganizmada olduğu gibi, *Bacillus* türleri de gıdalarda patojen veya bozulma etkeni mikroorganizmaların büyümesini önleyebilen veya onları öldüren farklı çeşitlerde bileşik (bakteriosinler) üretmektedirler [4,5]. *Bacillus* türleri genel olarak, patojenik bakteri ve funguslara karşı terapötik ajanlar olarak potansiyel uygulamaya sahip peptitler, lipopeptitler, fosfolipitler ve polienler üretirler ve üretilen antimikrobiyal bileşenlerin çoğu peptit orijinlidir [6,7]. Antimikrobiyal bileşiklerin gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanımı gittikçe popüler hale gelmektedir. Son yıllarda, sağlıklı bilince sahip tüketiciler, sağlıklı hayat tarzlarına uygun doğal gıdalara yönelmektedirler. Bu kimyasal koruyucular olarak katkısız gıdaları içerirler [7,8]. Antimikrobiyal maddeler, gıda koruyucuları olarak önem kazanmakla beraber, bitki patojenlerinin biyolojik kontrolü için de önemlidir. *Bacillus* farklı tür ve suşları tarafından üretilen sekonder metabolitlerin, farklı bitki patojenlerine karşı antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiği belirtilmektedir [9-11].

Bu çalışmada, *Hordeum* ve *Vicia* ekilen topraklardan *Bacillus* türleri izole edilmiştir. İzole edilen mikroorganizmalar, koloni PZR yöntemiyle moleküler olarak tanımlanmıştır. *Bacillus* olarak tanımlanan izolatların klasik yöntemlerle tür teşhisi ve ürettikleri bakteriosinlerin bazı patojen bakteriler üzerinde inhibisyon etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

İzolasyon

Araziden alınan toprak örnekleri laboratuara getirilerek 10 g 9.0 ml fizyolojik su ile süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon haline getirilen örnekler 63 °C deki su banyosunda 30 dakika süre ile bekletilmiş ve soğutulduktan sonra uygun dilüsyonlardan

(10⁻²...) plate count agar besiyerine yüzeysel ekim yapılmış ve 30 °C de 24 saat inkübe edilmiştir [12]. Petrilerdeki farklı özellikteki koloniler, nutrient broth besiyerine aşılınmış 30°C de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir [13,14]. Bakteri izolatları steril ependorflarda %30'luk steril gliserol ile stoklanmıştır. Tüm izolatlar -20 °C de muhafaza edilmiştir.

Koloni PZR Yöntemiyle *Bacillus* Cinsi İzolatların Taranması

İzolatlar, koloni PZR yöntemi kullanılarak *Bacillus* cinsine özgü 16 S rRNA primerleri ile taranmıştır. Bunun için BacF (5'-GTGCCTAATACATGCAAGTC-3') ve BacR (5'-CTTTACGCCCAATAATTCC-3') primerleri kullanılmıştır [14]. PZR şartları; ilk denatürasyon (95°C' de 5 dk) , yapışma (60°C'de 1 dk) ve uzama (72°C'de 1 dk) şeklinde 35 döngü olarak uygulanmıştır.

DNA Jel Elektroforez

Agaroz jel, 1X TBE (90mM Tris Base; 90 mM Borik Asit; 2 mM EDTA; pH 8.0) tamponu ile hazırlanmıştır ve PZR ürünleri agaroz jelde koşturulmuştur. DNA kontrolü olarak uygun boyutlardaki (100 bç veya 1 kb) DNA standartları (Favorgen, Tayvan) kullanılmıştır. Agaroz jel içindeki DNA, Et-Br (0.5 µg/ml) ile boyanarak (post-staining) UV ışığında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır (Canon, S31S).

