

Endüstriyel enzimler üreten *Bacillus* izolatlarının morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu

Morphological, biochemical and molecular characterization of *Bacillus* isolates as a producer of industrial enzymes

Yonca YÜZÜGÜLLÜ-KARAKUŞ¹, Arzu SERTEL², Yonca DUMAN³, Fikriye POLAT⁴

ÖZET

Amaç: *Bacillus* cinsine ait türlerin tanımlanmasında türler arasındaki moleküler benzerliklerin fazla olması nedeniyle ayırım zorlaşmaktadır. Bu çalışma kapsamında, özellikle birbirine yakın akraba olan gruplar arasında karşılaştırma yaparak türlerin karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Moleküler tanımlama yapılan ve fenotipik özellikleri belirlenen izolatların endüstriyel kullanımları da ayrıca irdelenmiştir.

Yöntem: Kocaeli ilinin farklı bölgelerinden (Kocaeli Üniversitesi Kampüsü Kent Ormanı, Yuvacık Baraj Yolu üzerindeki tarlalar ve dere kenarı) alınan toprak örnekleri pastörizasyon işleminden sonra seri seyreltmeler hazırlanarak nutrient agar plaklara yayma ekim yapılmıştır. *Bacillus* benzeri koloniler morfolojik karakterlerine göre tek tek seçilip tekrar yayma ekimle saflaştırılmış ve numaralandırılmıştır. *Bacillus* cinsine ait olanlarda önce korunmuş bir gen bölgesi olan ve sınıflandırmada yaygın olarak kullanılan 16S ribozomal RNA (16S rRNA) gen dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Yakın akraba olanları birbirinden ayırmak için ilave moleküler (*gyrB* gen bölgesinin *Sau3AI* enzimi ile muamele edilmesi) ve biyokimyasal (seçici besiyerlerinde gelişme) analizler yapılmıştır. Filogenetik analizler NJ (neighbour joining)

ABSTRACT

Objective: The identification of *Bacillus* strains which are genetically related have become difficult. The aim of this study was to characterize the closely related groups of species by making comparisons. The industrial use of isolates that have been identified by molecular methods and their phenotypic properties documented have also been examined.

Methods: Soil samples were collected from different locations in Kocaeli town (Kocaeli University Campus, fields and creeks on Yuvacık Dam Road, Kent Forest), spread onto nutrient agar plates after pasteurization process followed by serial dilutions. Bacilli-like colonies were isolated according to their morphological characters. Individual colonies from each site were picked up, purified by re-streaking and numbered. Among a number of isolates, the ones belonging to *Bacillus* genus were subjected to 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene sequencing which is widely practiced technique due to the slow rates of evolution of this region of the gene. To discriminate the members of closely related taxa, additional molecular (restriction digestion of *gyrB* gene with *Sau3AI* enzyme) and biochemical analyses (growth in selective media) were performed. Phylogenetic trees

¹Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kocaeli

²Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Kocaeli

³Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Kocaeli

⁴Kocaeli Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Kocaeli



İletişim / Corresponding Author : Yonca YÜZÜGÜLLÜ-KARAKUŞ

Kocaeli Üni., Fen Edebiyat Fak. Dekanlık Binası, Biyoloji Böl., Kat: 1 No: 116 Kocaeli - Türkiye

Tel : +90 262 303 21 42

E-posta / E-mail : yonca.yuzugullu@kocaeli.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 10.11.2016

Kabul Tarihi / Accepted : 10.11.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.87004

Yüzügüllü-Karakuş Y, Sertel A, Duman Y, Polat F. Endüstriyel enzimler üreten *Bacillus* izolatlarının morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu. Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(4): 353-364

metodu ile gerçekleştirilmiştir. İzolatlar ayrıca fizyolojik özellikleri açısından karşılaştırılmıştır.

Bulgular: İzolatlara ait yedi farklı *Bacillus* türü (Y1: *B. cereus*, Y7: *B. pumilus*, Y12: *B. megaterium*, Y13: *B. methylotrophicus*, Y15: *B. subtilis*, Y35: *B. licheniformis* ve Y38: *B. sonorensis*) tanımlanmış ve her bir izolatın fizyolojik özellikleri kaydedilmiştir. Buna göre tüm izolatlar 30 ila 45 °C sıcaklık aralığında ve pH'sı 9 olan besi ortamında gelişme göstermiştir. Diğer yandan Y7, Y15, Y35 ve Y38 numaralı izolatlar 50 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda büyüme yeteneklerini korumuşlardır. Aralarında tuza en fazla tolerans gösterenin *B. licheniformis* olarak tanımlanmış olan Y35 numaralı izolat olduğu gözlenmiştir. Bu izolat yaklaşık %12 (w/v) oranında tuz içeren ortamda gelişebilmektedir. Tuza karşı duyarlılığı en fazla olan izolatlar ise *B. cereus* ve *B. megaterium* olarak tanımlanan Y1 ve Y12 numaralı izolatlar olup büyümelerinin %5'lik (w/v) NaCl'da durduğu kaydedilmiştir.

Sonuç: Yapılan bu çalışmada izolatların tür tanımlanması için seçilen 16S rRNA ve gyrB gen bölgelerinin, *Bacillus*'ların moleküler düzeyde ayırımında kullanılabileceği gösterilmiştir. Gerçekleştirilen biyokimyasal testler, moleküler analiz bulgularını desteklemiştir. İzolatların sıcaklık, pH ve tuz toleransları endüstride hali hazırda kullanılan *Bacillus*'larla karşılaştırılmış ve birçoğunun benzer fizyolojik koşullarda gelişme gösterdiği gözlenmiştir. Diğer yandan, izolatlardan Y1'in literatürde rapor edilen *B. cereus* suşlarından daha geniş bir pH aralığında gelişme gösterdiği bulunmuştur. *B. licheniformis* olarak tanımlanmış Y35 izolatında gözlenen yüksek tuz konsantrasyonu (%12, w/v) içeren ortamlarda gelişebilme yeteneği ise toprak *Bacillus*'larında ilk defa bu çalışmada sunulmuştur. Sonuç olarak, Y1 ve Y35 başta olmak üzere tür tanımlaması yapılan tüm izolatların endüstriyel biyoteknoloji alanında özgün enzim ya da toksin üretimi, ilaç hammadde sentezi gibi veya benzeri çalışmaların yapılmasına olanak sağlayabilecekleri düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, tanımlama, endüstri, filogeni, fizyoloji

were constructed using the neighbor-joining method. The isolated were also analyzed in terms of their tolerance against different physiological conditions and the biochemical characteristics of them were compared with reference strains.

