T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROBİYOTİK BAKTERİ İÇEREN SERT YÜZEY TEMİZLEYİCİ FORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Meyrem VEHAPİ

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Temmuz, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROBİYOTİK BAKTERİ İÇEREN SERT YÜZEY TEMİZLEYİCİ FORMÜLASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Meyrem VEHAPİ tarafından hazırlanan tez çalışması 19.06.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Didem Özçimen
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

,
İstanbul Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Üye. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ,
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Üye. Melek Mümine EROL TAYGUN,
İstanbul Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üye. Benan İNAN,
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Probiyotik Bakteri İçeren Sert Yüzey Temizleyici Formülasyonunun Geliştirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Meyrem VEHAPİ

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün 118C075 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Aileme, Oğluma ve

Biricik eşime…

TEŞEKKÜR

Tüm lisans, yüksek lisans ve doktora eğitim hayatım boyunca bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren, karşılaştığım her türlü sorunu ilgi ve sabırla dinleyip çözümlerini esirgemeyen, güleryüzünü eksik etmeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim ve saygı duyduğum tez danışmanım Prof. Dr. Didem ÖZÇIMEN'e;

Doktora tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın sağlıklı bir şekilde ilerlemesinde katkıda bulunan tez izleme komitesindeki hocalarım Prof. Dr. Melek Mümine EROL TAYGUN'a ve Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ'a;

Tez çalışmam boyunca her türlü maddi ve manevi destekten dolayı Dr. Öğr. Üyesi Benan İNAN, Dr. Anıl Tefik KOÇER ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma;

Bana kendi laboratuvarında çalışma imkanı sunarak bu tezin ortaya çıkmasında katkıları olan, tez çalışmamda bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren, kendilerinden çok şey öğrendiğim Hayat Holding A.Ş. AR-GE Deterjan bölümü çalışanlarına;

Doktora tez sürecimde sağlamış oldukları maddi destekten dolayı Tubitak 2244-Sanayi Doktora Burs Programı'na ve Bilim İnsanları Destekleme Daire Başkanlığı'na;

Hayatım boyunca aldığım kararlarda her zaman yanımda olan ve tüm eğitimim boyunca maddi, manevi desteklerini esirgemeyen babam Daut VEHAPİ, sevgili annem Arife VEHAPİ ve kardeşim Ferhad VEHAPİ'ye, her daim yanımda olan kıymetli eşim Mücahit ERTÜRK'e ve bu süreçte hayatıma doğan bebeğim Ali Uras ERTÜRK'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Meyrem VEHAPİ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ iix
ŞEKİL LİSTESİ x
TABLO LİSTESİ xii
ÖZET xiii
ABSTRACT xv
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 13
1.3 Hipotez 13
2 YÜZEY TEMİZLEYİCİLER 14
2.1 Deterjanlar Hakkında Genel Bilgiler 14
2.2 Yüzey Aktif Maddeler 14
2.3 Yüzey Aktif Maddelerin Antimikrobiyal Etkisi 18
3 PROBİYOTİK YÜZEY TEMİZLEYİCİLER 22
3.1 Probiyotik Yüzey Temizleyiciler 22
4 MATERYAL-METOT 28
4.1 Kullanılan Mikroorganizmalar ve Besiyerleri 28
4.2 Topraktan *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması 29
4.3 *Bacillus* İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi 32
4.4 Probiyotik Bakterilerin Büyük Ölçekte Üretilmesi 35
4.5 Probiyotik İçerikli Sert Yüzey Temizleyicinin Hazırlanması 38
4.6 Probiyotik İçerikli Sert Temizleyicinin Antagonistik Etkisi 41
4.7 Probiyotik İçerikli Yüzey Temizleyicinin Performans Testleri 42
4.8 Merkezi kompozit tasarımı 42
4.9 Istatistiksel Analiz 43
5 DENEYSEL BULGULAR VE SONUÇLAR 44
5.1 Bakterilerin Topraktan İzolasyonu ve Morfolojik İdentiifikasyonu 44
5.2 Gram pozitif Basillerin Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi 48
5.3 Merkezi Kompozit Tasarım Sonuçları 60
5.4 Probiyotik Bakterilerin Büyük Ölçekte Üretilmesi 64
5.5 Probiyotik İçerikli Sert Yüzey Temizleyicinin Hazırlanması 69

6 SONUÇLAR **88**
KAYNAKÇA **90**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **102**

SİMGE LİSTESİ

C	Celcius
cm^{-1}	Dalga sayısı
g	Gram
td	İkilenme süresi
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
pH	Potansiyel Hidrojen
cm	Santimetre
µ	Spesifik büyüme hızı

KISALTMA LİSTESİ

ABS	Alkil Benzen Sülfonat
AMP	Adenozin Monofosfat
AML	Amoxicillin
ANOVA	Varyans Analizi
ASTM	Amerikan Test ve Malzeme Kurumu
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Bovin Serum Albumin
CMC	Kritik Misel Konsantrasyonu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spekrometresi
GRAS	Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilen
KA	Kanlı Agar
KOB	Koloni Oluşturan Birim
LAB	Lineer Alkil Benzen
LAS	Lineer Alkil Sülfonat
LB	Luria Bertani
MIC	Minimum Inhibisuon Konsantrasyon
OD	Optik Yoğunluk
PDI	Polidispersite İndeksi
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asidi
SLES	Sodyum Lauril Eter Sülfat
TSB	Tryptic Soy Broth
TSA	Tryptic Soy Agar
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 *Bacillus* genusunun TSA besiyerinde koloni morfolojisi.....3
Şekil 1.2 *Bacillus* genusunun endospor oluşumu 5
Şekil 1.3 Gram boyama metoduna göre *Bacillus* türlerinin yapı özellikleri 5
Şekil 1.4 ATCC 6633 (a) ve topraktan izole edilen (b) *Bacillus subtilis* 6
Şekil 2.1 Sabunlaşma reaksiyonu 15
Şekil 2.2 Yüzey aktif maddelerin sınıflandırılması 15
Şekil 3.1 Iturin, surfactin ve fengycin'in karakteristik yapıları 24
Şekil 3.2 Probiyotik temizlik ürününün evdeki zemin temizliğinde uzun vadeli etkisi 25
Şekil 4.1 Spread plate yönteminin şematik gösterimi 30
Şekil 4.2 Minifors 2 Biyoreaktör sistemi ve üretim koşulları 36
Şekil 4.3 Mikroorganizma büyüme eğrisinin şematik gösterimi.....37
Şekil 4.4 Bakteriyostatik ajanın etkisinin şematik gösterimi 39
Şekil 4.5 Probiyotik içerikli sert yüzey temizleyicinin hazırlanması 40
Şekil 5.1 *Bacillus* suş-izolatlarının agardaki koloni görüntüsü 45
Şekil 5.2 Schaeffer-Fulton spor boyama yöntemi ve sonuçların gözlenmesi.....46
Şekil 5.3 *Bacillus* izolatlarının 30 ºC ve 35 ºC'de büyüme eğrileri 48
Şekil 5.4 TSB ve LB besin ortamlarında farklı sıcaklıklarda *B. subtilis*'in büyüme eğrisi.....49
Şekil 5.5 Farklı pH ve sıcaklıklarda inkübe edilen *B. subtilis*'in büyüme eğrisi50
Şekil 5.6 Her bir besiyerinde farklı sıcaklıklarda pH 3.0 - 8.0 aralığındaki spesifik hücre büyüme hızları (μ).....51
Şekil 5.7 *B. subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis, B. pumilus* ve *B. safensis* türlerinin antibiyotik direnci 54
Şekil 5.8 *B. subtilis, B. safensis* ve *B. pumilus* izolatlarının ve *B. subtilis* ATCC 6633 türlerinin bakteriyosin aktivitesi 55
Şekil 5.9 *Bacillus* izolatlarının *B. cinerea* ve *C. gloeosporioides* antifungal aktivitesini gösteren "İkili Kültür yöntemi" in vitro inhibisyon testi .57
Şekil 5.10 30 ve 37 °C LB besin ortamında inkübe edilen *B. pumilus, B. safensis* ve *B.subtilis'in* otomatik toplanma yetenekleri (%) (n=3).....59
Şekil 5.11 *B. subtilis* büyümesi için sıcaklık ve pH değerinin etkilerini gösteren üç boyutlu tepki yüzey grafikleri 63
Şekil 5.12 Biyoreaktör sisteminde *B. subtilis*'in 1 ve 12 saateki görüntüsü 64

Şekil 5.13 a) Biyoreaktörde 12 saatlik inkübasyondan sonra biyokütle miktarı olarak sunulan hücre büyüme eğrileri b) substrat konsantrasyonuna göre büyüme hızı c) zamana göre çözünmüş oksijendeki değişim 66

Şekil 5.14 *B. subtilis* suşunun erlen ve biyoreaktörde inkübasyonda hücre büyüme eğrisi 67

Şekil 5.15 12 saatlik biyoreaktör ve 30 saatlik erlen inkübasyon sonucunda *B. subtilis*'in spor sayısı 68

Şekil 5.16 Yüzey aktif maddelerin *B.subtilis, E.coli* ve *S.areus* türlerine karşı antimikrobiyal etkisi 70

Şekil 5.17 *B. subtilis*'in farklı konsantrasyonlarda Sodyum Lauril Sülfat (SLS), Lineer alkilbenzen sülfonat (LAS) ve sitrik asit içeren sıvı ortamdaki büyüme eğrileri 73

Şekil 5.18 % 0.09 biyosit içeren ve içermeyen probiyotik bazlı temizleyicide *Bacillus* spp. sporlarının üretimden (A) 4 ay ve (B) 10 ay sonra canlılığı 75

Şekil 5.19 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *A. niger*'e karşı antifungal aktivitesi 77

Şekil 5.20 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *A. brasiliensis*'e karşı antifungal aktivitesi 78

Şekil 5.21 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *C. gloeosporioides*'e karşı antifungal aktivitesi 79

Şekil 5.22 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *Fusarium oxysporum*'a karşı antifungal aktivitesini gösteren ikili kültür yöntemi 80

Şekil 5.23 Uygulama sonrası Macconkey (MAC) agarda kalan *E. coli* bakteri sayısı 82

Şekil 5.24 Probiyotik bazlı temizleyicideki *Bacillus* sporların 2. ve 48. saat ve 8. günden sonra yüzeylerde çimlenmesi 84

Şekil 5.25 CFT Metodu ile probiyotik sporlarının ve probiyotik spor içerikli temizleyici ile kirlerin giderilmesi. C: ticati, E: ticari, B: üretilen *Bacillus*, P: PBS, K: kontrol temizleyici 85

Şekil 5.26 CFT Metodu ile probiyotik sporlarının ve probiyotik spor içerikli temizleyici ile kirlerin giderilmesi. C: ticari, E: ticari, B: üretilen *Bacillus*, P: PBS, K: kontrol temizleyici 86

Şekil 5.27 DM76 mısır nişastası, DM 77 karışık (mısır/pirinç) nişasta, ve DM 78 pirinç nişastası gibi melamin karo üzerindeki probiyotik bakterilerin canlılığının 20 gün sonra tespiti 87

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Bazı yüzey aktif maddeler için yapı fonksiyon ilişkileri 21

Tablo 5.1 Tanımlanan Gram-pozitif basillerin morfolojik özellikleri 44

Tablo 5.2 *B. subtilis*'in LB ve TSB ortamında farklı pH ve sıcaklık değerlerinde spesifik hücre büyüme hızları μ (h-1) ve iki katına çıkma süresi t1/2 (h) 52

Tablo 5.3 *B. subtilis* ATCC 6633, *Bacillus* izolatlarının antibiyotiklerine karşı inhibisyon zonu 53

Tablo 5.4 *Bacillus* türlerinin farklı bakteri suşlarına karşı inhibisyon bölgesinin boyutu (mm) 55

Tablo 5.5 *Bacillus isolatların'in* antifungal aktivitesini *B. cinerea* (B) ve *C. gloeosporioides* (C) in vitro misel engelleme oranları (%) 58

Tablo 5.6 Deneysel tasarım ve merkezi kompozit tasarım sonuçları 60

Tablo 5.7 *B. subtilis* üretimini modellemek için kullanılan parametrelerin aralığı ve her parametre için belirtilen kodlar 61

Tablo 5.8 Uyum İstatistikleri 61

Tablo 5.9 İkinci dereceden model için ANOVA değerleri 61

Tablo 5.10 Kodlanmış Faktörel Katsayılar 63

Tablo 5.11 Biyoreaktör sisteminde çözünmüş oksijen, hücre ve glükoz konsantrasyonları 65

Tablo 5.12 Erlen ve biyoreaktörde optimum koşullarda üretilen *B. subtilis*'in spor sayısı 68

Tablo 5.13 Çeşitli yüzey aktif maddelerin farklı bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi ve inhibisyon zonları (mm) 69

Tablo 5.14 Çeşitli yüzey aktif maddelerin *Bacillus* türlerine karşı antimikrobiyal etkisi ve inhibisyon zonları (mm) 71

Tablo 5.15 Temizleyici içeriğindeki *Bacillus* türlerinin farklı günlerde hücre sayısının KOB/mL şeklinde gösterimi 74

Tablo 5.16 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *Aspergillus niger'*e karşı antifungal aktivitesini gösteren ikili kültür yöntemi 77

Tablo 5.17 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *Aspergillus brasiliensis'*e karşı antifungal aktivitesini gösteren ikili kültür yöntemi 78

Tablo 5.18 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *Colletotrichum gloeosporioides'e* karşı antifungal aktivitesini gösteren ikili kültür yöntemi 79

Tablo 5.19 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *Fusarium oxysporum*'a karşı antifungal aktivitesini gösteren ikili kültür yöntemi 80

Tablo 5.20 Probiyotik bazlı temizleyici tarafından üretilen canlı sayımdaki ortalama Log azalma ve yüzde engelleme oranları 82

ÖZET

Probiyotik Bakteri İçeren Sert Yüzey Temizleyici Formülasyonunun Geliştirilmesi

Meyrem VEHAPİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Bugüne kadar, çevre yüzeylerdeki biyolojik yükü azaltmak için ağır metaller ve klor içeren temizlik ve dezenfeksiyon yöntemleri önerilmiş ve incelenmiştir. Önerilen tekniklerin çoğu kimyasal bileşiklerin kullanımına dayanmaktadır. Günümüzde, doğal ve yeşil ürünlere olan talebin artması, mikrobiyal bazlı kültürler içeren temizlik ürünlerinin tanınmasına yol açmıştır. Aktif madde olarak canlı mikroorganizmalar içeren temizlik ürünleri evlerde ve endüstriyel temizlik uygulamalarında giderek yaygınlaşmaktadır. Bu ürünlere "probiyotik veya mikrobiyal" temizleyiciler denir. Birçok formülasyonda spor oluşturan canlı bakteriler "*Bacillus*" içeren probiyotik temizlik ürünleri giderek yaygınlaşmaktadır. Çalışmada *Bacillus* sp. pH 3 gibi asidik pH değerlerinde ölüm fazına geçerken, nötr pH değerinde daha yüksek büyüme ve canlılık göstermiştir. *Bacillus* sp. yüksek antibiyotik direnci ve otoagregasyon yeteneği sergilediği gözlemlenmiştir. Bakteri üremesi için en iyi sonuçları elde etmek için merkezi kompozit tasarımı yardımıyla farklı kültür koşulları değerlendirilerek ortamın büyüme koşulları optimize edilmiştir ve *B. subtilis*'in üç boyutlu yanıt yüzey grafiği incelemesi (OD600=1,1) sonucunda sıcaklık 29.5 °C ve pH 7.5'e ayarlandığında büyümenin arttığı

gözlenmiştir. *Bacillus* türleri büyük ölçekte biyoreaktör sisteminde üretildikten sonra temizleyici formülasyonuna eklenmiştir. Biyoreaktörde 12 saat süreyle üretilen *B. subtilis*'in spor sayıları 1.18×10^{10} KOB / mL olarak elde edilmiştir. Yüzey aktif maddelerin *Bacillus* türlerine karşı antimikrobiyal etkisi incelendiğinde iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin daha az engelleme oranı gösterdiği gözlenmiştir. Temizleyici formulasyonunda kullanılan katkı maddeleri; viskozite değiştiricilerdir; köpürtücü maddeler; su yumuşatıcı maddeler; koruyucular; stabilize edici ajanlar *Bacillus* türlerinin gelişimini engellemediği gözlenmiştir. LABSA ve SLES, *Bacillus* hücreleri üzerinde bakteriyostatik etki gösterip ve hücre ölümüne neden olmamıştır. Hazırlanan probiyotik bazlı çözelti %1 iyonik olmayan ve %1 amfoterik yüzey aktif madde ve %1 *Bacillus* spp. (6×10^{7} KOB / mL) spor içermektedir. Probiyotik deterjan formülasyonundaki *Bacillus* sp. sporlarının temizleyici içeriğinde stabil kaldığı ve yüzeye uygulandığında yüzeyde vejetatif hale geçerek çimlendiği gözlenmiştir. Hazırlanan probiyotik içerikli sert yüzey temizleyicinin bakteri ve mantar patojenlerine karşı antimikrobiyal etkili olduğu gözlenmiştir. Temizleme performansı için kullanılan melanın karolardan gözlendiği gibi *Bacillus* sporlarının yüzeydeki kirleri enzimatik olarak parçalayarak yüzeyden daha kolay uzaklaştırılmalarını sağladığı ayrıca yüzeyde canlı ve aktif kaldığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* spp., probiyotikler, mikrobiyal bazlı temizlik, probiyotik temizleme sistemi, sürfaktanlar