***Bacillus spp.*' nin Bakteriosin Üretimi**

Bacillus olarak tanımlanan 114 izolat ve test bakterileri (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*) nutrient broth besi ortamında, 37°C de 24 saat süre ile aktifleştirilmiştir. Bakteriosin üreten izolatların belirlenmesi için izolatlar % 3 glikoz içeren nutrient broth besiyerinde 37°C de 72 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler 1:3 w/v etil asetatla 3 defa ekstrakte edilmiştir [14,15]. Rotary evaporatörde 1 ml kalıncaya kadar buharlaştırıldıktan sonra 11 mm çapındaki steril filtre kağıtlarına 100 µl emdirilmiştir.

Ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi test mikroorganizmaları ile belirlenmiştir. Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan diskler, test bakterilerinin aşılacağı [16] petri kutularına uygun aralıklarla yerleştirilmiştir. Ön inkübasyondan sonra 37°C de 24 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür [13,14]. Çalışma 3 paralel olarak yürütülmüş ve sonuçlar ortalama değer olarak verilmiştir.

***Bacillus spp.* İzolatlarının Tanımlanması**

Bakteriosin ürettiği gözlenen izolatların tanımlanması için gram boyama, endospor boyama, zincir formu oluşturma, katalaz, karbonhidrat fermentasyon, bile-eskülin hidroliz, nişasta hidroliz, NaCl tolerans, IMViC, üreaz aktivite, nitrit-nitrat amonyak, hareketlilik ve lesitinaz aktivite testleri yapılmıştır [1,14].

Plazmit DNA Ekstraksiyonu

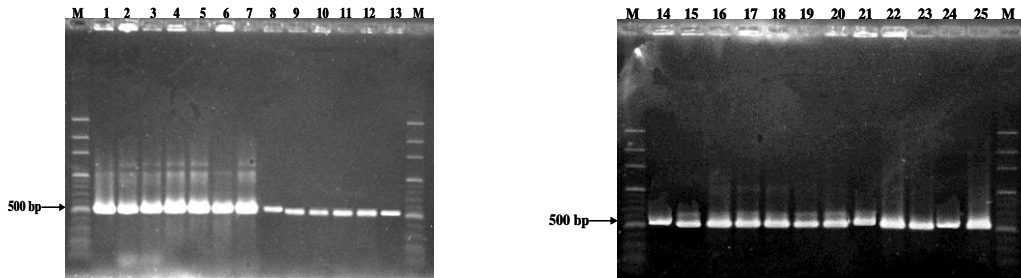
Antibakteriyel madde ürettiği belirlenen 4 *Bacillus* izolatından Favorgen Favorprep Plasmid DNA Extraction Mini Kit ile plazmitler saflaştırılmıştır. Elde edilen ürünler -20°C de saklanmıştır.