Results: 7 different isolates (Y1; *B. cereus*, Y7; *B. pumilus*, Y12; *B. megaterium*; Y13; *B. methylotrophicus*, Y15; *B. subtilis*, Y35; *B. licheniformis*, Y38; *B. sonorensis*) have been identified to species level and physiological characteristics of each have been documented. Accordingly, all isolates were able to grow at temperatures from 30 to 45 °C and pH 9. The isolates numbered as Y7, Y15, Y35 and Y38 were observed to tolerate temperatures up to 50 °C. Among all, *B. licheniformis* numbered as Y35 presented the highest tolerance to salt concentration of 12% (w/v). The most sensitive ones to salt were *B. cereus* and *B. megaterium* numbered as Y1 and Y12, respectively. Those isolates did not grow in the presence of 5% (w/v) NaCl concentration.

Conclusion: The 16S rRNA and gyrB genes, selected to identify the isolates, have been proven to be used for classification of *Bacillus* at molecular level. Biochemical tests confirmed the molecular analysis outcomes. Temperature, pH and salt tolerance of the isolates were compared with the *Bacillus* species already used in industry. Many of them presented similar growth potential against to the physiological conditions tested. On the other hand, the isolate Y1 was found to show ability to grow broad pH range than those reported for *B. cereus*. The capability of a soil *B. licheniformis*, isolate Y35, to grow in medium with high salt (12%, w/v) was presented for the first time. In summary, the isolated and identified *Bacillus* species here are believed to promote many studies including novel enzyme, toxin and pharmaceutically important compound production in industrial biotechnology field.

Key Words: *Bacillus*, identification, industry, phylogeny, physiology

GİRİŞ

Bacillaceae familyası içerisinde yer alan *Bacillus* cinsi, genelde Gram pozitif, çubuk şekilli, endosporlu, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşur (1). Bugüne kadar izole edilmiş ve tanımlanmış 88 *Bacillus* türü bulunmaktadır (2). Bütün türler Nutrient Agar (NA) ve Kanlı Agar (KA) başta olmak üzere Trypticase Soy Agar (TSA) ve Brain Heart Infusion (BHI) gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürerler (3). *Bacillus*'lar antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilebilmeleri sebebiyle dikkat çeken mikroorganizmalardır. Ayrıca, sporlanma kabiliyetleri ve metabolizma faaliyetlerinin çeşitliliği geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır (1). Endüstriyel enzim üretiminde kullanılan *Bacillus* türleri arasında *B. licheniformis* (proteaz) (4), *B. subtilis* (α -amilaz, proteaz, hidroksilaz, alkol dehidrojenaz, vb) (5-6), *B. pumilus* (lipaz) (7) ve *B. megaterium* (kazeinaz ve keratinaz) (8) yer almaktadır. *Bacillus* cinsi bakterilerin birçoğu çeşitli böcek larvalarına patojenik etki gösterdiklerinden biyolojik kontrol ajanı olarak da kullanılmaktadır (9).

Bacillus'ların tanımlanması ve sınıflandırılmasında spor morfolojisi başta olmak üzere klasik biyokimyasal ve fizyolojik testler (karbohidrat kullanımı, gaz oluşumu, enzim üretimi, oksijen kullanımı, gram boyama, vb) kullanılmaktadır. Bu testlerin yanısıra bakterilerden DNA izolasyonu yapılarak 16S ribozomal RNA (16S rRNA) gibi gen bölgelerinin nükleotid dizileri belirlenip moleküler analiz yapılarak tür teşhisine gidilebilmektedir (10).

Bu çalışmada, topraktan izole edilen farklı *Bacillus*'ların morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması amaçlanmıştır. Teşhisi yapılan izolatların optimum büyüme sıcaklıkları, NaCl toleransı ve gelişme gösterdikleri pH aralıkları belirlenerek endüstriyel kullanımlarının uygunluğu irdelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Toprak örnekleri, toprağın üst yüzey materyalleri süpürüldükten sonra steril bir spatula ile yüzeyin yaklaşık 2-5 cm aşağısından 10 gram alınarak steril tüplere konulmuştur. Alınan örnekler kullanılabilecek kadar +4°C'de saklanmıştır (11).

Toprak örneklerinden *Bacillus* cinsine ait bakterileri izole etmek için her toprak örneğinden (Kocaeli ilinin farklı bölgelerinden alınan) 1'er gram tartılarak, içinde 9 ml steril saf su bulunan deney tüplerine aktarılmış ve karıştırıcıda 5 dakika kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Ardından 80°C'de 10 dakika (pastörizasyon) bekletilmiştir. Bir dizi seri seyreltme ile hazırlanan örnekler (10⁻¹'den 10⁻⁶'ya kadar) NA besiyerine 0.1 ml ekimler yapılarak 37°C'de bir gece inkübe edilmiş ve morfolojik olarak *Bacillus*'a benzeyen kolonilerden rastgele seçim yapılmıştır. Seçilen kolonilerden NA besiyerine çizgi ekim yapılarak elde edilen saf kültürler Y1, Y2, Y3 vb. şeklinde numaralandırılmış ve Nutrient Broth (NB) besiyerine inoküle edilip daha sonra kullanılmak üzere %20'lik (w/v, son konsantrasyon) steril gliserol içerisinde -80°C'de saklanmıştır.

Saflaştırılan kültürlerden Gram pozitif çubuk şekilli olanlar deney materyali olarak seçilmiştir. Şüpheli izolatların *Bacillus* cinsine ait olup olmadığının değerlendirilmesi ise VITEK-MS cihazı (bioMérieux, Fransa) ile yapılmıştır.