ABSTRACT

Development of a Hard Surface Cleaner Formulation Containing Probiotic Bacteria

Meyrem VEHAPİ

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Until today, cleaning and disinfection methods containing heavy metals and chlorine have been proposed and studied to reduce the biological load on the surrounding surfaces. Most of the proposed techniques are based on the use of chemical compounds. Today, the increasing demand for natural and green products has led to the recognition of cleaning products containing microbial-based cultures. Cleaning products containing live microorganisms as active ingredients are becoming increasingly common in households and industrial cleaning applications. These products are called "probiotic or microbial" cleansers. Probiotic cleaning products containing live spore-forming bacteria "*Bacillus*" in many formulations are becoming increasingly common. *Bacillus* sp. entered the death phase at acidic pH values such as pH 3, showed higher growth and viability at neutral pH values. It was observed that *Bacillus* sp. exhibited high antibiotic resistance and auto-aggregation ability. In order to obtain the best results for bacterial growth, the growth conditions of the medium were optimized by evaluating different culture conditions with the help of the central composite design, and when the temperature was adjusted to 29.5 °C and pH 7.5 as a result of the three-dimensional response surface graph examination of *B.subtilis* (OD600=1.1) increased growth. *Bacillus* species were added to the cleaner formulation after being grown in a large scale

bioreactor system. Spore numbers of *B.subtilis* produced in the bioreactor for 12 hours were obtained as 1.18×10^{10} CFU / mL. When the antimicrobial effect of surfactants against *Bacillus* species was examined, it was observed that non-ionic surfactants showed less inhibition rate. Additives used in cleaner formulation; they are viscosity modifiers; foaming agents; water softening agents; preservatives; stabilizing agents have not been observed to inhibit the growth of *Bacillus* species. LABSA and SLES showed bacteriostatic effect on *Bacillus* cells and did not cause cell death. The prepared probiotic-based solution contains 1% nonionic and 1% amphoteric surfactant and 1% *Bacillus* spp. (6×10^{7} CFU / mL) spores. It was observed that the spores of *Bacillus* sp. in the probiotic detergent formulation remained stable in the cleaner content and when applied to the surface, they became vegetative and germinated on the surface. It has been observed that the prepared probiotic-containing hard surface cleaner has an antimicrobial effect against bacterial and fungal pathogens. It has been observed that the melanin used for cleaning performance, as observed from the tiles, allows the *Bacillus* spores to be removed from the surface more easily by enzymatically breaking down the dirt on the surface, and also remains alive and active on the surface.

Keywords: *Bacillus* spp., probiotics, microbial based cleaning, probiotic cleaning system, anionic surfactants

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

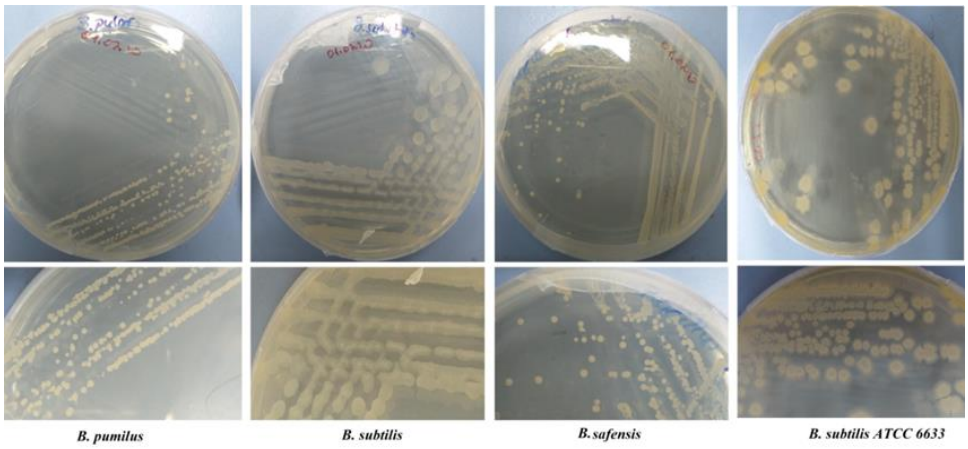
Doğal ve yeşil ürünlere olan talebin artması, mikrobiyal bazlı türleri içeren bakım ve temizlik ürünlerinin tanınmasına neden olmuştur. 1980'li yılların başından itibaren, drenaj sektöründe, drenajın bakımı, yağ tutucuların bakımı ve çöp yönetiminden kaynaklanan hoş olmayan kokuların kontrolü için mikroorganizmaların kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır [1]. 2000'li yılların başlarına doğru yavaş yavaş temizlik yüzeyleri için yeni nesil mikroorganizma bazlı temizlik ürünleri ortaya çıkmaya başlamıştır [1, 2]. Aktif maddeler olarak canlı mikroorganizmalar içeren temizlik ürünleri, evsel ve endüstriyel temizlik uygulamalarında giderek yaygınlaşmaya başlamıştır [2]. Mikroorganizmalar, besin artıklarını ve kirleri, enzimatik ve metabolik etkilerle bozabilmekte ve patojenik mikroorganizmalarla rekabet edebilmektedir [2, 3]. Bazı mikroorganizmalar, proteazlar, selülazlar, amilazlar ve üreazlar da dahil olmak üzere hücre dışı enzimler üretmektedirler. Enzimlere sahip klasik temizleyicilerin aksine, mikrobiyal temizlik ürünlerindeki mikroorganizmalar bu bozunma ürünlerini metabolize edebilmektedirler [2].

Günümüzde aktif mikroorganizmalar veya aktif bileşenler olarak sporlar içeren yeni nesil temizlik ürünleri, profesyonel kullanıcıların ve tüketici organizasyonların dikkatini çekmektedir. Bu ürünler "biyolojik" temizleyiciler, "probiyotik" temizleyiciler veya "mikrobiyal" temizleyiciler olarak da adlandırılmaktadır [2]. Yapılan çalışmalarla, bu tür temizlik yöntemlerin, çeşitli patojenlerle yüzey kirlenmesini önlemede etkili olduğu kanıtlanmış ve geleneksel temizleyici / dezenfektanlarla muamele edilmiş yüzeylerde tespit edilen mikrobiyal yüke kıyasla patojenlerin mevcudiyetini % 80-90 oranında azalttığı görülmüştür [4–7]. Bu temizleme sistemlerinin amacı, sert yüzeylerde herhangi bir tür mikroorganizma varlığını en aza indiren genel bir dezenfeksiyonla değil, insanlara zarar vermeyen mikroorganizmaların varlığını tolere ederek, patojenik türlerin gelişimini engellemektir [4, 6]. Buna göre, temizleme prosedürleri yoluyla bu tür biyo-

stabilizasyon, mikroorganizmaların çevreden genel olarak uzaklaştırılması yerine kontrollü ve daha az zararlı bir mikrobiyota kurulmasını hedefleyen yeni bir temizleme sistemleri anlayışı getirebilir [6]. Bu yaklaşım, tüm patojenleri ortadan kaldırmak yerine patojenleri faydalı mikroplarla değiştirmenin enfeksiyonları azaltmada daha etkili olabileceğini varsaymaktadır [7]. Aslında yararlı mikropların sağlığımız için önemli olduğu ve kullanımlarının bulaşıcı hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde etkili olabileceği genel olarak kabul edilmektedir. Bu amaca yönelik potansiyel olarak faydalı olan mikroorganizmalar arasında "probiyotikler" sağlık için yararlı mikroorganizmalar olarak tanımlandıkları için özellikle tercih edilmektedirler [7, 8].

1.1.1 Probiyotik Bakteriler

Probiyotik terimi, "yaşam için" anlamına gelmekte ve özellikle son yıllarda sağlığa yararlı etkiler sağlayan mikroorganizmalar için kullanılmaktadır [9]. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ya göre, probiyotikler, yeterli miktarlarda alındığında, konakçı sağlığına fayda sağlayan yararlı mikroorganizmalardır. Probiyotiklerin hayvanlar ve insanlar üzerindeki tedavi edici özelliğinden dolayı uzun yıllardan bu yana gıda maddesi olarak kullanılmaktadırlar [10]. Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak değerlendirilebilmesi için kolonize olması, dayanıklı olması, asitli ortamlarda canlı kalması, stres koşullarında canlılığını ve metabolik aktivitesini devam ettirmesi, patojenik ve toksik olmaması, insan ve hayvanlara yararlı etkiler sağlaması gerekmektedir [9]. Ancak diğer mikroorganizmalar, insanlar, hayvanlar veya bitkiler için patojenik ve / veya toksiktir. Bazı mikroorganizmalarda, aynı türün belirli suşları patojenik iken diğerleri değildir [2]. Bunun bilinen bir örneği *Bacillus* genusuna ait iki türü *B. antracis* ve *B. cereus* insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan *Basiller*'dir [11]. Buna ek olarak, *Escherichia coli* - O157:H7 suşu, gıda kaynaklı hastalıkların bilinen bir nedenidir, oysa ki K12 suşu hiç patojenik değildir ve bu nedenle laboratuvar araştırmalarında ve teknik amaçlarla sıklıkla kullanılmaktadır [2]. Probiyotiklerin ürünlerde en az 10^6 -10^7 KOB/mL düzeyinde bulunması gerektiği, ayrıca bazı türlerin 10^7 -10^8 KOB/mL düzeyinde etkili, bazı türlerin ise 10^6 KOB/mL miktarlarda aktif olabildiği bildirilmiştir [9].



Şekil 1.1 *Bacillus* izolatlarının TSA besiyerinde koloni morfolojisi

1.1.1.1 *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

"*Bacillaceae*" ailesi içerisinde yer alan *Bacillus* cinsi doğada yaygın olarak bulunan Gram pozitif, çomak/çubuk şekilli, sıcağa dayanıklı endosporlara sahip, aerobik ve fakültatif anaerob şartlarda üreyebilen mikroorganizmalardır [12]. *Bacillus* türleri genelde toprak kökenlidirler, ayrıca hayvan dışkılarında ve bitkisel ürünlerde yaygın olarak bulunmaktadırlar [13]. Buna ek olarak, doğada süt ve süt ürünleri, hava, su ve gıda gibi birçok ortamdan büyük ölçüde elde edilebilirler. Kutup bölgeleri, sıcak su kaynakları, kaplıcalar, tatlı ve tuzlu sular, çöl toprakları bu cinsin yaşayabildiği alanlardır [14]. *Bacillus* cinsi bakteriler 0.3- 2.2 µm çapında ve 1.2-7.0 µm uzunluğundadır. *Bacillus*'lar tek hücreli ve ikiye bölünerek çoğalan bakterilerdir. *Bacillus*'larda vejetatif hücre duvar yapısı peptidoglikan tabakadan oluşmaktadır [9].

Bacillus genusunun koloni morfolojisi genellikle çevresel koşullara bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. *Bacillus* kolonileri genellikle şeffaf ya da parlak genellikle beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir [14]. Koloni özellikleri çevresel faktörlere bağlıdır; inkübasyon süresi, sıcaklığı ve kültürün ürediği besiyeri bileşimi koloni morfolojisini değiştirebilir [14]. Çevresel şartların değişmesi ile kültürün kendisinde de bazı farklılaşmalar meydana gelmektedir [37]. Katı ortam üzerinde genellikle daha büyük boyutlu koloniler oluşturmaları ön tanımlama için büyük avantaj sağlamaktadır (Şekil 1.1) [15, 16].

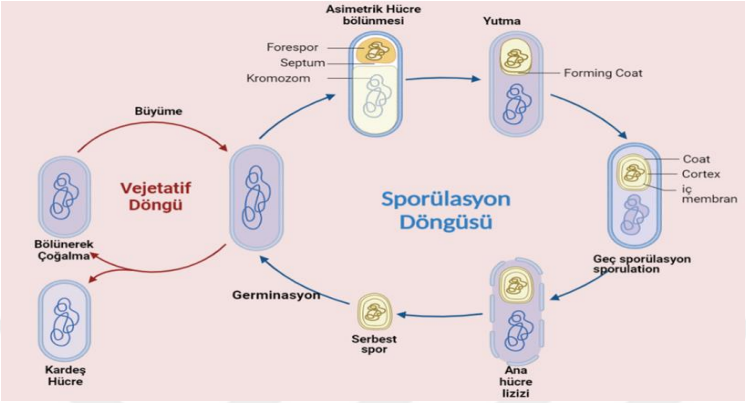
Bacillus cinsi bakteriler sitoplazmalarında spor bulundurma potansiyeline sahiptirler. *Bacillus*'lar ekstrem şartlarda vejetatif hücreden spor formuna geçerek uzun yıllar boyunca canlı kalabilirler [17]. Sporlar yüksek ve düşük sıcaklık ve pH,

kuraklık, osmoz, ve radyasyon gibi etkilere karşı vejetatif hücrelerden daha dayanıklı yapılardır [18]. *Bacillus* cinsinin probiyotik olarak değerlendirilmesi ürettikleri metabolitleri (enzim ve antimikrobiyal madde) ve oluşturdukları sporlardan kaynaklanmaktadır [9]. Sporların ısıya dayanıklı olması, *Lactobacillus* spp. gibi diğer spor oluşturamayan probiyotiklere göre bir takım avantajlara sahiptir. Spor oluşturabilen türler, canlılıkları üzerinde herhangi bir zararlı etki olmaksızın oda sıcaklığında kurutulmuş şekilde saklanabilir. İkinci bir avantaj, sporun, tüm *Lactobacillus* türleri için geçerli olmayan gastrik bariyerin düşük pH'ında hayatta kalabilmesidir [19]. Spor oluşturabilen probiyotikleriyle ilgili bir diğer avantaj, gıdaları sterilize etmek için kullanılan hafif ısıl işlemlerden sağ çıkabilmeleridir [17].