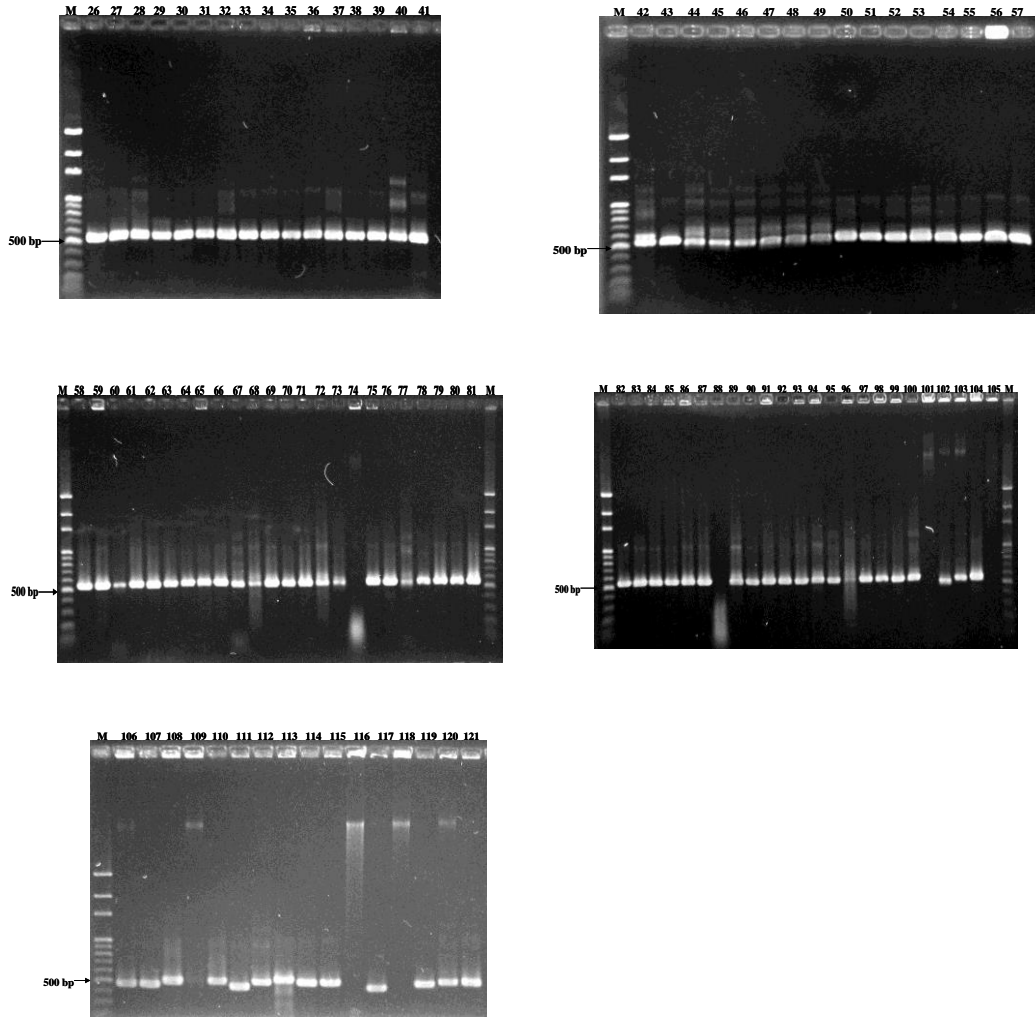
Bulgular ve Tartışma

Gaziantep ili Oğuzeli ilçesinden *Hordeum sp.* ve *Vicia sp.* ekilmiş topraklardan *Bacillus sp.* izole edilmiş ve tanımlanması yapılmıştır. Toprak örneklerinden 121 adet *Bacillus* suşları izole edilmiştir. İzolatların 114 tanesinin *Bacillus* genusuna özel 16S rRNA primerleriyle PZR ürünü verdiği tespit edilmiştir.

Koloni PZR Yöntemiyle *Bacillus* Cinsi İzolatların Taranması

PZR jel görüntülerinden de görüldüğü gibi, 121 izolattan 74, 88, 101, 105, 109, 116 ve 118 nolu izolatların *Bacillus* genusuna özel primerlerle PZR ürünü vermediği, diğer izolatların ise PZR ürünü verdiği tespit edilmiştir. Böylelikle morfolojik olarak seçilen *Bacillus* izolatları koloni PZR yöntemi kullanılarak da teyit edilmiştir. 108, 110, 112, 113, 114, 115, 119, 120 ve 121 nolu izolatlara ait bant boylarındaki farklılığın, ileri ve geri primerlerin bağlandıkları konsensus bölgeleri arasındaki baz sayılarının farklılığından kaynaklandığı düşünülmüştür (Şekil.1).

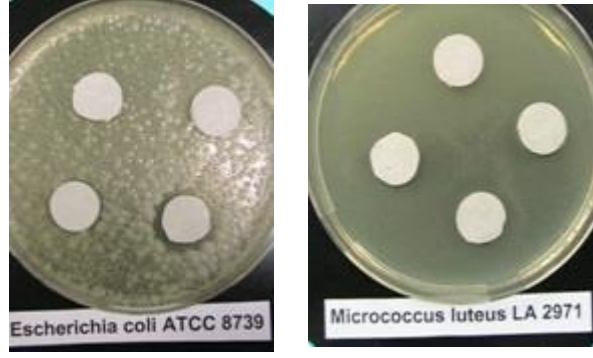




Şekil 1. Topraktan izole edilen *Bacillus* izolatlarının koloni pzs görüntüleri. A: İzolat 1-12; B: İzolat 13-25; C: İzolat 26-41; D: İzolat 42-57; E: 58-81; F: 82-105; G: 106-121; M: Marker; bp: Base pair.

Bakteriosinlerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Topraktan izole edilen ve koloni PZR metodu ile *Bacillus* cinsi olarak tespit edilen 94 izolattan 4 tanesinin (4,5,9,19) bakteriosin ürettiği belirlenmiştir. *Bacillus spp.* tarafından üretilen metabolitler, test mikroorganizması olarak kullanılan *Escherichia coli* ve *Micrococcus luteus*'un gelişmesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. *Bacillus* cinsi bakterilerin patojen mikroorganizmalara karşı inhibisyon etkisi

Yapılan çalışmalarda bazı *B.cereus* izolatları ile aynı ortama ekilen *B.licheniformis*, *B.subtilis*, *E.faecalis*, *E.coli*, *S. aureus*, *Lactobacillus helveticus* ve *L.casei* türlerinin gelişmesini engellediği belirtilmektedir [17].

Bacillus cinsinin yabancı tip suşları antimikrobial aktivite için seçilmiştir. İki adet suşun *B. polymyxa* MIR 23 ve *B. circulans* MIR 13'ün *M. luteus*'a karşı gelişmesini engelleyici aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bunlardan *B. polymyxa* MIR 23'ün *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Aspergillus niger*'e gelişmesini engellediği bildirilmiştir. Buna karşılık *B. circulans* MIR 13 bu organizmalara karşı aktif olmadığı gözlenmiştir. Belirtilen çalışmada *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. polymyxa* ATCC 10401 suşları standart antibiyotik üretici suş olarak kullanılmıştır [18].

B. subtilis, *B. cereus* C1,C2 suşlarının bakteriyosin üretme yeteneği, *B.cereus* BcIs-6, *B. cereus* BcIs-7, *B. cereus* BcSn-8 ve *B. subtilis* BSn-12 gibi farklı *Bacillus* suşlarına karşı test edilmiştir. Dört suş *B. cereus* BcIs-7 ve *B. subtilis* BSn-12 ye karşı güçlü aktivite göstermiştir [19]. *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun antifungal peptid antibiyotik potansiyeli içeren mikosubtilin üreticisi olduğu belirtilmiştir [20].

Yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular *Bacillus* türlerinin antimikrobiyal maddeler ürettiğini ve patojen mikroorganizmaların gelişmesini inhibe ettiğini göstermektedir. Yaptığımız bu çalışmada elde edilen bulgular önceki yapılan çalışmalara katkıda bulunmuştur.

Son yıllarda çoğu mikroorganizma antibiyotiklere direnç kazanmıştır. Bu sebepten ötürü yabancı tip mikroorganizmaların antibiyotik özelliği olan maddeler üretmesi veya geniş antimikrobial aktiviteye sahip olması çok önem taşımaktadır. Bu antibiyotiklerin patojenlere karşı etkili olması önemli görülmüştür [18].

Günümüzde bilinen 8000 antibiyotiğin kayıtlarda var olduğu belirtilmiş ve buna her yıl yüzlercesinin eklendiği ilave edilmektedir. Buna rağmen yeni antibiyotiklerin arayış ve keşfinin beklenildiği belirtilmiştir. Bu açıdan bakıldığında *Bacillus* genusu antibiyotik üretici kaynak olarak gösterilmiştir [21]. *Bacillus* türlerinin biyolojik kontrol ajanı olarak cazip olmasının sebepleri, toprakta bol miktarda bulunmaları, çeşitli biyolojik aktif metabolitlerin üretimi ve sabit sıcaklık dirençli spor formlarını oluşturma yetenekleri olarak rapor edilmiştir [22].