Bacillus bakterilerinin moleküler düzeyde tespiti için peqGOLD Bacterial DNA Mini Kit kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından 16S rRNA ve gyrB gen bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. 16S rRNA gen bölgesi için F5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve R5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3' primerleri (12), gyrB gen bölgesi için ise F5'-GTTTCTGGTGGTTTACATGG-3' ve R5'-CAACGTATGATTAATCCACC-3' primerleri kullanılmıştır (13). PZR reaksiyonu her iki gen için de 50 µl olacak şekilde; 8 µl DNA, 5 µl 10x KOD Hot Start DNA polimeraz tamponu, 3 µl 25 mM MgSO4,

1 µl KOD Hot Start DNA polimeraz (1 U/µl), 5 µl 2 mM dNTP karışımı, 1,5'er µl 10 µM ileri (forward) ve geri (reverse) primerler alınarak hazırlanmıştır. 16S rRNA gen bölgesi için PZR koşulları; 95°C'de 2 dk. başlangıç denatürasyonu takiben 30 döngü 95°C'de 30 sn. denatürasyon, 52°C'de 30 sn. primer bağlama ve 72°C'de 90 sn. uzama basamakları, ardından 72°C'de 10 dk. son uzama basamağı ile gerçekleştirilmiştir. GyrB gen bölgesi için PZR koşulları; başlangıç denatürasyonu 95°C'de 2 dk. olacak şekilde 95°C'de 30 sn. 58°C'de 30 sn., 68°C'de 90 sn.'de 30 döngü olmak üzere 68°C'de 10 dk. son uzama basamağı ile gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri %1'lik (w/v) agaroz jelde 100 V'da 60 dakika yürütülmüş ve UV cihazı altında görüntülenmiştir. 352 bç'lik gyrB geni PZR ürünleri ayrıca Sau3AI enzimi (NEB, İngiltere) ile 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Restriksiyon kesim ürünleri %2,5'luk (w/v) agaroz jelde 100 V'da 60 dakika yürütülmüş ve bantlar DNA görüntüleme cihazında (UVP-GelDoc-It 310) UV ışık altında görüntülenmiştir. Jellerin fotoğrafları dijital olarak bilgisayar ortamında çekilmiştir. Her iki gene ait PZR ürünleri için DNA dizi analizi yaptırılmıştır (Medsantek-İstanbul). Elde edilen diziler Gen Bankasındaki mevcut dizilerle BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Bacillus izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyonu için örneklerden koloni alınıp, 5-7 ml'lik metabolik testlere özgü besiyerlerine inoküle edildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İzolatlar hücre şekli, koloni görünümü (büyüklüğü, şekli, kenarlarının ve yüzeyinin düzgün olup olmadığı, mat ve parlaklık durumu, kokusu, kıvamı, vb), endospor oluşumu ve pigmentleşme yönünden analiz edilmiştir. İzolatlara IMVIC, jelatin ve nişasta hidrolizi ile üç şekerli demir (TSI) agar testleri uygulanmıştır (14). Ayrıca mikroorganizma gelişimini etkileyen fiziksel etkenlerden sıcaklık (30-55°C), pH (5-12) ve tuzun (%3-14, w/v) etkilerini araştırmak için koloniler ayrı ayrı 5 ml'lik NB besiyerlerine inoküle edilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sıcaklık etkisinin test edilmesi hariç diğer tüm büyüme

analizleri 37°C'de gerçekleştirilmiştir.

16S rRNA dizileri yüksek oranda benzerlik gösteren *Bacillus* türlerinin ayrımı için özel biyokimyasal testler kullanılmıştır. *B. sonorensis* ve *B. licheniformis* türlerini ayırt etmek amacıyla izolatların tirozin ve pH 5.6 agar besiyerlerine ekimleri yapılmış ve 30°C'de 15 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır (15). *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. mycoides*'in ayrımı için ise izolatlar MYP (Mannitol-egg-yolk-polymyxine) Agar besiyerine yayma ekim yapılmış ve 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (16).

İzolatların filogenetik ağaçları, MEGA6 (17) filogenetik analiz programı kullanılarak neighbor-joining (NJ) metodu ile oluşturulmuştur.

BULGULAR

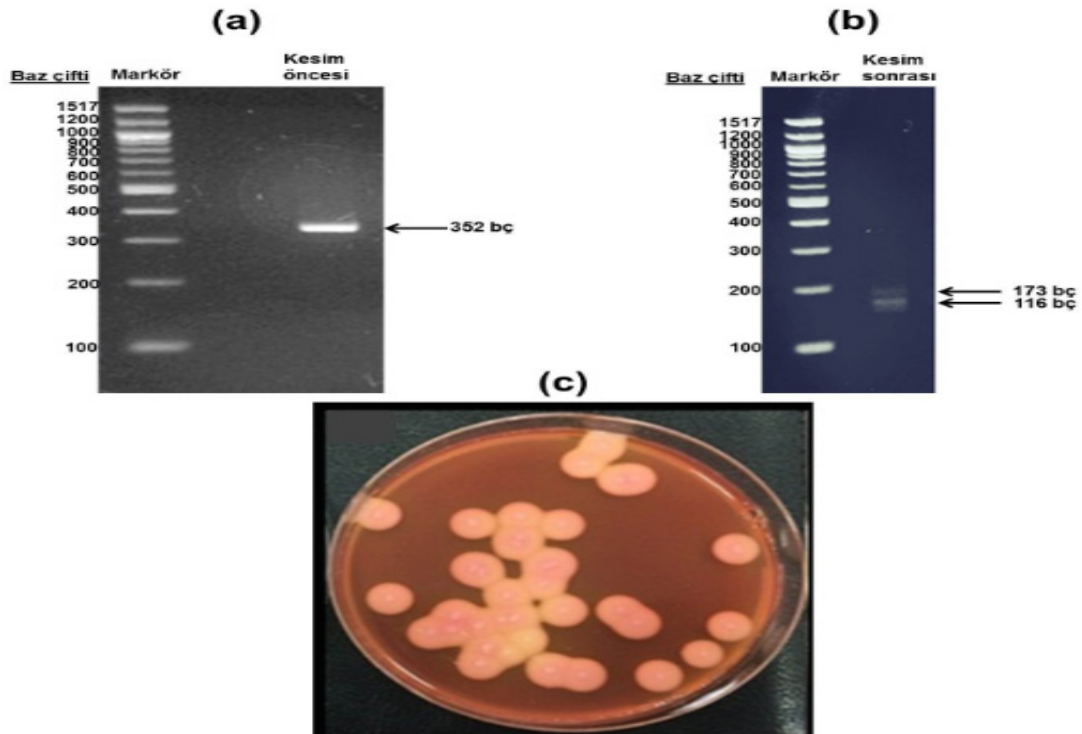
Bu çalışmada, topraktan izole edilen 45 izolatın Gram boyama ve takip eden VITEK-MS analizleri sonucunda 20 tanesinin *Bacillus* cinsine ait olmadığı gözlenmiştir. Koloni morfolojilerinin karşılaştırılması (18) sonucu geriye kalan 25 izolattan birbirine benzer (Tablo 1) olanlar çıkartılarak çalışmaya 7 izolat ile devam edilmiştir.