Spor oluşumunu tetikleyen en önemli etken besin yetersizliğidir [9]. Besin ortamda karbon, azot veya fosfor kaynağı yetersiz olduğu zaman *Bacillus* hücreleri sporlar oluşturmaktadır. Buna ek olarak, aşırı yüksek ya da düşük sıcaklıklar ile mineral madde, tuz ve şeker gibi besinlerin yetersiz olduğu ortam koşullarında da spor oluşumu gerçekleşebilmektedir. Sporlu yapılar ısı, radyasyon, kurutma ve toksik kimyasallara karşı yüksek dayanıklılık göstermektedir [9, 20]. Peptidoglikan açısından zengin korteks ve spore coat olarak adlandırılan bir veya daha fazla proteinli katman dahil olmak üzere ek katmanlar sporu çevrelemektedir [21]. Bunlar birlikte sporu UV radyasyonundan, aşırı ısıdan (çoğu türde tipik olarak 80-85 °C'ye kadar), çözücülere, hidrojen peroksite ve lizozim gibi enzimlere maruz kalmaktan korur [22]. Ortamda besin maddelerinin bulunması, çimlenmeyi tetikleyen birincil faktördür [9]. Sporun kendisi susuzdur ve uygun besinlere maruz kalırsa vejetatif hale geçer, sadece birkaç dakika süren, suyun spora girmesine, spor katmanlarının kırılmasına ve vejetatif hücre büyümesine izin veren bir süreçtir (Şekil 1.2) [17].

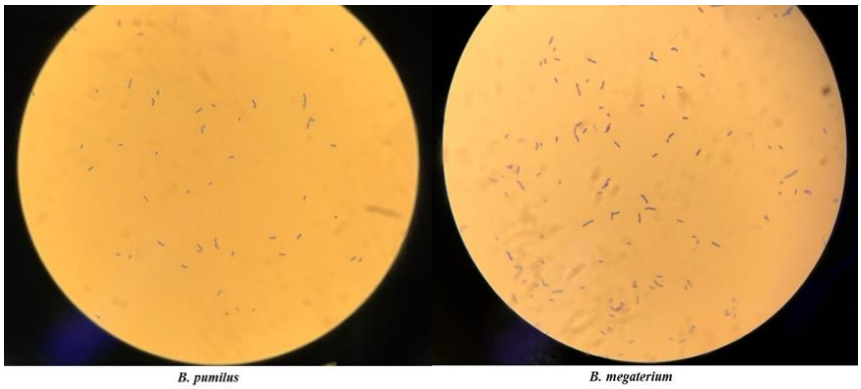
Sporlu bakterilerin olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıklı olmalarını sağlayan spor oluşturma yetenekleri izolasyonlarını kolaylaştırır [20]. Ayrıca sporlanma yetenekleri ve metabolik aktivitelerinin çeşitliliği, geniş bir çevreye dağılmalarında önemli avantajlar sunmaktadır [13, 20]. *Bacillus* genusunun oluşturduğu endosporlar; silindirik, oval ve yuvarlak şekilde olabilir. Ortam koşullarının uygun olmadığı durumlarda bu tür bakteriler zararlı dış etkenlerden korunmak için sporlar oluştururlar [23]. Vejetatif hücrelere göre sporlar, yüksek ve

düşük sıcaklık, kimyasallar ve radyasyon gibi olumsuz çevre koşullarına karşı daha dirençlidir ve metabolik aktivite göstermedikleri için besin maddelerine ihtiyaç duymadan canlılıklarını uzun süre koruyabilirler [24]. Ayrıca *Bacillus* cinsi bakterilerin termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri de bulunmaktadır. Bunlar çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalabilmektedirler [25].



Şekil 1.2 *Bacillus* genusunun endospor oluşumu

Bakterilerin şekilleri ve yapısal özellikleri çeşitli boyama yöntemleri kullanılarak incelenebilir. En önemli boyama yöntemi, 1884 yılında GRAM tarafından keşfedilen Gram boyamadır [26]. Bu yönteme göre bakteriler Gram pozitif ve Gram negatif olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Gram pozitif türler şeffaf arka planla kontrast oluşturmak için mor veya mavi bir renk alırken, gram negatif türler kırmızı bir renk alır. Gram boyama yöntemine göre *Bacillus* türleri Gram pozitiftir [27].



Şekil 1.3 Gram boyama metoduna göre *Bacillus* türlerinin yapı özellikleri

Üzerinde en çok çalışılan *Bacillus* türleri; *B. pumilus, B. subtilis, B. megaterium, B. clausii, B. cereus, B. coagulans, B. licheniformis* ve *B. laterosporus*'tur [9]. *Bacillus* cinsi bakteriler, toksik olmayan hücre duvarlarına ve hücreden ürettikleri proteinleri (enzimleri) aktarmak için uygun mekanizmalara sahip olan genellikle güvenli

mikroorganizmalardır [28]. Bu cinsin iki türü, insanlarda ve hayvanlarda hastalığa neden olan Basillerdir. Bunlar *B. antracis* ve *B. cereus* suşlarıdır [29]. *B. cereus* enterotoksin üreten bir *Bacillus* türüdür [9].

Üst alem : Bacteria

Alem : Eubacteria

ġube : Firmicutes

Sınıf : Bacili

Takım : Bacillales

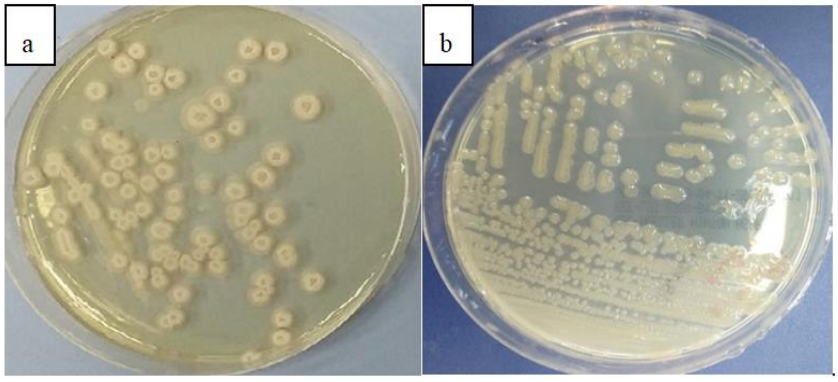
Familya : Bacillaceae

Cins : *Bacillus*

Tür : *B. subtilis, B. pumilus, B. safensis*

1.1.1.2 *Bacillus subtilis* 'in Genel Özellikleri

Bacillus subtilis toz, toprak, gübre, süt ve suda bulunan bir bakteridir. Sütlü içecekler, ekmek, sebze ve meyvelerin bozulmasında etkendir. *B. subtilis*'in kültür filtratlarından elde edilen subtilin patojenik bakterilere karşı engelleyici etkisi olduğu bildirilmiştir [30]. *B. subtilis*, yüksek üretim ve salgılama kapasitesi, farmasötik ve endüstriyel enzim ve sürfaktan üretimi için yüksek potansiyeli nedeniyle en çok çalışılan bakteridir [31]. *B. subtilis* petri kabında yuvarlak ve belirgin halde üremektedir [32]. Bakteriler, homojen bir bulanıklık oluşturmak için sıvı ortamda büyüyebilir, ayrıca tabanda çöküntü veya yüzeyde zar oluşturabilirler. *B. subtilis*, ticari olarak öneme sahip birçok farklı proteinin, özellikle enzimlerin üretiminde kullanılan önemli bir hücre fabrikasıdır [13, 32].



Şekil 1.4 ATCC 6633 (a) ve topraktan izole edilen (b) *Bacillus subtilis*

1.1.1.3 *Bacillus pumilus*'un Genel Özellikleri

Bacillus pumilus, toprakta yaygın olarak bulunan aerobik, spor oluşturan Gram pozitif bir basildir. *B. pumilus* sporları genellikle UV ışığına, kurutmaya ve hidrojen peroksit (H_2O^2) gibi oksitleyicilere ve diğer çeşitli çevresel stres koşullarına karşı direnç göstermektedir [33]. *B. pumilus*'un hücresel yapısına bakıldığında, *B. pumilus*'da ki peptidoglikan çapraz bağlantılarının dış tabakası, diğer Gram pozitif bakteriler *B. subtilis* ve *B. cereus* gibi *Bacillus* türlerine benzemektedir. *B. pumilus* GB34 suşu, tarımsal mantar ilaçlarında aktif bir bileşen olarak kullanılmaktadır. Bu bakterinin bitki kökleri üzerinde büyümesi *Rhizoctonia* ve *Fusarium* sporlarının çimlenmesini önlemektedir [33, 34].

1.1.1.4 *Bacillus safensis*'in Genel Özellikleri

Bacillus safensis, Gram pozitif, spor oluşturan, çubuk şeklinde aerobik bir basildir. *B. safensis*, tuza ve UV radyasyonuna oldukça dirençli olan bir kemoheterotroftur [35]. *B. safensis*, güçlü bir bitki hormonu üreticisi olduğu için bitki büyümesini etkiler ve aynı zamanda kök kolonizasyonundan sonra bitki büyümesini teşvik eden bir rizobakteri görevi görür [35, 36].

1.1.2. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Üretilmesi

Bacillus cinsi bakteriler yüksek fizyolojik yetenekleri nedeniyle sıcaklık, pH ve tuzluluğa karşı toleranslıdırlar. Gelişebildikleri sıcaklık derecesi 25-75 °C arasındayken, pH değeri ise bazı türler için 8,0'e kadar çıkmaktadır [38]. *Bacillus* türleri genellikle 35-37 ºC da ve pH 7.0 gibi optimum üreme koşullarında üremektedirler [17, 30]. Bakterilerin büyümesi için besinlere ihtiyacı vardır. Besi ortamı, bakterilerin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan besinleri içermektedir. Katı, sıvı ve özel ortam gibi besi ortamı çeşitleri vardır. *Bacillus* türleri Nutrient Agar (NA), Kanlı Agar (KA), Tryptic Soy Agar (TSA) ve Brain Heart Infusion (BHI) gibi besiyerlerinde oldukça iyi üreme gösterirler [13, 30]. *Bacillus* türlerinin bazıları katı ortamda yuvarlak, kuru ve belirgin formlarda gelişebilirken, *B. subtilis* gibi bazı türler dağınık biçimde gelişebilir. *Bacillus* cinsi bakterilerin çoğu faydalıdır ve hızlı büyüme oranı, kısa fermentasyon süresi ve yüksek üretim verimi ile büyük ilgi çekmektedir. Ayrıca suşların kullanım açısından güvenli olması ve hücre içinde sentezledikleri değerli metabolitleri salgılama kapasiteleri gibi pekçok sebepten dolayı umut verici endüstriyel mikroorganizmalardır [14, 37].

Bakterilerin sıvı ortamda üremesi farklı aşamalardan oluşmaktadır. Bakteri sıvı besiyerine girdiğinde ortama uyum sağlamak için kısa bir adaptasyon evresinden (gecikme fazı) sonra ikiye bölünerek çoğalmaya başlar. *Bacillus* türleri yüksek yüzey/hacim oranına sahip olması, hızlı besin transferi ve hızlı proliferasyon sağlamaktadır. *Bacillus* spp. ortama adapte olduktan sonra büyüme hızının arttığı aşama başlar. Bunu, proliferasyonun sabit bir hızla ilerlediği logaritmik (log faz) faz takip etmektedir. Ardından ortamdaki besinler tükenmeye başlayınca bölünme hızının düştüğü aşama başlar. Bu aşamada, bazı bakteri hücreleri ölür ve canlı ve ölü bakteri hücreleri arasında bir denge kurulur ve bu aşamada üreme durmaktadır (durgun faz) [38]. Bu aşamadan sonra ölü bakteri sayısı fazladır ve canlı bakteri sayısı azalmaktadır (ölüm fazı). Bundan sonraki son aşamada bakteri sayıları azalır, ancak bakteri hücrelerinin bir kısmı bakterinin yapısına bağlı olarak uzun süre ölmeden kalmaktadır. Bakterinin bu aşamada hayatta kalması, sporlu veya sporsuz olmasına bağlıdır. Spor oluşturan bakteriler son aşamada ölmemek için sporlar oluştururlar ve sporlanma sırasında ortama çeşitli metabolik ürünler salgılamaktadırlar [38, 39].

1.1.3. Bakterilerin Biyoreaktörde Üretilmesi

Biyoreaktörde hedeflenen hücrelerin üretimi için koşulların geliştirilmesi ve optimize edilmesi gerekmetketir. Bakteriler biyoreaktörde substratları tüketerek, kendilerini çoğaltıp metabolik ürünleri sentezlemektedirler. Hücre kinetiği ve substrat tüketim, hücre-ürün ve yan ürün üretim kinetikleri proseste ulaşılmak istenen matematiksel modellerle tanımlanmalıdır. Kesikli biyoreaktörlerde hücre konsantrasyonunun zamanla değişimi büyüme eğrisi; adaptasyon, üstel çoğalma, duraklama ve ölüm fazlarından oluşmaktadır. Hücre üretim hızı, r_x aşağıdaki (denklem 1.1) Monod denklemiyle hücre konsantrasyonu C_x'e bağlanabilir [38]:

$$r_x = \frac{dCx}{dt} = \mu Cx \tag{1.1}$$

Burada μ spesifik büyüme oranıdır. μ değerini substrat konsantrasyonuna bağlayan Monod, substrat, ürün inhibisyonu gibi modeller vardır. Sübstrat tüketim hızı, $-r_s$ ve ürün üretim hızı, r_p:

$$r_p = \frac{dCp}{dt} \tag{1.2}$$

$$-r_s = -\frac{dCs}{dt} \tag{1.3}$$

Tüketilen substrat başına üretilen hücre veya ürün, aşağıdaki verim katsayıları ile tanımlanabilir:

$$Y_{p/s} = \frac{r_p}{-r_s} = \frac{dCp}{-dCs} \tag{1.4}$$

$$Y_{x/s} = \frac{r_x}{-r_s} = \frac{dCx}{-dCs} \tag{1.5}$$

Tüketilen oksijen başına üretilen hücre verimi ise,

$$Y_{x/o} = \frac{r_x}{-r_o} \tag{1.6}$$

Kesikli biyoproseslerde spesifik çoğalma hızı (μ) ve verim katsayıları ($Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$) mikroorganizmanın çoğalma hızı, yaşam fonksiyonlarına ve kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak proses boyunca değişebilirler.

Monod denklemi, üstel (logaritmik) faz sırasında mikroorganizmaların büyümesini ifade etmektedir. Monod denklemi, mikroorganizmaların büyümesi için matematiksel bir modeldir. Sulu bir ortamda mikrobiyal büyüme hızlarını sınırlayıcı bir besin konsantrasyonu ile ilişkilendirmek için bu formun bir denklemini kullanmayı öneren Jacques Monod tarafından adlandırılmıştır [40, 41].

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu X \tag{1.7}$$

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \tag{1.8}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \tag{1.9}$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \tag{1.10}$$

Burada; t = zaman, t zamanında X = KOB / mL, t_0 zamanında X_0 = KOB / mL,

μ = spesifik büyüme hızı sabiti (h^{-1}), μ_{max} = maksimum büyüme hızı (h^{-1}) ve

t_d = iki katına çıkma süresi (h).

1.1.3.1. Biyoreaktör İşletim Parametreleri: Sıcaklık

Biyoproses ortam sıcaklığının büyüme oranını etkilediği bilinmektedir. Sıcaklık, substratların hücre ve ürün oluşum verimliliğini değiştirebilir. Aynı zamanda karbon ve enerji kaynaklarının kullanılmasında da sıcaklık etkilidir. Sıcaklık düşürüldüğünde daha fazla enerji gerektiğinden karbon ve enerji kaynağının verimi

de düşer. Her mikroorganizmanın büyüme ve ürün üretiminin maksimum olduğu bir optimal sıcaklık değeri vardır [39].

1.1.3.2. Hidrojen iyonu derişimi: pH

Mikroorganizmalar ortamdaki hidrojen iyonu konsantrasyonunu sabit tutma yeteneğine sahip olsalar da ortamın pH'ını değiştirmek hücre içi metabolik değişikliklere neden olmaktadır. Endüstriyel ürün üretiminde kullanılan her tür mikroorganizma için optimal pH aralığı vardır. Bu nedenle, biyoproseste uygulanacak pH aralığı mikroorganizmaya ve üretilmek istenen ürüne spesifik olarak belirlenmelidir [38].