Çizelge 1. Toprakta izole edilen *Bacillus* türlerinin ürettiği bakteriosinlerin antimikrobiyal etkisi

Mikroorganizmalar	4 nolu izolat	5 nolu izolat	9 nolu izolat	19 nolu izolat
<i>Micrococcus luteus</i>	20±2.82 ¹	22±1.41	14±2.12	10±1.414
<i>Escherichia coli</i>	14±0.70	20±1.41	- ²	14±2.82
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	-

¹: İnhibisyon zonu,mm; ²:İnhibisyon zonu belirlenemedi.

***Bacillus* spp. İzolatlarının Tanımlanması**

Bacillus izolatları, Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology [23], Collins ve ark. [14], Demirbağ ve Demir, (2005), [1] ve Barrow ve Feltham (2003) [24] tarafından önerilen testlerle belirlenmiştir. Bu testler sonucunda elde edilen bulgular, [1,14,22,23]'ün verileri ile karşılaştırılmış ve tür teşhisi yapılmıştır. İzolatların tanımlaması için yapılan testler ve sonuçları Çizelge 2 de verilmiştir. Buna göre 4 nolu izolat *B. subtilis*, 5 nolu izolat *B. mycoides*, 9 nolu izolat *B. megaterium* ve 19 nolu izolat ise *B. amyloliquefaciens* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 2. *Bacillus* izolatlarının tanımlanması için yapılan biyokimyasal ve fizyolojik testler

İzolat Özellikleri	İzolat No			
	4	5	9	19
Zincir Formu Oluşumu	+	+	+	+
Gram Boyama	+	+	+	+
Endospor Boyama	+	+	+	+
Katalaz Aktivitesi	+	+	+	+
Fenol-Glukoz	+	+	+	+
Fenol-Laktoz	+	+	+	+
Fenol-Maltoz	-	+	+	+
Fenol-Mannitol	+	+	+	+
Fenol-Ksiloz	+	-	+	+
Bile-Eskülin Hidroliz	-	-	-	-
Nişasta Hidroliz	+	+	+	+
%2 Na-Cl Toleransı	+	+	+	+
%5 NaCl Toleransı	+	+	+	+
%7 NaCl Toleransı	+	+	+	-
%10 NaCl Toleransı	+	+	+	+
%11 NaCl Toleransı	+	+	+	-
%12 NaCl Toleransı	-	+	+	-

Metil Kırmızısı	-	+	+	-
VP	+	+	+	+
İndol	-	+	-	-
Citrat	+	-	+	+
Üreaz	-	+	+	-
Nitrat-Nitrit	+	-	-	+
Amonyak	+	+	+	+
Hareketlilik	+	-	+	+
Lesitinaz Aktivitesi	-	+	-	-
Tanımlanan Tür	<i>B.subtilis</i>	<i>B.mycoides</i>	<i>B.megaterium</i>	<i>B.amyloliquefaciens</i>

Sonuçlar

Bilindiği gibi sentetik ve zararlı kimyasalların, hemen hemen her türlü tüketim maddesine girmesi ve yapılan çalışmalarla bu yapay maddelerin insan ve çevre sağlığına olumsuz etkilerinin görülmesi, dünyada tekstilden gıdaya pek çok alanda doğal ürünlere karşı ilgiyi artırmıştır. Bu durum, üreticilerin ürünlerinde en doğal ve sağlıklı malzemeleri kullanımını zorunlu hale getirmektedir. Bilhassa hazır gıdalarda bozulma etmeni olan mikroorganizmaların baskılanmasında kullanılan kimyasal katkı koruyucular yerine, bazı bakterilerin ürettikleri bakteriyosinlerin saflaştırılarak, biyokoruyucu olarak kullanılması daha sağlıklı görünmektedir. Antimikrobiyal maddelerin organik olmaları, gıdaların fizikokimyasal özelliklerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmamaları da, bu amaçla kullanımlarını daha da cazip hale getirmektedir. Bunun dışında, bazı patojen mikroorganizmaların neden olduğu hastalıklarda, bazı mikroorganizmaların ürettikleri antimikrobiyal maddelerle bu patojenlerin gelişimi inhibe edilmektedir. Bu çalışmada izole edip tanımladığımız suşlardan elde edilen bakteriosinlerin daha ileri çalışmaları da yapılarak tedavi amaçlı kullanılabilirliği test edilmelidir.