PZR ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgeleri yaklaşık 1500 bç uzunluğunda elde edilmiştir. Belirlenen nükleotid dizileri NCBI gen bankasına yüklenerek her biri için GenBank numarası alınmıştır (GenBank Erişim Numaraları: Y1, KX549260; Y7, KX592605; Y12, KX592602; Y13, KX588227; Y15, KX592604; Y35, KX592606 ve Y38, KX592603). NCBI genom veri bankasının BLAST programı kullanılarak örneklere ait DNA dizileri GenBank'ta kayıtlı mevcut dizilerle karşılaştırılarak benzerlikleri bulunmuştur (Tablo 2).

Y1 için 16S rRNA dizisi veri bankasında farklı tür *Bacillus* bakterileri ile yüksek oranda benzer çıktığından tür tanımlaması için ilave olarak gyrB gen bölgesi de çalışılmıştır (Tablo 2). Yaklaşık 352 bç uzunluğunda elde edilen gyrB gen dizisi Gen Bankasına kaydedilmiştir (KX592164). Şekil 1b'de görüldüğü üzere kesim sonrası iki adet bant (yaklaşık 173 bç ve 116 bç'lik) elde edilmiştir. Y1 izolatının MYP agarda

Tablo 1. *Bacillus* izolatlarının koloni morfolojilerinin karşılaştırılması, Kocaeli

İzolat Numarası	Koloni formu	Kenar	Yükseklik	Pigmentasyon	Doku	Optik yapısı	Büyüklik (cm)
Y1, Y3, Y5, Y6, Y8, Y9, Y17, Y19, Y23, Y49, Y50	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0.6-0.8
Y7, Y11, Y14, Y18, Y22	Yuvarlak	Düz	Kabartı şeklinde	Sarı	Yağsı	Opak	0.3-0.4
Y12	Yuvarlak	Düz	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0.4
Y13, Y37, Y44	Yuvarlak	Dalgalı	Kabartı şeklinde	Krem	Yapışkan	Yarı-saydam	0.9-1
Y15	Düzensiz	Dalgalı	Kraterimsi	Krem	Yapışkan	Opak	0.4
Y35	Düzensiz	Dalgalı	Düz	Krem	Yapışkan	Yarı-saydam	0.4
Y38, Y47, Y48	Düzensiz	Dalgalı	Kabartı şeklinde	Krem	Yapışkan	Yarı-saydam	0.6-0.8



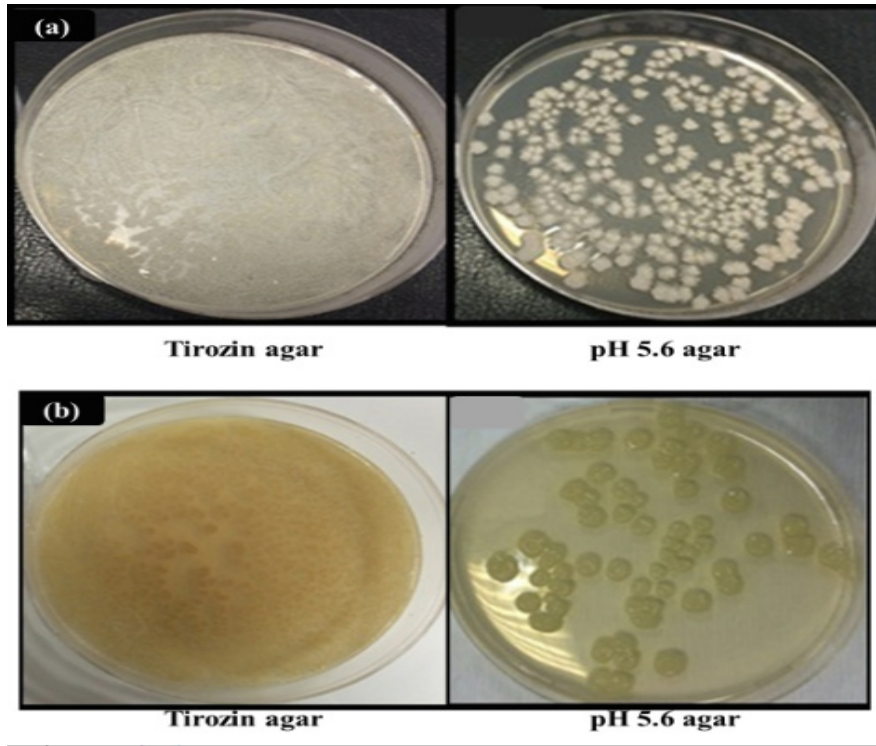
Şekil 1. Y1 *Bacillus* izolatına ait kısmi gyrB geninin Sau3AI enzimi ile kesim öncesi (a) ve sonrası (b) % 2,5 (w/v)'luk agaroz jel görüntüsü. Oklar; DNA fragmanlarına ait bantları göstermektedir. (c) Y1 izolatına ait MYP Agar besiyerindeki koloni görüntüleri.

Tablo 2. Y1, Y7, Y12, Y13, Y15, Y35 ve Y38 izolatlarının 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanması

İzolat numarası	Bakteri örnekleri	Erişim numarası	% Benzerlik	Agaroz jel görüntüsü
Y1	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	NR_074540.1	99	
	<i>B. anthracis</i> str. Ames	NR_074453.1	99	
	<i>B. toyonensis</i> BCT-7112	NR_121761.1	99	
	<i>B. pseudomycooides</i> NBRC 101232	NR_113991.1	99	
	<i>B. thuringiensis</i> ATCC 10792	NR_114581.1	99	
Y7	<i>B. pumilus</i> SAFR-032	NR_074977.1	100	
	<i>B. safensis</i> NBRC 100820	NR_113945.1	99	
	<i>B. stratosphericus</i> 41KF2a	NR_118441.1	99	
	<i>B. aerius</i> 24K	NR_118439.1	99	
	<i>B. altitudinis</i> 41KF2b	NR_042337.1	99	
Y12	<i>B. megaterium</i> ATCC 14581	NR_116873.1	100	
	<i>B. aryabhatai</i> B8W22	NR_118442.1	99	
	<i>B. simplex</i> DSM 1321	NR_115603.1	99	
	<i>B. flexus</i> SBMP3	NR_118382.1	99	
Y13	<i>B. methylotrophicus</i> CBMB205	NR_116240.1	100	
	<i>B. amyloliquefaciens</i> MPA 1034	NR_117946.1	99	
	<i>B. subtilis</i> 168	NR_102783.1	99	
	<i>B. siamensis</i> PD-A10	NR_117274.1	99	
	<i>B. vallismortis</i> DSM 11031	NR_024696.1	99	
Y15	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	NR_118486.1	100	
	<i>B. subtilis</i> JCM 1465	NR_113265.1	100	
Y35	<i>B. licheniformis</i> DSM 13	NR_118996.1	99	
	<i>B. sonorensis</i> NBRC 101234	NR_113993.1	98	
	<i>B. aerius</i> 24K	NR_042338.1	98	
	<i>B. atropheus</i> NBRC 15539	NR_112723.1	97	
Y38	<i>B. sonorensis</i> NRRL B-23154	NR_025130.1	99	
	<i>B. licheniformis</i> DSM 13	NR_118996.1	99	
	<i>B. aerius</i> 24K	NR_042338.1	98	
	<i>B. atropheus</i> 1942	NR_075016.1	97	

Tablo 3. Y7, Y13 ve Y15 izolatlarının fenotipik özelliklerinin karşılaştırılması

	Y7	Y13	Y15
İndol oluşumu	+	+	-
Metil Kırmızısı	+	-	-
Asetoin üretimi	-	+	+
Sitrat kullanımı	-	+	+
Nişasta hidrolizi	+	+	+
Jelatinaz üretimi	+	+	+
Glukozdan asit üretimi	+	+	+
Laktozdan asit üretimi	+	-	-
H ₂ S üretimi	-	-	-

**Şekil 2.** Y35 (a) ve Y38 (b) izolatlarının Tirozin ve pH5.6 agar besiyerlerindeki görüntüleri.

inkübasyonu ile etrafında çökelti şeklinde gözlenen pembe renkli koloniler oluşmuştur (Şekil 1c).

Y7, Y13 ve Y15 izolatlarının tanımlanması için Tablo 3’de verilen biyokimyasal testler uygulanmıştır. Y35 ve Y38 izolatlarının biyokimyasal analizleri için

Tirozin agar ile pH 5.6 agar besiyerlerinde büyütme denemeleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 2a’da görüldüğü üzere Y35 izolatı her iki besiyerinde krem renkli kolonilerin oluşmasını desteklemiştir. Y38 ise tirozin agarda kahverengi, pH 5.6 agarda ise parlak sarı

renkte koloniler şeklinde gelişmiştir (Şekil 2b).

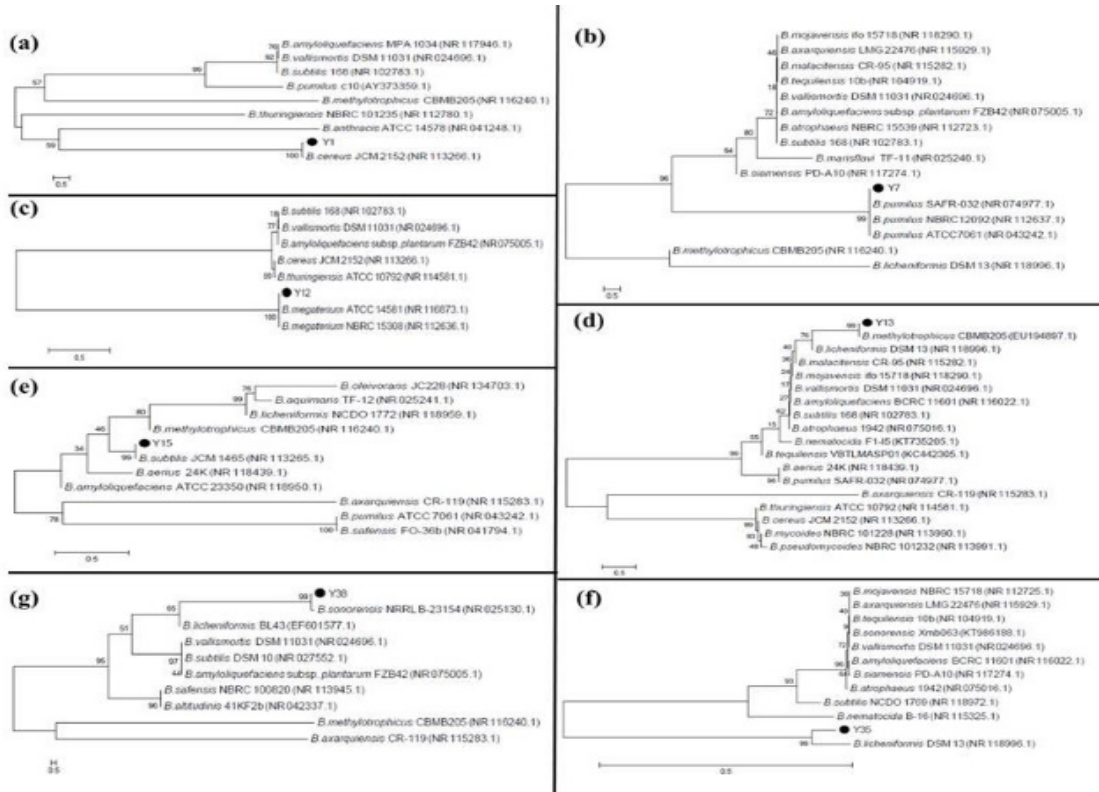
Fizyolojik koşulların etkisine bakıldığında (Tablo 4), izolatların hiçbiri 55°C sıcaklık, pH 11-12 aralığında ve %14 NaCl (w/v) konsantrasyonunda gelişmemiştir.

Filogenetik analiz sonucunda, Y1 izolatının *B. cereus* JM2152 ile %100, Y7'nin *B. pumilus* SAFR-032

ile %99, Y12 izolatının *B. megaterium* ATCC 14581 ile %100, Y13'ün *B. methylotrophicus* CBMB205 ile %99, Y15 izolatının *B. subtilis* JCM 1465 ile %99, Y35'in *B. licheniformis* DSM13 ile %99 ve Y38 izolatının *B. sonorensis* NRRLB-23154 ile %99 oranında benzer oldukları gözlenmiştir (Şekil 3).