1.1.3.3. Oksijen aktarımı

Oksijenli (aerobik) biyoproseslerde mikroorganizmalar solunum, üreme ve ürün sentezi gibi metabolik aktivitelerini sürdürmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle büyüme ve üretim ortamındaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu ve oksijen transfer hızı çok önemlidir. Oksijen transferinin olmaması veya fazla olması ürünün verimini etkilemektedir. Bir biyoprosesteki oksijen talebi ve transferi, mikroorganizma türüne, üretim ortamının özelliklerine, biyoreaktör türüne ve karıştırma yöntemine bağlıdır [39]. Aerobik fermantasyon proseslerinde mikroorganizmanın optimal oksijen ihtiyacının belirlenmesi gerekmektedir. Aerobik biyoproseslerde mikroorganizmalar oksijenin önemli bir kısmını kendi kendini çoğaltmak için kullanırken, aynı zamanda oksijen hayati fonksiyonları yani biyosentez ve ürün oluşumu için de gereklidir. Bu nedenle, mikroorganizmaların büyümesi için oksijen tüketim hızı, substrat tüketim hızı ile doğrudan ilişkili olabilmektedir [38, 39].

1.1.4. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Antimikrobial Özellikleri

Bacillus türlerinin patojenik özelliği olmayan ve genomunun yaklaşık % 4-5'i antibiyotik sentezine ait olan biyokontrol ajanı *B. subtilis*'in antibiyotik üretim potansiyeli üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır [30, 42, 43]. *Bacillus*'un bazı türleri de böcek patojenidir ve böcek oluşumuna karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılabilir. *Bacillus* türü bakterilerin ürettiği çok sayıdaki ikincil metabolitler sayesinde biyokontrolde ana unsurlardan biridir. Bu metabolitler geniş spektrumludur ve aşırı koşullara karşı dirençleri nedeniyle biyokontrol çalışmalarında oldukça önemlidir. Ayrıca bu bakterilerin basit ticari

formülasyonları ve sporlanma özellikleri sayesinde olumsuz koşullara karşı dirençleri nedeniyle diğer türlere göre avantajlıdırlar [17, 44]. Endüstriyel ürün üretiminde *B. subtilis* (proteaz, α-amilaz, hidroksilaz, vb), *B. megaterium* (keratinaz ve kazeinaz) ve *B. pumilus* (lipaz) türleri yaygın olarak kullanılan türler arasında yer almaktadır. *Bacillus* türlerinden elde edilen biyosürfektanlar; glikolipidler, lipopeptidler, fosfolipitler, yağ asitleri ve lipitlerdir. Lipopeptidler, yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olan biyosürfektan maddedir [16].

Yapılan çalışmalarda biyosürfektanların amfifilik yapılarına bağlı olarak yüzey gerilimini azalttığı ve dolayısıyla bakteriyel tutunmayı etkilediği bildirilmiştir [36]. *B. subtilis* tarafından üretilen surfaktin, yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olan lipopeptittir [16, 45]. *Bacillus* suşları da dahil olmak üzere birçok yararlı bakteri, mantar hücre duvarını bozarak zararlı mantarların büyümesini kontrol edebildikleri için biyokontrol özellikleri açısından araştırılmıştır [46]. *B. subtilis'* in biyokontrol potansiyeli, surfaktin, plipastatin (veya fengisin) ve bakillaen dahil olmak üzere çeşitli ikincil metabolitler üretme kabiliyeti ile belirlenmektedir [32]. *B. subtilis*'in biyo-kontrol kabiliyeti, kitin parçalayıcı enzimleri salgılama kabiliyeti ile ilişkilidir [46, 47].

1.1.4.1. *Bacillus* türlerinin ürettiği antibiyotikler

Probiyotik bakterilerin patojen mikroorganizmaları engelleme mekanizmasının antimikrobiyal madde üretimi olduğu düşünülmektedir. *Bacillus* türlerinin 45'ten fazla antimikrobiyal madde ürettiği bildirilmiştir [9]. *Bacillus* türüne ait peptit antibiyotiklerin ana sınıfı olarak kabul edilen siklik lipopeptidler; iturin, fengisin ve surfaktin aileleridir. Bacillomycin ve mycosubtilin, iturin ailesindeki antibiyotiklerdir [48].

Surfaktin bir biyosürfektandır ve hemolitik, antiviral, antimikoplazmik ve antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte, herhangi bir antifungal etkisi yoktur. Iturin güçlü antifungal özelliklere sahipken, antibakteriyel özellikleri çok sınırlıdır ve antiviral aktivitesi yoktur. Fengisin ise özellikle filamentli mantarlara karşı güçlü antifungal özellikler gösterir. Bakteriyosinler, probiyotikler tarafından üretilen antibakteriyel aktiviteye sahip metabolitlerdir [42, 49]. *Bacillus* tarafından üretilen bakteriyosinler, patojenik bakterilere, maya ve küflere karşı engelleme özelliğine sahiptir [16]. Bakteriyosinler, hücre duvarının çift yönlü geçirgenliğini

artırmaya ve hücrenin sitoplazmik maddelerini hücreden uzaklaştırma esasına dayanmaktadır. *Bacillus* türlerinin ürettiği polipeptit sınıfı antibiyotiklerin kültür sporülasyon aşamasındayken oluştuğu gözlenmiştir. Bakteriyosinler, *Bacillus* türleri tarafından sentezlenen antimikrobiyal etkili peptitlerdir. Bakteriyosinler aynı türün farklı suşlarını öldürebilen veya diğer bakteriler üzerinde inhibitör etkisi olan maddelerdir [42, 50]. Bakteriyosin üretimi bakterilerin üstel üreme evresinden durağan evreye geçişi sırasında gerçekleştiği gözlenmiştir. Nisin üretimi bakterilerin üstel üreme evresinin ortasında başlar ve hücreler durağan evreye geçtiğinde en yüksek değerine ulaşmaktadır. Sporülasyon sırasında ise bakteriyosin üretiminin azaldığı gözlenmiştir [51].

B. licheniformis ve *B. subtilis* suşları tarafından basitrasin antibiyotiği üretilmektedir. Genellikle, mikroorganizmalarda sekonder metabolitlerin üretimi, sporlanmadan önceki üstel üreme evresinin sonunda gerçekleşmektedir. Glikozun karbon kaynağı olarak kullanımı sırasında ve gelişimin sonraki aşamalarında pH'ın azalmasıyla basitrasin üretiminin arttığı gözlendi. Buna ek olarak, basitrasin üretimi pH 8'de artarken, pH 8.4'te azaldığı gözlenmiştir [37]. *B. megaterium* türünün sentezlediği antibiyotik olan megasin, mikroorganizmaları inhibe etmektedir. *B. subtilis*'ten izole edilen botrycidin ve allirin, antifungal etkileri olan antibiyotiklerdir [13, 49]. Perez vd. [52] Gram negatif bakterilere karşı aktif antimikrobiyal özelliklere sahip olan *B. subtilis* MIR 15 suşundan antimikrobiyal ajan üretiminin yetiştirme sıcaklığına göre değiştiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca *B. subtilis* suşunun *E. coli* ve *P. aeruginosa* gibi Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmiştirler.

1.1.4.2. *Bacillus* türlerinin ürettiği enzimler

Bacillus türleri, salgıladıkları vitamin ve enzimler aracılığı ile antimikrobiyal etki göstermektedirler [9]. Bu antimikrobiyal maddeler; ribozomal olarak sentezlenen, protein yapısındaki bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri maddeler ile enzimatik olarak sentezlenen küçük peptidler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır [25]. Kitinaz, kitosanaz, proteaz, glukanaz gibi fungal hücre duvarını bozan enzimler patojenlerin biyokontrolünde kullanılan litik enzimlerdir [16, 46].

1.1.4.3. *Bacillus* türlerinin ürettiği sekonder metabolitler

Antibiyotikler ve enzimler dışında bazı sekonder metabolitlere sahip mikroorganizmaların patojenlere karşı antagonizma gösterdiği bilinmektedir ve bunlara örnek HCN (hidrojen siyanür), amonyaktır [32].

1.1.4.4.İndirek antagonizma

Topraklar ve canlı bitki yüzeyleri, mikroorganizmalar için besin açısından kısıtlı alanlardır, bu nedenle yüzeyi kolonize etmek için diğer patojenik veya patojenik olmayan mikroorganizmalar ve mantarlarla rekabet etmeleri gerekir [53]. Biyokontrol ajanı olarak ticari pazardaki *Bacillus* suşları, hem patojenik türlerle hem de habitattaki diğer türlerle güçlü bir şekilde rekabet edebilmeli, böylece kolonizasyon ve antibiyotik üretimi yoluyla bu işlevi yerine getirebilmelidir [43].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez önerisinin amacı, sert yüzeylerde herhangi bir tür mikroorganizma varlığını en aza indiren genel bir dezenfeksiyonla değil, insanlara zarar vermeyen probiyotik mikroorganizmaların varlığını tolere ederek, patojenik türlerin gelişimini engellemektir. Bu yaklaşımın amacı, tüm patojenleri ortadan kaldırmak yerine, patojenleri faydalı mikroplarla değiştirmektir.

1.3 Hipotez

Hipotez olarak sert yüzey temizleyicinin içeriğine % 1 spor halinde (6×10^7 KOB / mL) probiyotik bakteri (*Bacillus* spp.) eklenmesine dayanmaktadır. Kullanılan probiyotik bazlı çözelti % 2 iyonik olmayan yüzey aktif madde ve ayrıca *Bacillus* türüne karşı herhangi bir zararı olmayan katkı maddelerini içermektedir. Bu katkı maddeleri; parfüm, parfüm çözücü, renk koruyucu ve antimikrobiyal koruyucu içermektedir. Ayrıca koruyucu içeren (mevct), koruyucu içermeyen ve opak ürün olmak üzere çeşitli formülasyonlar hazırlanmıştır.

2
YÜZEY TEMİZLEYİCİLER

2.1 Deterjanlar Hakkında Genel Bilgiler

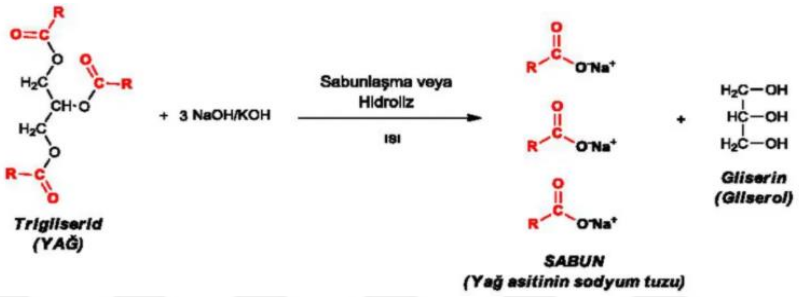
Deterjanlar, içerisinde asıl temizleyici ajan olarak alkil sülfat veya alkil sülfonat anyonik yüzey aktif maddeler ve temizleme işlemine yardımcı diğer katkı maddeleri bulunan ve genel temizlik işlerinde kullanılanılan maddelerdir. Deterjanlar genellikle suyun yüzey gerilimini azaltan ve kire nüfuz etmesine (ıslanma) ve topaklaşmış (yığın) parçacıkların suya diğer maddelerden (emülsiyon) daha iyi bağlanmasına izin veren suda çözünür maddelerdir [54]. Yüzey aktif maddeler temizlik ürünlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Temizlik ürünleri, pH değerlerine göre belirli temizlik işleri için ayrılabilir. pH'ı 7'den düşük olan asitli temizlik ürünleri, banyo, küvet, fayans, küf sökücü gibi zor lekeleri, pasları ve mineral lekeleri temizlemek için kullanılır. pH'ı 7'den yüksek olan alkali temizlik ürünleri, organik madde gibi yüzeylerden yağlı ve yağlı kirleri çıkarmak için kullanılır. Alkali yüzey aktif maddeler yağlı zemin temizliğinde, çamaşır deterjanı ve mutfak temizleyicisi olarak kullanılmaktadır [55].

2.2 Yüzey Aktif Maddeler

Yüzey aktif maddeler, monomerik birim adı verilen bir yapı içinde hidrofobik ve hidrofilik yönlerden oluşmaktadır [56]. Yüzey aktif maddeler, çözeltilerin yüzey gerilimini azaltan amfifilik bileşikler olduğundan, ıslatma ajanları, emülgatörler, çözündürücü ajanlar, köpük ve köpük önleyici ajanlar, deterjanlar vb endüstrilerde, hastanelerde ve evlerde çeşitli temizliyiciler olarak kullanılmaktadırlar [57, 58]. Sürfaktanlar, belirli bir konsantrasyonun ve sıcaklığın üzerinde, çeşitli şekil ve boyutlarda miseller oluşturan çözünür amfifillerdir [54]. Yüzey aktif maddenin yapısı, durulamadan sonra uzaklaştırılan suyla birleştirmek üzere çözünmeyen ve istenmeyen parçacıkları (yağ) toplayan hidrofobik bir kısma sahiptir. Misel, kiri ve istenmeyen parçaları içerisine alır ve su ile yıkayarak kirlerin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlar [59]. Misel, emülsiyon sisteminde olduğu gibi, suyun yağ

ile birleşmesine de yardımcı olur. Yüzey aktif maddelerin temizleme ve çözünürlük özellikleri misel oluşumuna bağlıdır [56]. Monomerik birimin bir misel ile birleştiği bir olguya miselizasyon denir [60].

Sürfaktanlar esas olarak C16 ve C18 karbon tuzlarından ve az miktarda düşük moleküler ağırlıklı karboksilatlardan oluşmaktadır [61]. Yüzyıllardır eritilmiş iç yağının sodyum hidroksit ile ısıtılmasıyla sabunlar yapılmıştır. Reaksiyon sonunda yağ asitlerinin sabun ve gliserol adı verilen sodyum tuzları oluşmaktadır [60].

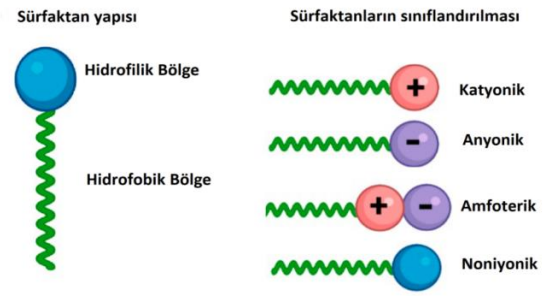


Şekil 2.1 Sabunlaşma reaksiyonu

2.2.1 Aktif Maddelerin Sınıflandırılması

Yüzey aktif maddeler hidrofilik baş ve hidrofobik kuyruk ısımlarından oluşmaktadır. Sürfaktanların çoğu, 12 ile 18 karbon atomlu basit bir hidrokarbon grubu olan bir kuyruğa sahiptir. Kuyruk grubu dallanmış olabilir veya bir aromatik halka içerebilir. Bununla birlikte, sürfaktanlar, kafa gruplarının yükü temelinde çok daha yaygın bir şekilde sınıflandırılmaktadır[60].

Eğer suyu seven kafa grubu bir elektrik yükü taşıyorsa, iyonik yüzey aktif madde olarak tanımlanmaktadır. Genellikle iyonik gruplar sülfat veya amonyumdan oluşmaktadırlar. Yüzey aktif maddelerin, kafa grubu üzerindeki yüke dayanarak: anyonik; katyonik; noniyonik ve amfoterik olarak sınıflandırılır [62].