Kaynaklar

- [1] Z. Demirbağ, İ. Demir, Genel Mikrobiyoloji Laboratuvarı Uygulama Kitabı, KATÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Esen Matbaacılık, Trabzon, 126s, 2005.
- [2] N. A. Logan, P. C. B. *Turnbull*, *Bacillus* and Recently Derived Genera. In:PR Murray, Rogel Berkeley, Blackwell Science Ltd. Blackwell Publishing, 305p, 2002.
- [3] RCW. Berkeley, N. Logan, *Bacillus*, *Alicyelobacillus* and *Paenibacillus*, Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Chichester: Wiley; 185p, 1997.
- [4] M. M. J. Bennik, A. Verheul, T. Abee, G. Naaktgeboren-Stoffels, L. G. M. Gorris, E. J. Smid, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63 (9)**, 3628-3636.
- [5] C. Hill, Bacteriocins, *Natural Antimicrobials from Microorganisms: New Methods for Food Preservation*, Blackie Academic & Professional, London, 457p, 1995.
- [6] A. G. Stover, A. Driks, *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**, 1664-1672.
- [7] A. Gálvez, H. Abriouel, R. L. López, N. B. Omar, *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **120**, 51–70.
- [8] T. Zotta, E. Parente, and A. Ricciardi, *World J. Microbiol Biotechnol*, 2009, **25**, 1119–1124.
- [9] M. Ongena, P. Jacques, *Trends Microbiol.*, 2008, **16** 115–125.
- [10] E. Katz, A.L. Demain, *Bacteriol. Rev.*, 1977, **41**, 449–474.
- [11] G. Y. Yu, J. B. Sinclair, G. L. Hartman, B. L. Bertagnolli, *Soil Biol. Biochem.*, 2002, **34**, 955–963.
- [12] E. H. Lennette, A. Balows, J. W. Jr Hausler, J. H. Shadomy, *Manual of Clinical Microbiology.*, Vol. 4, U. S. A., 1149 p, 1985.
- [13] S. Özçelik, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu, Süleyman Demirel Üniversitesi, Zir. Fak. Yayın No:2, Ders Notları, Isparta, 91s, 1998.
- [14] C. H. Collins, P. M. Lyne, J. M. Grange, *Microbiological Methods*, London, 450p, 1989.
- [15] L. J. Bradshaw, *Laboratory Microbiology*. Fourth Edition, Printed in U.S.A., 435p, 1992.
- [16] NCCLS, *Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing*, The 9th International Supplement, 1999, M100-S9, Villanova, PA.
- [17] K. G. Torkar, B. B. Matijašič, *Food Technol. Biotechnol.*, 2003, **41 (2)**, 121-129.
- [18] C. Perez, C. Suarez, G. R. Castro, *Microbiol.*, 1993, **38 (1)**, 25-28.

- [19] O. I. M. El-Hamshary, A. A. Khattab, *Research Journal of Cell and Molecular Biology*, 2008, **2** (2), 24-29.
- [20] E. H. Duitman, L. Hamoen, M. Rembold, G. Venema, *Genetics*, 1999, **96** (23), 13294-13299.
- [21] R. Eltem, F. Uçar, *Kökem Dergisi*, 1998, **21** (1), 57-64.
- [22] L. A. Silo-Suh, B. J. Lethbridge, S. J. Raffel, H. He, J. Clardy, J. Handelsman, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60** (6), 2023-2030.
- [23] A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1986, 2-8.
- [24] G. I. Barrow, R. K. A. Feltham, *Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria*, Cambridge University Press, 317 p, 2003.