Tablo 4. Y1, Y7, Y12, Y13, Y15, Y35 ve Y38 izolatlarının sıcaklık, pH ve NaCl toleranslarının karşılaştırılması

	Y1	Y7	Y12	Y13	Y15	Y35	Y38
Büyüme sıcaklığı (°C)							
30	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	+
50	-	+	-	-	+	+	+
55	-	-	-	-	-	-	-
pH							
5	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-
NaCl miktarı (%w/v)							
3	+	+	+	+	+	+	+
5	-	+	-	+	+	+	+
8	-	-	-	+	+	+	-
10	-	-	-	+	-	+	-
12	-	-	-	-	-	+	-
14	-	-	-	-	-	-	-



Şekil 2. Y1 (a), Y7 (b), Y12 (c), Y13 (d), Y15 (e), Y35 (f) ve Y38 (g) izolatlarının 16S rRNA gen bölgelerine ait NJ metodu ile oluşturulan filogenetik ağaçlar.

TARTIŞMA

Bacillus cinsi bakteriler kolay üretilebilen, endüstriyel öneme sahip antibiyotik, enzim, toksin ve biyoplastik gibi sekonder metabolitleri sentezleyebilen ve patojenite özellikleri olan mikroorganizmalardır (9).

Bacillus sınıflandırmasının temeli Gordon ve meslektaşları (19) tarafından ortaya atılmıştır. Tür tanımlaması öncelikle endospor şekline ve ana hücredeki pozisyonuna göre yapılmış ve gruplar oluşturulmuştur. İlk olarak bir izolat bu gruplardan birinin içine dahil edilip ikinci olarak fizyolojik ve biyokimyasal testler kullanılarak tür seviyesinde tanımlaması yapılmıştır (19). Biyokimyasal analizler üzerine zamandan kazanç sağlamak amacıyla günümüzde yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bunların başında çalışılan numunenin protein spektrumunun cihazın veritabanında bulunan referans spektrumları ile karşılaştırılması esasına dayanan VITEK Kütle spektroskopisi gelmektedir (20). Bu yöntem standart

immünojenik ve biyokimyasal yöntemlerden daha güvenilir ve ucuzdur (20). Morfolojik ve biyokimyasal analizlere ek olarak tür düzeyinde tespit yapabilmek için çeşitli moleküler yöntemler (kromozomal DNA bileşimi, DNA-DNA sıvı hibridizasyon, 16S rRNA dizi analizi, *gyrA* ve/veya *gyrB* dizi analizleri vb.) de geliştirilmiştir (9-10).

Bu çalışmada Kocaeli ilinin farklı bölgelerinden toplanan toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* cinsine ait izolatların tanımlanması ve karakterizasyonu hedeflenmiştir. Buna göre öncelikle saf haldeki izolatlar koloni morfolojilerine göre kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Tablo 1’de verilen bulgularda koloni morfolojileri birbirine benzeyen izolatlar aynı grup içinde toplanmıştır.

Yedi izolata ait kısmi 16S rRNA gen bölgesi analizlerine göre Y7 izolatu *B. pumilus*’a, Y12 izolatu *B. megaterium*’a, Y13 izolatu *B. methylotrophicus*’a ve Y15 ise *B. subtilis*’e %100 oranında homoloji göstermiştir

(Tablo 2). Benzer şekilde Y35 ve Y38 izolatlarının sırasıyla *B. licheniformis*'e ve *B. sonorensis*'e %99 oranında benzerlik gösterdikleri bulunmuştur (Tablo 2, Şekil 3). Elde edilen bulgular, seçilen gen bölgesinin bu altı izolat için uygun olduğuna işaret etmektedir. Diğer yandan Y1 için durum daha karmaşık olup beş farklı *Bacillus* türüne aynı oranda homoloji tespit edilmiştir. Bu durum 16S rRNA dizi analizinin bu izolatın moleküler tanımlanmasında tek başına yeterli olmadığını ve ilave yöntemlerin gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bunun üzerine diğer bir korunmuş gen bölgesi olan *gyrB* geni çoğaltılmıştır. Bu gen DNA replikasyonunda rol oynayan DNA giraz enziminin B alt ünitesini kodlamakta ve 16S rRNA gen dizileri birbirine çok yakın olan türlerin ayrımında sıklıkla tercih edilmektedir (21). İzolata ait *gyrB* geninin BLAST sonucuna göre Y1'in benzerlik gösterdiği *Bacillus* tür sayısı ikiye (*B. cereus* ve *B. thuringiensis*) inmiştir (data gösterilmemiştir). Y1'in bu iki *Bacillus*'tan hangisi olduğuna dair moleküler kanıtlar elde etmek için *gyrB* geni bu sefer Sau3AI enzimi ile muamele edilmiştir. Eğer izolat, *B. thuringiensis* ise Sau3AI enzimi bir yerden, *B. cereus* ise iki yerden kesmesi beklenmektedir (13). Nitekim Şekil 1b'de gözlenen sonuç Y1'in *B. cereus* olabileceğine işaret etmiştir. Bu izolat için ayrıca *cry* genlerin varlığına da bakılmış ancak herhangi bir ürün gözlenmemiştir (data gösterilmemiştir). Bu sonuç izolatın büyük doğruluk ile *B. thuringiensis* (*cry* gene sahip) olmadığını doğrular niteliktedir.

Moleküler testleri desteklemek amacıyla her bir izolata biyokimyasal analizler de uygulanmıştır. Bu çalışmada Y1 izolatının seçici bir besiyeri olan MYP agarda *B. cereus* ile benzer koloni morfolojileri gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 1c). Sonuçlarımız moleküler testleri doğrular niteliktedir. Nitekim *B. cereus* genel olarak mannitolü kullanmadığı için agar üzerinde pembe koloniler oluştururken, mannitol pozitif olanların koloni rengi sarıdır. Besiyeri bileşimindeki yumurta sarısı ise *B. cereus* 'un lesitinaz aktivitesi ile belirlenmesini sağlar. *B. cereus* lesitinaz pozitif olduğu için kolonileri etrafında beyaz bir çökelti meydana gelir (16).