Şekil 2.2 Yüzey aktif maddelerin sınıflandırılması

2.2.1.1 Anyonik yüzey aktif maddeler

Anyonik yüzey aktif maddeler, negatif yüklü bir grup veya anyon donörüdür. Negatif yüklü hidrofilik kısım, yağın hidrofobik zincirine bağlıdır. Anyonik yüzey aktif maddeler negatif yüklü bir baş grubuna sahiptir ve karşı iyon çoğunlukla Na+'dır. Bu grup, geleneksel sabunları (karboksilatlar) ve ilk sentetik deterjanları içerir: sülfatlar ve sülfonatlar. Sülfatlar ve sülfonatlar, iki değerlikli metal iyonlarına karşı daha fazla toleransa sahip oldukları ve sert suda kullanılabildikleri için karboksilatlara göre avantajlara sahiptirler [60, 62].

Alkil benzen ve sülfonatlarının kısaltmaları, DDB (dodesil benzen), ABS (alkil benzen sülfonat), LAS (doğrusal alkil sülfonat) ve LAB'dir (doğrusal alkil benzen). LAB, yüksek köpürme özelliklerine ve yüksek çözünürlüğe sahip bir yüzey aktif maddedir. Ancak suyun sertliğinden etkilenmektedirler. Bu nedenle LAB, çamaşır deterjanlarında LABSA (lineer alkil benzen sülfonik asit) formunda kullanılmaktadır [63].

Alkil eter sülfatın R-CH2-CH2-0-(CH2-CH2-O)n-S03Na+R grubunda 10-12 karbon atomu vardır. n sayısı 1 ile 4 arasında değişmektedir. Su sertliğinden etkilenmez ve yüksek çözünürlük göstermektedir. Sıvı formülasyonların düşük sıcaklıklarda saklanması kolaydır. Yün deterjanlarında, banyo köpüklerinde, şampuanlarda ve bulaşık deterjanlarında kullanılmaktadır [64]. R-CH2-CH2-O-SO3Na+ formülündeki alkil sülfatın R grubu 11 ile 17 C arasındadır. Genellikle hassas olmayan kumaşlarda kullanılmaktadır [65].

2.2.1.2 Noniyonik yüzey aktif maddeler

Noniyonik yüzey aktif maddelerde hidrofobik zincire yüksüz bir grup bağlanmıştır[60]. Noniyonik yüzey aktif maddeler, geniş HLB değerleri ve deterjan, gıda, kozmetik ve farmasötikler de dahil olmak üzere çok düşük toksisiteleri nedeniyle çok çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır [69]. Bu yüzey aktif sınıfının örnekleri arasında yağ alkolleri ve alkol etoksilatlar; polietilen glikol esterler (etoksillenmiş yağ asitleri) ve etilen ve propilen oksitlerin blok kopolimerleri bulunmaktadır. Bu sınıf aynı zamanda, amin oksitler gibi semipolar bileşikler olarak bilinen bir grup bileşik içermektadir. Amin oksitler sadece asit çözeltisinde katyoniktir, ancak nötr veya alkalin çözeltisinde iyonik özellik göstermemektedir [61].

2.2.1.3 Katyonik yüzey aktif maddeler

Katyonik yüzey aktif maddeler, azot atomuna bağlanmış pozitif yüklü bir hidrofobik grup (R) kafa grubuna sahiptir. Bu grup esas olarak kuaterner amonyum, imidazolinium ve alkil piridin bileşiklerinden oluşmaktadır. Katyonik yüzey aktif maddeler iyonize olduklarında pozitif yüklü hidrofobik amonyum veya piridine ve negatif yüklü hidrofilik gruplara ayrılmaktadırlar [66].

Katyonik deterjanların antimikrobiyal özelliği bulunmaktadır. Bu tür deterjanlar, gıda fabrikaları, restoranlar ve otellerde ayrıca eczacılıkta sıklıkla kullanılmaktadır. Katyonik yüzey aktif maddelerden sıklıkla dezenfektan olarak kullanılan kuaterner amonyum bileşikleridir [60, 62]. Biyosidal katyonik yüzey aktif maddeler, yüksek antibakteriyel etkileri ve insanlar için düşük toksisiteleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Monokuaterner amonyum yüzey aktif maddeler tipik olarak hem hidrofilik (suda çözünür) bir grup hem de hidrofobik (yağda çözünür) bir zincir içermektedir. Bu tür sürfaktanlar geleneksel sürfaktanlar olarak adlandırılır ve çok iyi antibakteriyel aktiviteye ve ayrıca yüksek yüzey aktivitesine ve çözünürlük özelliklerine sahip oldukları bilinmektedir. Kuaterner amonyum bileşiklerinin (QAC'ler) yapılarındaki pozitif yük nedeniyle daha güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler [67].

2.2.1.4 Amfoterik yüzey aktif maddeler

Amfoterik yüzey aktiflerin hidrofobik zincirine bağlı hem pozitif hem de negatif yük içeren hidrofilik grup bulunmaktadır [70]. Zwitteriyonik ve amfoterik yüzey aktif maddeler, anyoniklere kıyasla düşük cilt ve oküler tahriş özellikleri nedeniyle banyo ve bebek bakım ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar [61]. Amfoterik yüzey aktif maddelerde hem anyonik hem de katyonik kısımlar molekülde denge halinde bulunmakttadır. Ayrıca bu tür yüzey aktifler bazik ortamda anyonik, asidik ortamda ise katyonik olarak hareket ederler. Bu yüzey aktiflerin deriyi tahriş edici ve göz yakıcı özellikleri bulunmadığından özel şampuanlarda, kremlerde ve deriyi koruyucu olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar [71].

2.3 Yüzey Aktif Maddelerin Antimikrobiyal Etkisi

Yüzey aktif maddeler çeşitli hücresel bileşenlerle, özellikle proteinler ve lipitler ile etkileşime girerek mikrobiyal hücrelerin büyümesi ve yaşayabilirliği üzerinde zararlı etkilere neden olurlar. Sürfaktanlar ayrıca *B. subtilis*'te hücre otolizini indükler ve *P. aeruginosa* hücrelerinin solunumunu engellemaktedirler [72].

Polar olmayan antimikrobiyal ajanların molekülleri, hücre zarının lipid fazına iki şekilde girebilir: (1) pasif difüzyon ve (2) aktif difüzyon. Bu moleküller sitoplazmik membranı, enerji metabolizmasını, sitoplazmayı ve çekirdeği bozarak hücrenin iç ve dış maddeleri kontrol etme yeteneğini kaybetmesine neden olarak hücreye giren diğer moleküllerin ölümüne neden olurlar. Hidrofobik bir antimikrobiyal ajan, hidrofilik olandan daha iyi çalışmaktdır. Bu antimikrobiyal maddeler klor, kuatlar, fenol, perasetik asit, iyot, hidrojen peroksit, alkol, biguanidler ve ozondur [73].

İyonik olmayan yüzey aktif maddeler için polar baş grubu genellikle hidrofobik kuyruktan çok daha büyük olduğundan ve bunların çözünürlük özellikleri iyonik olanlardan farklıdır ve zar çözünürlüğü için birçok avantaj sağlamaktadır. Genel olarak, iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin bakterilerin sitoplazmik zarlarını çözmede etkili olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, Gram negatif bakteriler, deterjanlara maruz kalmaya karşı oldukça dirençli ve deterjanlara karşı daha dirençli olma eğiliminde olan bir dış zara sahiptir [74].

Cowles [74], Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı farklı karbon zinciri uzunluklarına sahip sodyum alkil sülfatın bakteriyostatik özelliklerini incelemiştir. Genel olarak Gram pozitif bakterilerin kullanılan alkil sülfat tarafından inhibe edildiği, ancak Gram negatif bakterilerin inhibe olmadığı bulunmuştur. Cowles ayrıca bu düz zincirli alkil sülfatlar için zincir uzunluğu ile *Staphylococcus aureus*'a karşı inhibisyonu arasında bir ilişki olduğunu ve optimum zincir uzunluğunun 12 ila 16 karbon atomu arasında olduğunun sonucuna varmıştır [74]. Baker vd. [75] tarafından yapılan bir çalışmada anyonik ve katyonik deterjanın bakterisidal özellikleri Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı test edilerek bakterisidal özellikleri karşılaştırılmıştır ve anyoniklerin sadece Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu ve katyoniklerden çok daha az etkili olduğu sonucuna varılmıştır [75].

Katyonik yüzey aktif maddeler üzerinde yapılan araştırmalar, bunların hücreye girebildiklerini ve süperoksit anyonlarının üretimini indükleyerek oksidatif strese

neden olarak hücresel metabolizmada bozulmalara yol açabileceklerini bildirmektedir. Mikroorganizmaların hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin artması apoptoza neden olan sitotoksik bir etkiye neden olmaktadır [76]. Monomerik kuaterner amonyum tuzları, perforasyona neden olmadan hücre zarının dengesini bozabilir. Bu durum muhtemelen membranda gözeneklerin oluşumu yoluyla geçirgenlik değişikliklerinin indüklenmesinden kaynaklanmaktadır. Geçirgenlikteki artış, hücreye giren yüzey aktif maddenin dolaylı etkisi olabilir, oksidatif strese neden olabilir ve salınan ROS tarafından lipitlerin ve sterollerin oksidasyonunu indükleyebilir [76].

Kuaterner'in yapısı, alkil veya aril gruplarına bağlı pozitif yüklü nitrojen içerir, bu da dış yüzeylerde pozitif yüke neden olmaktadır. Fosfolipidler ve lipopolisakkaritlerdeki kuaterner nitrojen grupları ile fosfat grubu arasındaki yük etkileşimleri, kompleks oluşumuna yol açabilir [58]. Bakteri hücre yüzeyi genellikle negatif yüklüdür ve bu nedenle katyonik yüzey aktif maddeler bakteri hücre duvarı ile elektrostatik etkileşimin yanı sıra hidrofobik etkileşim yoluyla etkileşir. Katyonik etkileşimi, (i) bakterilerin hücre yüzeyinde adsorpsiyona ve (ii) hücre duvarından difüzyon yoluyla sitoplazmik zara bağlanmasına ve sitoplazmik zarın bozulmasına bağlı olarak ölümle sonuçlanabilir [58, 60]. Kuaterner amonyum bileşiği, negatif yüklü hücrelerin dış yüzeyine maruz kaldığında, bir elektrostatik bağ oluşur. Bu durum, mikroorganizmaların dış zarının içeri ve dışarıdaki maddelerin kontrolünü kaybetmesine neden olur ve dezenfektanın mikroplar ölene kadar iç hücrelerden geçmesine ve yok etmesine izin verir [68]. Ayrıca, kuaterner amonyum bileşiklerin spor çimlenmesini ve büyümesini engelleyebildiği bildirilmiştir [58, 68]. Pozitif yüklü kuaterner amonyum bileşiklerin bakterisidal etkisi, bakteri, mantar ve diğer bakterilerin negatif yüklü biyolojik lipid membranları ile elektrostatik etkileşimlerine bağlanabilir. Ayrıca, kuaterner amonyum bileşiklerin sitoplazmik membrandaki fosfolipid bileşenleri ile etkileşime girerek membran distorsiyonu oluşturduğu ve ozmotik stres altında protoplast lizisine yol açtığı öne sürülmüştür [67]. Örneğin klorheksidin ve kuaterner amonyum bileşikleri gibi bazı antimikrobiyal ajanların, dış zara zarar vererek Gram negatif bakteriyel hücreye girdiği düşünülmektedir. Bu nedenle bu lipopolisakkaritin kuaterner amonyum bileşiklerine karşı bir bariyer görevi gördüğünü, ancak klorheksidine karşı etkili olmadığını göstermektedir [77].

Maya hücresinin katyonik yüzey aktif madde ile ilk temasından sonra, hücre yükündeki negatif yükteki artışı belirleyen EPS'yi (ekzopolisakaritler dahil) büyük miktarlarda sentezlemeye başlar. Pozitif yüklü katyonik yüzey aktif maddelerin hidrofilik kafalarını hücre yüzeyine doğru yönlendirerek negatif yüklü hücresel yapılara bağlanmasına yol açmaktadır. Sürfaktanlar daha sonra proteinlerin artan ekspresyonu nedeniyle daha hidrofobik olanlar da dahil olmak üzere maya hücresinin diğer alanları ile etkileşime girebilir [76]. Sürfaktanların hücreye girmesi, mitokondriyal sürecin bozulmasına ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi yoluyla hücre içi hasara neden olabilir [76].

Daha kısa alkil zincirlerine sahip katyonik yüzey aktif maddeler genellikle daha zayıf yüzey etkileşimleri ile karakterize edilir ve sonuç olarak alkil zincir uzunluğu daha zayıf antifungal aktiviteye işaret eder. Daha kısa zincirli katyonik yüzey aktif maddeler daha az lipofiliktir, bu nedenle hücre zarlarıyla etkileşime girme olasılıkları daha düşüktür. Bileşiklerin aktivitesinde gözlenen artış ile birlikte alkil zincirlerinin uzunluğundaki bir artış, bileşiklerin artan hidrofobikliğinin bir sonucu olabilir, bu da hücre zarlarının fosfolipitleri ile daha fazla etkileşime ve bunların daha sonra bozunmasına yol açmaktadır [76]. Bustelo vd. [78]; alkil zincirinin uzaması ile antimikrobiyal aktivitenin arttığını bildirmiştirler. Kısa alkil zincirinin, lipit membranlar ile zayıf hidrofobik etkileşime yol açması ve bunun da çok düşük antimikrobiyal aktivite ile sonuçlanması beklenmektedir [78]. Polar baş grubu ayrıca sürfaktanın toksisitesi üzerinde de bir etkiye sahiptir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi, farklı yüklü baş gruplarının oküler tahriş özelliklerini, azalan tahriş sırasına göre: katyonik> anyonik> noniyonik olarak sınıflandırmıştırlar [79]. Sonuç olarak, Kuaterner amonyum tuzları ve katyonik yüzey aktif maddelerin genel olarak mükemmel antimikrobiyal ajanlar olduğu, ancak anyonik ve noniyonik yüzey aktif maddelerin mükemmel deterjan özelliklerine sahip oldukları, ancak daha düşük antibakteriyel etkiye sahip oldukları görülmüştür.