Y7 izolatı VITEK MS (bioMérieux, Fransa) yöntemiyle analiz edilmiş ve izolatın *B. pumilus*'a %100 benzediği bulunmuştur. Y13 ve Y15 izolatları için

gerçekleştirilen biyokimyasal test sonuçları literatürde rapor edilen benzer suşlar ile karşılaştırılmıştır. Y13'de gerçekleştirilen indol, metil kırmızı, VP ve sitrat testi, glukozdan asit üretimi, H₂S oluşumu, jelatin ve nişasta hidroliz testi sonuçları *B. methylotrophicus* DSM28326 (22) ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Y15'de yapılan biyokimyasal analiz sonuçlarının ise farklı kaynaklardan izole edilen *B. subtilis* örnekleri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Örneğin, IMVIC testi, jelatin ve nişasta hidroliz testi sonuçları *B. subtilis* F-2-01 ile benzerdir (23). Ayrıca Zheng ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada topraktan izole edilen nitril çözücü *B. subtilis* ZJB-063'ün Y15'te gözlemediği gibi H₂S üretmediği ancak glukozdan asit oluşturduğu rapor edilmiştir (24). Laktozdan asit üretim sonucunun da *B. subtilis* NCDO 1769T türü ile benzerlik gösterdiği (25) tespit edilmiştir.

Y35 ve Y38 izolatları arasında net ayrım oldukça basit olan bir biyokimyasal testle mümkün olmaktadır. Buna göre *B. sonorensis*'in pH 5.6 agarda koloni renkleri parlak sarı iken tirozin agar'da kahverengi, *B. licheniformis*'in kolonileri ise; pH 5.6 ve tirozin agar'da kremdir (15). Şekil 2'de gözlenen koloni oluşum renkleri Y35'in *B. licheniformis*, Y38'in ise *B. sonorensis* olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak gerçekleştirilen morfolojik, moleküler ve biyokimyasal analizler çalışmada kullandığımız yedi izolat için tür tanımlaması yapmamızı sağlamıştır. Buna göre Y1: *B. cereus*, Y7: *B. pumilus*, Y12: *B. megaterium*, Y13: *B. methylotrophicus*, Y15: *B. subtilis*, Y35: *B. licheniformis* ve Y38: *B. sonorensis* olarak belirlenmiştir. Tanımlanan bu izolatlar arasında farklı uygulama alanlarında uzun zamandır kullanılan ve/veya özellikleri yeni keşfedilen *Bacillus*'lar da bulunmaktadır (4, 5, 7). Bu nedenle sunulan bu çalışmada son olarak tür tanımlanmaları yapılan *Bacillus*'ların farklı koşullarda büyüme yeteneklerini inceleyerek endüstride hali hazırda kullanılan benzer türlere alternatif olarak kullanılabilirlikleri irdelenmiştir.

Yedi izolatın sıcaklık, pH ve tuza karşı toleransları ölçülmüştür. Buna göre Y1'in 30°C ve 45°C sıcaklıklarda, pH 5-10 aralığında ve %3 (w/v) NaCl'da büyüme gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4). Y1 izolatının büyüme potansiyeli endüstriyel *B. cereus*

suşları ile karşılaştırıldığında gelişme gösterdiği sıcaklık aralığının diğer suşlarla uyumlu olduğu görülmüştür (26-27). Diğer yandan literatürde rapor edilen suşlardan daha geniş bir pH aralığında büyüebilmesi bu izolatın alkali enzimlerin üretilmesinde kullanılabileceğini düşündürmektedir (26-27). Y7'ye ait büyüme sıcaklık değerlerinin (30-50°C) Hindistan'ın kıyı çevresinden izole edilen *B. pumilus*'un sıcaklık potansiyeli ile benzer olduğu görülmüştür (28). Y12 izolatu ise 30°C ve 45°C sıcaklıkta, pH 5-9 aralığında ve %3 (w/v) NaCl'de büyüme göstermektedir (Tablo 4). Literatürde alkali koşullarda gelişen *B. megaterium*'un biyoplastik üreticisi olarak kullanılabileceği öngörülmektedir (29). Y12 izolatının da alkali koşullarda gelişme göstermesi endüstriyel uygulama alanlarının araştırılması açısından umut vadetmektedir.

Endüstriyel *Bacillus*'lar arasında en sık kullanılanlar *B. subtilis* ve *B. licheniformis*'tir. Literatürde rapor edilen *B. subtilis* suşları (30-31), Y15 izolatu ile özellikleri açısından karşılaştırıldığında sıcaklık, pH ve tuz profilleri uyumlu olmakla birlikte Y15'in %8 (w/v) NaCl içeren ortamda gelişebilmesinin tuz içeriği yüksek işlemlerde avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir. Diğer bir *Bacillus* türü olan *B. licheniformis*, deterjan endüstrisi başta olmak üzere biyoyakıt üretimi, pestisit yıkımı ve antibiyotik üretimi gibi uygulamalarda tercih edilmektedir (4,32). Ayrıca son yıllarda keratinaz

enzim üretme yeteneklerini kullanarak doğada yaygın bulunan kuş tüylerinin besin değeri yüksek gıdalara dönüştürülmesi konusunda araştırmalar da bulunmaktadır (33). Endüstride hali hazırda kullanılan *B. licheniformis* suşları ile Y35 izolatının farklı fizyolojik koşullardaki büyüme yetenekleri karşılaştırıldığında sıcaklık ve pH profillerinin benzer olduğu göze çarpmaktadır. Diğer yandan, sadece Y35'de gözlenen yüksek tuz konsantrasyonu (%12 w/v) içeren ortamlarda gelişebilme durumu çalışmada adı geçen hiçbir toprak *Bacillus*'unda henüz rapor edilmemiştir. Tuzlu ortamlarda gelişen mikroorganizmalar proteaz ve lipaz gibi enzimlerin üretimi, biyosülfektan sentezi ve pigment (karotenoidler) üretimi gibi endüstriyel uygulama alanlarına sahip olmaları açısından önemlidirler (34). Y35 izolatu da ılımlı halofilik mikroorganizmalar (%7-15 w/v oranında NaCl'e gereksinim duyan) grubuna girmesi (35) açısından dikkat çekmektedir.

Genelde endüstride yüksek sıcaklık, pH veya tuz gibi zor koşullara dayanıklı olan enzimler/enzim üreticileri tercih edilmektedir (22). Y35 başta olmak üzere tür tanımlaması yapılan tüm izolatlarda gözlenen sıcaklık, pH ve tuz tolerans yeteneklerinin endüstriyel açıdan izolatların kullanım alanlarını arttıracığına inanılmaktadır.