Tablo 2.1 Bazı yüzey aktif maddeler için yapı fonksiyon ilişkileri

Sürfaktan	Parametre	Sonuç
Alkil sülfat	Alkil zincir uzunluğu (n)	Optimum zincir uzunluğu n = 12-16
Uzun zincirli yağ asitleri	Alkil zincir uzunluğu (n)	n = 12, en aktif doymuş yağ asidi, ancak n = 18 doymamış yağ asidinden daha az aktivite
β-D-g lucopyranosyl-1 -alkyl phosphates	Alkil zincir uzunluğu (n)	n arttıkça hemolizin meydana geldiği konsantrasyon azalır
Amin oksitler	Alkil zincir uzunluğu (n)	Optimum zincir uzunluğu n = 9-13
Bis-quaternary amonyum tuzları	Alkil zincir uzunluğu (n)	Antimikrobiyal aktivite için zincir uzunluğu n=9-13'tür. Optimum n = 11-12
quaternary amonyum tuzları	Alkil zincir uzunluğu (n)	Alkil zincir uzunluğu lauril olduğunda büyüme inhibisyonu maksimuma ulaşır
Amin oksitler	Alkil zincir uzunluğu (n)	Optimum zincir uzunluğu n = 9-13
Doymuş yağ asitleri	Alkil zincir uzunluğu (n)	Etkinlik aşağıdaki sıradadır: 14>12>16>18
Aromatik olmayan kuat amin oksitler	Alkil zincir uzunluğu (n)	CMC optimum aktivite için belirli bir aralıkta olmalıdır
Kationik, aniyonik, amfotermik	Alkil zincir uzunluğu (n)	n arttıkça, sürfaktanların tahriş özellikleri de artar.
Morfolium bromür, pirolidinyum,	Alkil zincir uzunluğu (n)	n arttıkça, n = 14-16 olduğunda aktivite maksimuma çıkar, sonra azalır
Polioksietilen - sürfaktanlar	Alkil zincir uzunluğu (n)	n arttıkça hemolizin meydana geldiği konsantrasyon azalır
Doymuş sabunlar	Zincirin dallanması	Dallanma, sürfaktanın tahriş özelliklerini arttırır
Nonilfenil EO, tributilfenil EO	Etilen oksit (EO) grupları	EO gruplarının sayısı arttıkça aktivite de artar
Yağ asitleri	Baş grubu boyutu	Başş grubu boyutu, belirli mikroorganizmalara etki ettiği görülmektedir.
Amin oksitler	Asimetri	Asimetri yüzey aktif madde aktivitesini azaltmaktadır.
iyonik ve noniyonik	Lipofilik	Artan lipofiliklik aktiviteyi azaltır
Kuaterner amonyum	Lipofilik (Ck)	En aktif bileşiklerin Ck'si yaklaşık 1 mmol'dir.
Oktil fenolleri	Ayrılım katsayısı	Dağılım katsayısı ve aktivite arasında pozitif korelasyon
Yağ asitlerinin polietilen esterleri	HLB	Korelasyon yok (ancak kuyruk ve kafa grubu katkıları aktiviteyi etkiler)
Oktil fenolleri	HLB	HLB arttıkça aktivite de artar
Triton X- 100,	HLB	HBL ve aktivite arasında pozitif korelasyon
Polioksietilen alkil alkol eterleri	HLB	HLB 11-15 bakterileri lizisinde daha etkili
Polioksietilen yüzey aktif maddeler	MW	MW arttıkça hemoliz yüzdesi azalır
Polimerik fosfonyum tuzları	MW	MW arttıkça antibakteriyel aktivite artar
Piridinyum bromür dörtlü	CMC	CMC yaklaşık 1 mmol.dm-3 olduğunda maksimum aktivite

3
PROBİYOTİK YÜZEY TEMİZLEYİCİLER

3.1 Probiyotik Yüzey Temizleyiciler

Yeni nesil temizlik ürünleri, topraktan ve kirlenmiş yüzeylerden sağlanan besinleri kullanarak istenmeyen mikroorganizmalar ile rekabet eden yararlı mikroorganizmaları içermektedir. Bu yararlı mikroorganizmalar uygulandığı yüzeyde kalacağı için (çoğu zaman sporlar; birçok formülasyonda spor oluşturan bakteri, *Bacillus* spp. bulunur) ve istenmeyen mikroorganizmalar tarafından kolonizasyonu engelleyeceği için tercih edilmektedirler [2].

Bacillus cinsinin bakterileri apatojenik tir (iyi tanınan iki tür hariç), her yerde bulunur (toprakta, suda, sebzelerde vs.) ve insanlar tarafından güvenli kullanım geçmişine sahiptir [7]. Probiyotik olarak kullanılan; *Bacillus clausii, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus* ve *Bacillus coagulans, Bacillus* cinsinin belirli türleridir. *B. subtilis*'in kullanımı, en az bir Avrupa ülkesinde (İtalya) besin takviyesi olarak kullanılmak üzere onaylanmıştır [80]. *Bacillus* türlerinin probiyotik olarak kullanılması güvenlik sorununu gündeme getirmektedir. *Bacillus cereus,* bir veya daha fazla sayıda enterotoksin üretiminden kaynaklanan gıda zehirlenmelerine neden olan mikroorganizmadır [9].

Probiyotik *Bacillus* cinsinin enzimatik aktivitesi (esterazlar, lipazlar, glikozidazlar ve fosfatazlar) nedeniyle, temizleyicilere eklenmesi, temizleyicinin kendi içinde yüksek konsantrasyonlarda kimyasal deterjan bileşikleri ihtiyacını ortadan kaldırarak düşük çevresel etkiye ve düşük maliyetli eko-sürdürülebilir formülasyonlara neden olur [7]. Deterjanlarda kullanılan ilk enzim proteaz dır. Günümüzde ise proteazlar, lipazlar, amilazlar ve selülazlar tarafından desteklenmektedir [81]. Deterjan endüstrisinde alfa-amilaz enzimi, nişasta bazlı kirleticileri temizlemek için katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Özellikle sıvı deterjanların %90'ından fazlası amilaz enzimini içermektedir. Deterjanlardaki enzim katkı maddelerinin en büyük avantajı, diğer deterjanlara göre daha iyi temizlemeye ve ortam şartlarını yumuşatmaya neden olmalarıdır [82]. Çevresel

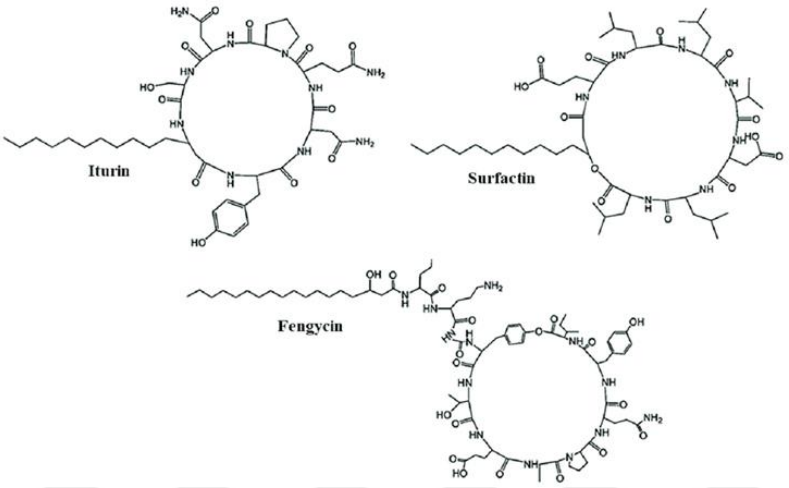
etkisi nedeniyle bakteriyel proteaz kullanımı önemli ölçüde artmıştır. Özellikle alkil benzene sülfonatlar gibi yüzey gerilimini azaltan maddeler, proteazların kendiliğinden ısınarak açılmasına ve yumuşamasına neden olur [81].

Mikrobiyal bazlı temizlik ürünleri, evsel, kurumsal ve endüstriyel ortamlarda ve daha fazla kullanım alanına sahip yeni nesil temizlik ürünleridir [83]. Yapılan çalışmalarda; mikrobiyal temizlik ürünlerinin, klor gibi dezenfektan molekülleri içeren geleneksel temizlik ürünlerine kıyasla, yüzeylerdeki patojenik mikroorganizma sayısının uzun vadede azaltılmasında daha etkili olduğu görünmektedir [2, 84].

Mikrobiyal bazlı temizlik ürünleri, aktif bileşenler olarak uygun bakteri ve sporları içeren ve ayrıca enzimler ve / veya kimyasallar içerebilen bir tür çevre dostu temizlik ürünüdür [83]. Probiyotik sporları, konsantre temizleyici içeriğinde, suda seyreltildiğinde ve yüzeylere uygulandığında canlılıklarını korudukları taktirde temizliyicilere ilave edilmek için özellikle tercih edilmektedirler [7]. Mikrobiyal bazlı temizlik ürünlerinde bulunan yararlı mikroorganizmalar, organik maddeleri bozabilecek hücre dışı biyo yüzey aktif madde ve enzim (örneğin, proteazlar, selülazlar, amilazlar, üreazlar) üretmektedirler. Biyo yüzey aktif madde üreten mikroorganizmaların birçoğu hidrokarbon çözücüleri olarak kullanışlıdırlar [83].

Biyo yüzey aktif maddeler genellikle bir kültür ortamında bakteri, mantar veya mayalarla fermantasyondan türetilebilen mikroorganizmaların aerobik büyümesi ile sentezlenir [16]. Biyo yüzey aktif maddeler, yüzeyler arası yüzey gerilimini azaltarak ve kimyasal yüzey aktif maddelerden daha düşük toksisite seviyelerinde biyolojik parçalanabilirliği artırarak temizleme işlemini kolaylaştırır [83]. Biyo yüzey aktif maddelerin bir başka avantajı, aşırı pH, sıcaklık ve tuzluluktaki stabilite seviyeleridir [16, 83]. Ayrıca bir biyo yüzey aktif maddenin potansiyel uygulaması, emülsifikasyonu, ayrılması, çözündürülmesi, sıvı viskozitesinin azaltılması ve yüzey gerilimi özelliklerine dayanmaktadır [16]. Bazı biyo yüzey aktif maddelerin sentetik ilaçlara ve antimikrobiyal maddelere uygun alternatifler olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle etkili ve güvenli terapötik ajanlar olarak kullanılabilirlikleri kanıtlanmıştır [45, 85]. Ana biyo yüzey aktif madde grupları glikolipidler, lipopeptidler, fosfolipitler, yağ asitleri ve nötr lipitlerdir [16].

Lipopeptidler, antimikrobiyal aktiviteye sahip olan biyo yüzey aktif madde sınıfını oluşturur. *B. subtilis* tarafından üretilen surfaktin, en iyi bilinen lipopeptittir [16, 45]. Surfaktin, güçlü antibiyotik aktivitesine sahip en güçlü biyo yüzey aktif maddedir. Diğer antimikrobiyal lipopeptitler arasında fengisin, iturin, basilomisin ve mikosubtilin *B. subtilis* tarafından üretilmektedir. Lichenysin, pumilacidin ve polimiksin B, sırasıyla *B. licheniformis, B. pumilus* ve *B. polymyxa* tarafından üretilen diğer antimikrobiyal lipopeptitlerdir [16, 45, 49].

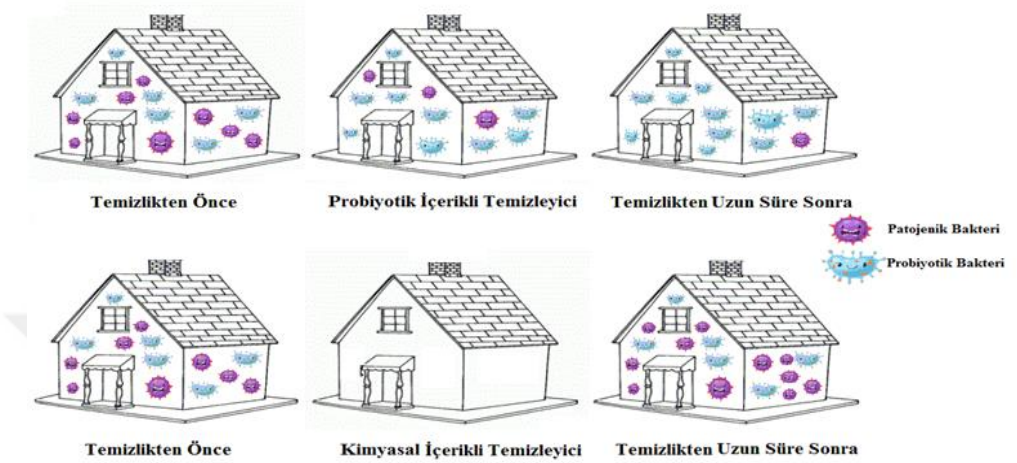


Şekil 3. 1 Iturin, surfactin ve fengycin'in yapıları; hepsi kısa siklik peptide bağlı bir lipit kuyruğundan oluşan ortak bir yapıyı paylaşır

Antimikrobiyal lipopeptitlerin probiyotik *Bacillus* ürünleri tarafından üretilmesi, gastrointestinal sistemdeki patojenik mikroorganizmaların büyümesini inhibe etmelerinin ana mekanizmalarından biri olarak görülmektedir [34]. Yapılan bazı çalışmalarda, *B. circulans* tarafından üretilen lipopeptit biyo yüzey aktif maddesinin, *Proteus vulgaris, Alcaligens faecalis*, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve diğer patojenik suşlara karşı aktif olduğu rapor edilmiştir. Glikolipid, MRSA dahil *Staphylococcus* türlerine karşı özellikle etki gösterdiği, buna ek olarak test edilen suşlardaki ortak direnç mekanizmalarının varlığından etkilenmediği gözlemlenmiştir [34].

Biyo yüzey aktif maddeler patojenlere karşı doğrudan etkilerinin yanı sıra, biyofilmlerin geliştiği ortamın fiziksel ve kimyasal durumunu da değiştirebilir. Bu biyofilmlerle baş etmek zor ancak önemli bir hedeftir, çünkü geleneksel antimikrobiyallerle etkili bir şekilde tedavi edilmesi zordur [34]. Son çalışmalarda, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* suşların biyofilm oluşumunu seçici olarak inhibisyon

aktivitesi gösterilmiştir. Özellikle, S. *aureus* ATCC 29213 ve *Escherichia coli* CFT073 biyofilm oluşumu sırasıyla % 97 ve % 90 azalttığı görülmüştür [14]. Ayrıca bazı temizlik ürünleri, pH'ı düşürerek istenmeyen mikropların büyümesini doğrudan engelleyebilir. Mikroorganizmalar işlem görmüş yüzeyde kalacağı için istenmeyen mikroorganizmalar tarafından kolonizasyonu engellemektedir [2].



Şekil 3. 2 Probiyotik temizlik ürününün evdeki zemin temizliğinde uzun vadeli etkisi

1990'lara kadar mevcut bakım ürünleri farklı *Pseudomonas* ve / veya *Bacillus* türlerini içeriyordu. *Pseudomonas* içeren ürünlerin çoğu poşetlerde veya tabletlerde toz halinde bulunurdu [1]. Bu alanda en sık kullanılan mikroorganizmalar, *Bacillus, Bifidobacterium, Lactobacillus, Rhodopseudomonas* ve *Saccharomyces* cinslerinin üyeleridir [2]. *Bacillus* türleri, yıllarca sıvı ortamda tutulmasını sağlayan ısıya dayanıklı sporlar oluşturma özelliğine sahiptir [29]. Mikrobiyal temizlik ürünlerinin ortaya çıkmasıyla, sıvı ürünlerin pazarlanması ve dolayısıyla üreticilerin *Bacillus* kullanımına yönelmesi zorunlu hale gelmiştir [1]. Bazı üreticiler, sporların daha uzun bir raf ömrüne, yani bir yıla ve hatta dört yıla kadar raf ömrü sağlamak için bitkisel hücreleri kullanmak yerine farklı *Bacillus* spp. sporlarının kombinasyonlarını kullanmada uzmanlaşmıştır [2].

Temizleyicilerde kullanılan mikroorganizmaların bazıları, gıda ve diğer işlem bağlamlarında genellikle güvenli (GRAS) olarak kabul edilmektedirler [86]. *Bacillus* cinsi, hem gıda endüstride hem de diğer endüstrilerde güvenli bir kullanım geçmişine sahiptir. Ayrıca *Bacillus* türleri, çok sayıda peptit antibiyotik üretmektedir. Bakteriyosinlerin veya bakteriyosin benzeri maddelerin (BLS)

üretimi, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* ve *B. cereus* gibi birçok *Bacillus* türü için araştırılmıştır [50].

Mikrobiyal temizlik ürünlerinin temizleme performansının kalitesi, yalnızca kullanılan bakteri suşlarının potansiyeline bağlı değildir. Ayrıca kimyasal ve enzimatik bileşenleri de istenen performansın elde edilmesinde önemli rol oynamaktadır [1]. Bu isteğe bağlı bileşenler, *Bacillus* spp. üzerinde çok az olumsuz etkisi olacak veya hiç olmayacak şekilde seçilmelidir [5]. Yararlı bakteriyel kültürlerin, yüzey aktif maddelerin, temizleme yardımcı maddelerinin yanı sıra enzimlerin bir arada kullanıldığı optimum formülasyonlarda, bu bileşenlerin birbirleriyle etkili ve iyi etkileşime girmelerini sağlamak ve yararlı bakteriyel etkiyi olumsuz etkilemekten ziyade teşvik etmeleri gerekmektedir [1]. Probiyotik içeren temizleme bileşiminde kullanılan sürfaktanlar ve diğer katkı maddelerinin *Bacillus* türleri üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi bulunmamalıdır [74].