KAYNAKLAR

- Öztürk F. Ankara'daki topraklardan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması, moleküler düzeyde tiplendirilmesi ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
- Brenner DJ, Krieg NR, Garrity GM, Staley JT. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer US, 2005: 1105-40.
- Kalaylı E, Beyatlı Y. *Bacillus* cinsi bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri, PHB üretimleri ve plazmid DNA'ları. *Orlab On-Line Mikrobiyol Derg*, 2003; 1 (12): 24-35.
- Hanlon GW, Hodges NA. Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilized carbon and nitrogen sources. *J Bacteriol*, 1981; 147 (2): 427-31.
- Parthipan P, Preetham E, Machuca LL, Rahman PK, Murugan K, Rajasekar A. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Front Microbiol*, 2017; 8: 193.
- Palomba R, Formisano G, Arrichiello A, Auriemma G, Sarubbi F. Development of a laboratory technique for the evaluation of protease enzymes activity in goat and sheep milk. *Food Chem*, 2017; 221: 1637-41.
- Saranya P, Sukanya Kumari H, Prasad Rao B, Sekaran G. Lipase production from a novel thermo-tolerant and extreme acidophile *Bacillus pumilus* using palm oil as the substrate and treatment of palm oil-containing wastewater. *Environ Sci Pollut Res*, 2014; 21: 3907-19.

8. Aghari S, Wadhwa N. Isolation and characterization of feather degrading enzymes from *Bacillus megaterium* SN1 isolated from Ghazipur poultry waste site. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012; 48 (2): 175-81.
9. Rosovitz MJ, Voskuil MI, Chambliss GH. *Bacillus*, systematic bacteriology. In: Collier L, Balows A, Susman M, eds. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Oxford University Press, 1998: 5-730.
10. Chang YH, Shangkuan YH, Lin HC, Liu HW. PCR assay of the GroEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. *Appl Environ Microbiol*, 2003; 69 (8): 4502-10.
11. Kim HS, Lee DW, Woo SD, Yu MY, Kang KS. Distribution, serological identification, and PCR analysis *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. *Curr Microbiol*, 1998; 37 (3): 195-200.
12. Singh S, Moholkar VS, Goyal A. Isolation, identification and characterization of a cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain SS35 from rhinoceros dung. *ISRN Microbiol*, 2013; 728134: 7.
13. Manzano M, Cocolin L, Cantoni C, Comi G. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. *Int J Food Microbiol*, 2003; 81 (3): 249-54.
14. Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Falkinham JO. *Collins and Lyne's Microbiological Methods*, 8th ed. London: Arnold, 2004.
15. Palmisano M, Nakamura L, Duncan K, Istock C, Cohan, F. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001; 51 (5): 1671-79.
16. Kalkan S, Halkman K. *Bacillus cereus*'un standart analiz yöntemi. *Orlab On-Line Mikrobiyol Derg*, 2006; 4 (3): 31-6.
17. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 2013; 30 (12): 2725-29.
18. Akşit F, Akgün Y, Kiraz N. Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. 8. baskı, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 2006.
19. Gordon RE, Haynes WC, Pang CHN. The Genus *Bacillus*. In: *Agriculture Handbook No.427*, D.C. United States Department of Agriculture, Washington, DC. 1973: 98-9.
20. Çetinkaya E, Ayhan K. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Fen Müh Derg*, 2012; 2 (1): 53-62.
21. Wang L-T, Lee F-L, Tai C-J, Kasai H. Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007; 57: 1846-50.
22. Duman Y, Yüzügüllü YK, Sertel A, Polat F. Production, purification and characterization of a thermo-alkali stable and metal-tolerant carboxymethylcellulase from newly isolated *Bacillus methylotrophicus* Y37. *Turk J Chem*, 2016; 40 (5): 802-15.
23. Kubota H, Matsunobu T, Uotani K, Takebe H, Satoh A, Tanaka T, Taniguchi M. Production of poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993; 57 (7): 1212-13.
24. Zheng YG, Chen J, Liu ZQ, Wu MH, Xing LY, Shen YC. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* ZJB-063, a versatile nitrile-converting bacterium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008; 77 (5): 985-93.
25. Huang XW, Niu QH, Zhou W, Zhang KQ. *Bacillus nematocida* sp. nov., a novel bacterial strain with nematotoxic activity isolated from soil in Yunnan, China. *Syst Appl Microbiol*, 2005; 28 (4): 323-7.
26. Mohandass R, Rout P, Jiwal S, Sasikala C. Biodegradation of benzo[a]pyrene by the mixed culture of *Bacillus cereus* and *Bacillus vireti* isolated from the petrochemical industry. *J Environ Biol*, 2012; 33 (6): 985-9.
27. Martinez S, Borrajo R, Franco I, Carballo J. Effect of environmental parameters on growth kinetics of *Bacillus cereus* (ATCC 7004) after mild heat treatment. *Int J Food Microbiol*, 2007; 117 (2): 223-7.
28. Parvathi A, Krishna K, Jose J, Joseph N, Nair S. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Braz J Microbiol*, 2009; 40 (2): 269-75.
29. Salgaonkar BB, Mani K, Braganca JM. Characterization of polyhydroxyalkanoates accumulated by a moderately halophilic salt pan isolate *Bacillus megaterium* strain H16. *J Appl Microbiol*, 2013; 114: 1347-56.
30. Singh G, Kumari A, Mittal A, Yadav A, Aggarwal NK. Poly -hydroxybutyrate production by *Bacillus subtilis* NG220 using sugar industry waste water. *Biomed Res Int*, 2013; 2013: 952641.
31. Tang B, Xu H, Xu Z, Xu C, Xu Z, Lei P, Qiu Y, Liang J, Feng X. Conversion of agroindustrial residues for high poly(γ -glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NX-2 via solid-state fermentation. *Bioresour Technol*, 2015: 351-4.
32. Kazeem MO, Md Shah UK, Baharuddin AS, AbdulRahman NA. Prospecting agro-waste cocktail: supplementation for cellulase production by a newly isolated thermophilic *B. licheniformis* 2D55. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017; 182 (4): 1318-40.
33. Laba W, Rodziewicz A. Biodegradation of hard keratins by two *Bacillus* strains. *Jundishapur J Microbiol*, 2014; 7 (2): e8896
34. Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Sci Technol*, 2010, 31: 825-834.
35. Madigan MT, Brock T.D. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. London: Pearson, 2012.