Üründeki probiyotik bakterilerin hayatta kalmasını birçok faktör etkileyebilir. Bu faktörler probiyotik bakterinin tipini, ortamın pH'ını, hidrojen peroksit ve çözünmüş oksijenin varlığını, laktik asit ve asetik asit gibi metabolitlerin konsantrasyonunu, inokülasyon miktarını, inkübasyon sıcaklığı ve süresini ve saklama koşullarını içerir [5, 9]. Bu faktörlere bağlı olarak çeşitli uygulamalarla probiyotik bakterilerin canlılık ve aktivitelerindeki azalmayı önlemek veya en aza indirmek için girişimlerde bulunulmaktadır. Buna karşın *Bacillus* sporları ilave bir işleme gerek duymadan, dayanıklılıkları sayesinde yüksek asitli ortamlarda canlılıklarını sürdürebilmekte, yaşama yeteneklerinde istenmeyen bir değişiklik olmadan oda sıcaklığında depolanabilmektedirler [9, 30].

Mikrobiyal temizlik ürünleri, doğası gereği ve genellikle aşırı pH ve sert bileşenlere sahip geleneksel kimyasal temizleyicilerden daha ılımlı fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı mikrobiyal kontaminasyon ve bozulmaya karşı daha hassastırlar [1]. Bu nedenle, fermantasyon sonrasında uygulanacak tüm adımlar, formülasyonlarda ortaya çıkabilecek dış mikroorganizmaların yükünü en aza indirmek için çok dikkatli bir şekilde gerçekleştirilmelidir [30, 63].

Optimum koşullar altında, uygun ve iyi stabilize edilmiş formülasyonlara katılan *Bacillus* sporları, eğer ürün oda sıcaklığında saklanırsa, 5 yıl boyunca başlangıç canlılığının % 80'inden fazlasını koruyabilmektedirler [1, 9]. Mikrobiyal temizlik

ürünleri için depolama koşulları optimum değildir ve ürünlerdeki mikrobiyal bileşenler için farklı stres seviyeleri gösterebilir ve *Bacillus* sporlarının yüksek direncine rağmen, canlılıklarının azalmasına neden olabilmektedir [1]. Depolama ve taşıma koşullarının ötesinde, pH, sporların kalitesi, formülasyonun bileşenlerinin biyouyumluluğu, ayrıca kullanılan koruyucu maddenin doğası ve konsantrasyonu, *Bacillus*'un stabilitesinin azaltılmasına katkıda bulunabilecek faktörlerdir [5].

pH, *Bacillus* sporlarının canlılığında, korunmasında ve stabilitesinde önemli bir rol oynamaktadır. *Bacillus* sporlarının sıvı ortamda pH 6.8'de optimal stabiliteye sahip olduğu ve 4.8'in altındaki pH değerlerinde zaman içinde türün yaşayabilirliğinin azaltmada önemli bir ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Sporların kalitesi aynı zamanda sıvı ortamdaki canlılıklarının korunmasında da önemli bir etkiye sahiptir [9, 30].

Bacillus türlerinin kompleks sporülasyon işlemi farklı olgunlaşma aşamalarını içerir [1]. Kültür ortamının bileşimi, iz minerallerinin varlığı ve kültür yetiştirme süresi, sporların olgunluğunu ve sulu bir ortamda canlılıklarını sürdürme yeteneklerini etkileyen faktörlerdir [30]. Bu nedenle mikrobiyal temizlik ürünlerinin formülasyonlarında kullanılması amaçlanan *Bacillus* türünün spor üretimi için biyoproseslerinin optimizasyonunu sağlaması zorunludur [1]. Mikrobiyal temizlik ürünlerinde kullanılan bileşenlerin ve katkı maddelerin seçiminin ayrıca sporların canlılığı üzerinde doğrudan etkisi olduğu görülmektedir [5]. Kimyasal temizleyicilerin formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan birçok madde, bakteri sporları ile uyumlu değildir [30]. Sürfaktanların seçimine özellikle dikkat edilmelidir. Bazı çözücüler sporlarla etkileşime girebilir ve canlılıklarını olumsuz yönde etkileyebilir [5, 74]. Koruyucu madde seçimi ve uygun miktarda uygulanması özellikle önemlidir. Her ikisi de ürünü dış mikroorganizmalardan kaynaklı mikrobiyal bozulmaya karşı korumalı ve *Bacillus*'un spor kaybına neden olmamalıdır [1, 63].

4
MATERYAL-METOT

4.1 Kullanılan Mikroorganizmalar ve Besiyerleri

Besiyerleri (medya, kültür ortamı, besin ortamı) mikroorganizmaların gelişimi için formüle edilmiş özel ortamlardır. Bu çalışmada kullanılan besiyeri, mikroorganizma geliştirme, tanımlama, izolasyon, koloni sayımı, ve duyarlılık testi gibi birçok farklı analiz için kullanılmıştır. Üretilecek hücre tipine (katı, sıvı ve besin içeriğine) bağlı olarak farklı ortam türleri vardır.

4.1.1 Patojenik Bakteri Suşları ve Kültür Ortamları

Çalışmada kullanılan indikatör mikroorganizmalar Yıldız Teknik Üniversitesi Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. Çalışmada *Escherichia coli* ATCC 43888 - ATCC 25922 - ATCC 8739 – K12 suşu, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 – ATCC 3028 indikatör bakterileri ve *Candida albicans* ATCC 10231 indikatör maya ve indikatör mantar suşları olarak *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium oxysporum, Aspergillus niger* ve *Botritis cinerea* Yilmaz vd. [87] belirtildiği gibi tanımlanmıştır. Mantarların inkübasyonu 27 °C'de 6 gün Potato Dekstrose Agar (PDA, Merck) besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir[6].

İndikatör bakterileri için besiyeri olarak katı ortam olarak Nutrient Agar (NA, Merck) ve sıvı besiyeri olarak Nutrient Broth (NB, Merck) kullanılmıştır. İndikatör bakteriler 37 °C'de 24 saat (Binder ve Test T 420 S) inkübe edilmiştir. *E.coli*'nin tanımlanması için MacConkey agar (MAC, Merck) kullanılmıştır. MAC *E.coli* gibi laktoz kullanan bakterilerin kırmızı koloniler oluşturmasını sağlamaktadır.

4.1.2 Probiyotik Bakteri Suşları ve Kültür Ortamları

Çalışmadan kullanılan probiyotik bakteriler*; B. subtilis, B. safensis* ve *B. pumilus* topraktan izole edilerek tanımlanmıştır. Ayrıca *B. subtilis* ATCC 6633 Yıldız Teknik Üniversitesi Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. Probiyotik

bakterilerin aktivasyonu için Luria-Bertani (LB, Merck) sıvı besiyeri, üretimi için Tryptic Soy Broth sıvı besiyeri (TSB, Merck) ve sayımlar ve tanımlamak için Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) katı besiyeri kullanılmıştır[3].

4.2 Topraktan *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması

4.2.1 Topraktan *Bacillus* spp. İzolasyonu

Toprak örnekleri, *Bacillus* spp. suşlarının izolasyonu için 1 g tartılarak 9 mL steril fosfat tamponlu salin (PBS) içerisine ilave edilip homojen şekilde karıştırıldıktan sonra, 80 ºC de 15 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir [13]. Tek koloni elde edilmesi amacıyla seri seyreltme ile 10^{-1}'den 10^{-6}'ya kadar hazırlanan örnekler TSA besin ortamna 100 µL ekilerek 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından besiyerinde tek düşmüş koloniler morfolojilerine göre değerlendirilmiş ve karakteristik *Bacillus* görünümüne sahip koloniler TSA besiyerine çizgi ekim yapılarak 37 ºC bir gece inkübasyona bırakılmıştır. TSA ortamında üreyen suşlar sonraki analizler için saklanmıştır [13].

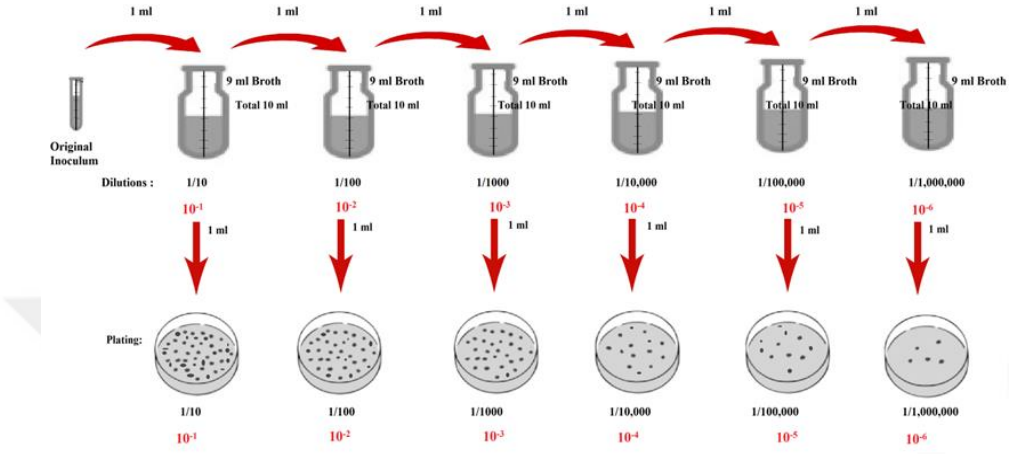
4.2.2 *Bacillus* Türlerinin Morfolojik İdentifikasyonu

Daha önce % 20 gliserol stok halinde saklanan probiyotik bakteri kültürleri, TSA besiyerine tek koloni ekimleri yapılarak 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Elde edilen saf kültürlerden bakteri koloni rengi, tipi ve büyüklüğü gibi morfolojik karakterleri belirlenmiştir. Aynı zamanda saf kültürler TSB ve LB besiyerlerinde inkübe edilerek sıvı besiyerinde üreme şekilleri tespit edilmiştir [30].

4.2.2.1 *Bacillus* Türlerinin Sporlandırılması ve Spor Sayısının Hesaplanması

Endospor oluşumu, bakterilerin olumsuz çevresel etkilere verdiği tepkidir. Endospor oluşumu (sporülasyon), bakterinin sitoplazmik yüzeyinin boyutunu küçülterek, metabolik hızını azaltarak gerçekleşir. Sporların fiziksel ve kimyasal etkilere karşı direnci yüksektir. Sporların oluşması için gereken süre bakteri türüne, ortam sıcaklığına, karbon ve azot kaynaklarının azalmasına bağlıdır [24]. Bakteriler çoğaldıktan sonra sıvı besiyerinin çevre koşullarındaki bozulma sporlanmayı artırır. Bu çalışmada, sıcaklık değişimleri ile çevre koşulları kötüleştirilmiştir. Koşulları kötüleştirmek için *Bacillus* spp. 15-20 dakika 80 °C sıcaklığa maruz bırakılmıştır [88–90]. Kültür örnekleri 80 °C'de 15-20 dakika boyunca ısıl işleme tabi tutularak

sporlanması sağlandıktan sonra Spread plate yöntemine göre PBS ile seri olarak seyreltilip TSA agar plakalarına ekilmiştir. Koloni oluşturan birimlerin (KOB) sayısı, TSA plakalarının 37 °C'de 20-24 saat inkübasyonundan sonra koloni sayımı ile belirlenmiştir. İnkübasyonun ardından gelişen *Bacillus* kolonileri sayılıp ve KOB / mL cinsinden ifade edilmiştir (Şekil 4.1) [6].



Şekil 4.1 Spread plate yönteminin şematik gösterimi

Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi (PBS); 800 mL distile su'ya sırasıyla: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na2HP04, 0.24 g KH2P04 eklenerek hazırlanmış ve pH'ı 7.4'e ayarlanmıştır. Toplam hacme distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Solüsyon otoklavlama yoluyla sterilize edilmiştir (15 dakika, 121 ° C) ve kullanılana kadar oda sıcaklığında saklanmıştır [91].

4.2.2.2 Gram Boyama

Gram boyama için preparat kristal viyole ile bir dakika süreyle sulandırilip, su ile durulanmıştır. Gram`s Iodine ilave edilerek bir dakika süreyle su ile çalkalanmıştır. Preparat üzerine 20 saniyeyi geçmeyecek şekilde etanol uygulanarak su ile yıkanmıştır. Son olarak safranin eklenir ve 30 saniye beklemeye bırakılır. Preparat tekrar distile su ile yıkanır ve havada doğal olarak kurumaya bırakılır, lam üzerine daldırma yağı damlatılır ve x100 objektif ile incelenir [92].

4.2.2.3 Spor Boyama

Spor Boyama İçin (Schaeffer & Fulton`s): Aşağıdaki gibi hazırlanmıştır. Lamın tamamı Schaeffer & Fulton'un Spore Stain A solüsyonu (malahit yeşili) ile

boyanarak 5 dakika buharda tutuldu ardından su ile durulandı. Preparat, 30 saniye boyunca Schaeffer & Fulton'ın Spore Stain B solüsyonu (safranin) ile
ile boyanmış ve distile su ile yıkanıp hava ile kurutulduktan sonra bakteri sporlarının morfolojisi mikroskop altında incelenmiştir [92].

4.2.2.4 Santrifüjleme ve Hücre Kütlesinin Hesaplanması

Santrifüj işleminin esası, çözeltideki katı parçacıkları merkezkaç kuvvetinin etkisiyle sıvı kısımdan ayırmaktır. *Bacillus* hücrelerinin boyutu nedeniyle, ultrasantrifüjün yüksek santrifüj alanları tarafından çökeltilebilirler. Hücre çökme hızı, moleküllerin boyutuna ve şekline ve çözeltinin viskozitesine bağlıdır [93].

Bakteriler büyümeyi ve sporlanması sonlandığında, bakterileri sıvı besiyerinden uzaklaştırmak için santrifüjleme yapılır. Sıvı besiyeri santrifüj tüplerine yerleştirilerek 4 °C'de 12.000 rpm'de 20 dakika boynca santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi bakteri ve sıvının (süpernatant) ayrılmasını sağlamıştır. Süpernatant, 0.45 µm çaplı filtreden (Isolab, PTFE 45-25) geçirilerek kalan bakteri hücrelerinin uzaklaştırılması sağlanmiştir. Süpernatant, antimikrobiyal özellikleri belirlemek için saklanmıştır [38]. Numuneler (50 mL), 15 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatan atılıp hücre topağı liyofilize edilmiştir. Kuru ağırlık hesaplanarak litre başına gram cinsinden ifade edilmiştir [30, 38].

4.2.3 Seçilen Bakteri İzolatının Moleküler Yöntemler ile Tanımlanması

Suşların genomik DNA'sının ekstraksiyonu, üreticinin protokolüne göre genomik DNA ekstraksiyon kiti (Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Malezya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA gen sıralaması, AMP_F (5'-GAGAGTTGATYCTGGCTCAG-3') ve AMP_R (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA3') [94] primerleri ile gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA gen sıralaması için PZR reaksiyon karışımları ve PZR koşulları, Dertli vd. [95]. Amplifikasyon ürünleri jel elektroforezinde çalıştırıldı ve sekanslama için Medsantek (Türkiye) gönderilmiştir. Elde edilen 16SrDNA gen dizileri ilk olarak Genetik Analiz Sisteminde analiz edilmiştir. Ardından, NCBI BLAST araştırma aracı (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) veritabanında bulunan dizilerle karşılaştırılmış ve en yakın türler belirlenmiştir.

4.3 *Bacillus* İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

4.3.1 İzolatların Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Topraktan izole edilen ve -80 °C'de saklanan *Bacillus subtilis, Bacillus safensis* ve *Bacillus pumilus* bakteriler sıvı besiyerine ilave edilerek aktifleştirilmiştir. Çalışmada sıvı besiyerinde (LB) farklı sıcaklıkların bakterilerin büyümesindeki etkisi incelenmiştir. Bunun için petri kaplarına hazırlanmış olan katı besiyerine (TSA) azaltma metodu ile ekim yapılmıştır. Petri kapları bir gece boyunca 37 °C inkübe edilmiştir[3]. Ardından Petri kaplarında üreyen kolonilerden saf kültür eldesi işlemi yapılmıştır. Bunun için tek koloniden alınan bakteri 10 mL'lik sıvı besiyerine (LB) ekim yapılmış ve 100 s boyunca 30±2 °C ve 35±2 °C gibi farklı sıcaklıklarda bakteriler inkübe edilip üremesi sağlanmıştır ve sıcaklığın bakteri büyümesindeki etkisi incelenmiştir. Belli aralıklarla spektrofotometrede (OD600 nm'de) ölçümler yapılarak izolatların optimum olarak büyüdüğü sıcaklıklar belirlenmiştir [30, 38].

4.3.2 *Bacillus* Türüne Besin Ortamının Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun TSB ve LB sıvı besiyerleri kullanılarak bakterilerin büyümesindeki etkisi incelenmiştir. Bunun için tek koloniden alınan bakteri 10 mL'lik sıvı besiyerine TSB ve LB sırasıyla ekim yapılmış ve 30 saat boyunca 25±2°C, 30±2°C ve 35±2°C gibi farklı sıcaklıklarda bakteriler inkübe edilip üremesi sağlanmıştır. Sonuç olarak sıcaklığın ve besin ortamının bakteri büyümesindeki etkisi incelenmiş ve büyüme kinetiği çalışılmıştır. Belirli aralıklarla spektrofotometrede (OD600 nm'de) ölçümler yapılarak *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun TSB ve LB sıvı besiyerlerinde optimum olarak büyüdüğü sıcaklıklar belirlenmiştir [30, 38].

4.3.3 *Bacillus* Türünün Büyüyebildiği pH Aralıklarının Belirlenmesi

B. subtilis ATCC 6633 türünün büyüyebildiği pH aralığının belirlenmesi için bakteri değişik pH değerlerine (pH 3.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) sahip LB ve TSB sıvı besiyerlerine inoküle edildi ve 25, 30 ve 35 ºC'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon neticesinde üreme olup olmadığına belli aralıklarla spektrofotometrede (OD600 nm'de) ölçümler yapılarak belirlenmiştir [30, 38].

4.3.4 İzolatların Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Antibiyotik duyarlılık testi Bauer-Kirby yöntemi kullanılarak uygulanmıştır. Disk difüzyon yöntemi olarak bilinen Kirby-Bauer testi, bir enfeksiyon tedavisinde hangi antibiyotiğin kullanılması gerektiğini belirlemede kullanılan antibiyotik duyarlılık testidir[96]. Antimikrobiyal hassasiyet testleri National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) standartlarında Gram-pozitif aerobik bakteriler kriterlerine uygun olarak, standart disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem standart koşullar altında ölçülen bakteri üremesinin inhibisyonuna dayanır. Bu test için, bir kültür ortamı, özellikle Mueller-Hinton agar, test organizması ile düzgün ve aseptik olarak aşılanıp, daha sonra belirli bir antibiyotik konsantrasyonuna sahip olan filtre kağıdı diskleri besiyerine yerleştirilmiştir [30, 96].

Bu çalışmada, antibiyotiklerden Amoxicillin (AML, 10 µg), Ofloxacin (OFX, 5µg), Chloramphenicol (C, 30 µg) ve Fluconazole (FCA, 25 µg) kullanılmıştır. İzolatlar TSA besiyerinde bir gece inkübasyonun ardından her bir izolatdan steril serum fizyoloji içerisinde bulanıklık değeri 0,5 McFarland yaklaşık olarak 10^8 bakteri/mL olacak şekilde bakteriler hazırlanmıştır. Kültürler, steril bir swab yardımıyla Mueller-Hinton agar yüzeyine ekilmiştir. Ekimden sonra antibiyotik diskleri agar yüzeyi ile temas edecek şekilde yerleştirilerek petri kapları daha sonra gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Değerlendirme, inkübasyondan sonra antibiyotik disklerinin çevresinde oluşan inhibisyon zonları ölçülerek yapılmıştır. Ölçülen zon çapları, NCCLS kitapçığında ilgili tablolardaki değerlerle karşılaştırılarak bakteri, test edilen antibiyotiğe “duyarlı” veya “dirençli” olarak derecelendirilmiştir [96]. Orta hassas duyarlılığa sahip suşlar "orta duyarlı" olarak değerlendirilmiştir. Kontrol bakteri suşu olarak *B. subtilis* ATCC 6633 suşu kullanılmıştır.

4.3.5 İzolatların Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi

Topraktan izole edilen ve identifikasyonları sonucunda *Bacillus* cinsine ait 3 adet izolatın bakteriyosin içerikleri incelenmiştir. İzolatlar LB besiyerinde 37 °C’de 24 saat inkübasyona tabi tutularak üretilmiştir. Ardından üretilen hücreler, 12.000 rpm’de santrifüj edilerek toplanmıştır. Bakteriyosin benzeri inhibitör maddeler içeren hücresiz süpernatant (CFS), 0,45 µm'lik bir filtreden geçirilerek sterilize

edilmiştir. Bakteriyosin içerdiği düşünülen süpernatant kısımları kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Bakteriyel büyüme inhibisyonu, Agar disk difüzyon deneyi ile belirlenmiştir [50]. Antibakteriyel aktivite denemeleri *Listeria monocytogenes, Salmonella typhi, Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* indikatör bakterileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İndikatör bakterilerin agar ortamına 0,5 MacFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonları hazırlandı ve bu süspansiyonlardan steril eküvyon çubuklarıyla TSA besiyeri üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Petri yüzeylerine 6 mm çaplı steril antimikrobiyal diskler yerleştirilmiştir ve 30 µL süpernatant damlatıldıktan sonra, plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir [30].

4.3.6 *Bacillus* Suşlarının Misel Gelişimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

İkili kültür yöntemi ile *Bacillus* izolatlarının antifungal aktivitesi değerlendirilmiştir, 6 mm TSA bakteri diskleri ve 6 mm PDA mantar diskleri 'ikili kültür yöntemi' için kullanılmıştır. Steril Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri ortamı (15 mL plaka^{-1}), mantar mikroorganizmasının önceki kültürlerinden (7 günlük) 6 mm agar delici ile aşılanmıştır. Aynı zamanda, 100 µL'lik *Bacillus*'un 24 saatlik kültüründen 6 mm'lik TSA diskleri, PDA plakaları üzerindeki fungal agar diskinden eşit mesafeye yerleştirilmiştir [38, 97]. PDA plakaları 7 gün boyunca 27 °C'de inkübe edilmiştir. *Colletotrichum gloeosporioides,* ve *Botrytis cinerea* misel büyümesinin *Bacillus* izolatları tarafından inhibisyon oranı mm ve inhibisyon yüzdesi ile ölçülmüştür [38]. Muamele edilen örnekler (M), kontrol örnekleri (K) ile karşılaştırıldığında büyüme engelleme oranı (EO %) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$EO\% = \frac{\mathrm{K} - M}{K} \times 100 \qquad (4.1)$$

4.3.7 İzolatların Oto-aggregasyon Analizi

İzolatların hücre-hücre etkileşimleri, oto-agregasyon testine göre değerlendirilmiştir. LB'de 37 °C'de 20 saat boyunca büyütülmüş probiyotik bakteri hücreleri, santrifüjleme (5.000 g, 20 dk, 4°C) ile toplandı fosfat tamponlu tuzlu su (PBS; pH 7,2) ile optik yoğunluğu OD600 - A0,5 (A0) değerine ayarlanması için yeniden süspanse edilmiştir. Bakteri sayısı (10^6-10^7 KOB / mL) bu şekilde standartlaştırılmıştır. Her bakteri süspansiyonu (8 mL) vortekslendi ve 7 saat 30

°C'de inkübe edilmiştir. Absorbans değerleri 7 saat sonra 600 nm'de ölçülmüştür (At)[98–100].

Oto-agregasyon yeteneği şu şekilde hesaplanmıştır:

$$OA\% = \frac{1-At}{A0} \times 100 \quad (4.2)$$

At: 7. saate ölçülen absorbans değeri

A0: 0. saate ölçülen absorbans değeri

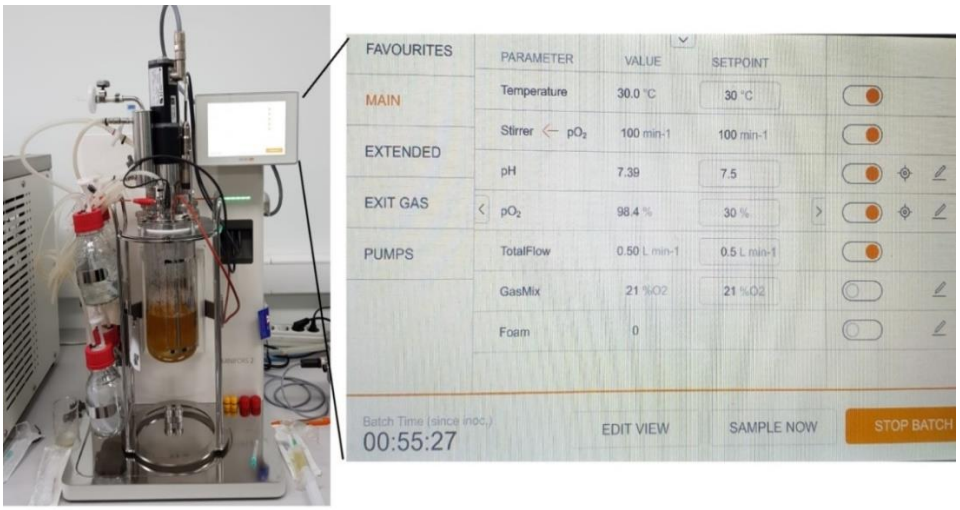
4.4 Probiyotik Bakterilerin Büyük Ölçekte Üretilmesi

4.4.1 Probiyotik Bakterilerin Erlende Üretilmesi

Bacillus spp. izolatlarının erlende üretimi için deney sıcaklığı 30±2 °C olarak ayarlanmıştır. Literatürde bildirilmiş olan önceki çalışmaların 28 ile 37 °C arasındaki sıcaklıklarda yapıldığı gözlenmiştir [101]. Durağan faza ulaştığını belirlemek için bakterilerin optik yoğunluğu, 600 nm'de 2 gün boyunca belli aralıklarda spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. Erlende yetiştirme koşulları olarak 500 mL sıvı ortam (TSB) içeren 1 L Erlenmeyer şişelerinde gerçekleştirilmiştir. Ortam % 1 aşılama oranı ile aşılanmış ve döner çalkalayıcıda (150 rpm) 30 saat süreyle inkübe edilmiştir [30, 38].

4.4.2 Probiyotik Bakterilerin Biyoreaktörde Üretilmesi

Birinci basamakta mikroorganizma TSB sıvı ortamdan, tek koloni eldesi için TSA katı ortama aktarılmış ve 24 saat 37 ˚C'de inkübe edilmiştir, ardından katı ortamdan alınan tek koloni ön-sıvı çoğalma ortamına (TSB) aktarılmış ve benzer şekilde 24 saat 37˚C'de inkübe edilmiştir, son olarak 1/100 aşılama oranı ile üretim ortamının yer aldığı biyoreaktöre ön sıvı kültür aktarılmıştır. Çalışma karıştırmalı biyoreaktörlerde 100-150 rpm karıştırma hızı, 30 °C sıcaklıkta yaklaşık 12 saat süreyle *Bacillus* spp. üretimi gerçekleştirilmiştir. Başlangıç pH değeri 7.38 olan 1000 cm^3 hacımlı biyoreaktör üretim ortamına 1/2 (500 mL) oranında besiyeri (TSB) aktarılmıştır ve pH değeri 7.5'e ayarlanmıştır (Şekil 4.2) [38, 102].



Şekil 4.2 Minifors 2 Biyoreaktör sistemi ve üretim koşulları

Kullanılan biyoreaktör sisteminin (Minifors 2) hazırlanmasında izlenecek adımlar aşağıda sırasıyla anlatılmıştır:

1. Reaktörün pH elektrodu pH=7.0 ve pH=4.0 olan standart tamponlar ile sırasıyla kalibrasyonu yapılıp elektrotlar yerine takılmıştır.

2. pH ve oksijen elektrodunun kabloları elektrotlardan çıkarılır ve sterilizasyon sırasında zarar görmemesi için bağlantılar alüminyum folyo ile kaplanır.

3. Reaktörlerin hava çıkışları açık olmalı ve gaz çıkış soğutucu tarafına filtre takılmalıdır. Asit ve alkali şişeleri asit ve alkali çözeltileri ile doldurulduktan ve reaktörün kolon kısmı sıvı ortam ile doldurulduktan sonra reaktörlere bağlantıları yapılır ve hortumlar kelepçelenir.

4. Reaktör T=121 ºC sıcaklık, P=1.2 atm koşullarında t=15 dk süre ile otoklavlanarak sterilizasyona tabi tutulmuştur.

5. Steril edilen reaktörlerin soğuması için en az 2-3 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra ana üniteye ve kontrol ünitesine bağlantıları yapılmıştır.

6. Biyoreaktörlerin belirlenen çalışma koşullarında (pH, sıcaklık, karıştırma ve hava akış hızı) çalıştırılabilmesi için kontrole istenilen değerler girilerek sıcaklık ve karıştırma hızı regülasyonu aktif hale getirilir.

7. Oksijen elektrotlarını kalibre etmek için biyoreaktör ortamındaki çözünmüş oksijenin doyma değeri %100 doygunluğa ayarlandı. Çoğu durumda tek bir noktada, yani %100 doygunlukta kalibre etmek yeterlidir.

8. Oksijen elektrotları kalibre edildikten sonra, biyoreaktör, ön-sıvı ortamda büyütülen mikroorganizma ile aşılandı.

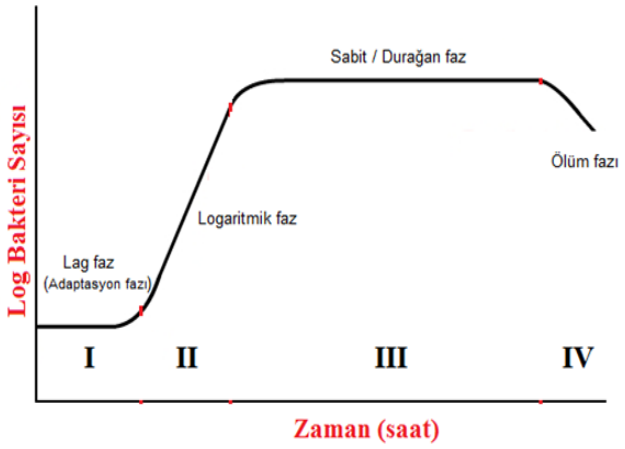
9. İşletim sırasında köpük giderici olarak filtreden geçirilerek steril edilmiş zeytinyağı antifoam olarak gereken miktarda ve köpük oluşması durumunda steril koşullarda sisteme enjekte edilmiştir.

4.4.3 Bakteri Üremesinin Ölçülmesi

Bakteri üremesinin belirlenmesi amacıyla, besiyerinin bulanıklığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bakteri kültürlerinin optik yoğunluk (OD) ölçümü, maksimum hücre büyümesi elde etmek için kullanılan yaygın bir tekniktir. Spektrofotometreler bu ölçümleri yapmak için kullanılır. Optik yoğunluk analizi için PG Instruments T-60 UV Görünür Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Belirtilen saatlerde inkübasyon ortamından örnekler alındı ve 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Kör olarak bakteri aşısı olmayan boş bir ortam kullanılarak bakteri üreme miktarı optik yoğunluk (OD) değerleri okunarak belirlenmiştir [38,101].

4.4.4 Büyüme Kinetiğinin İncelenmesi

Her 1 saatte bir numunelerin, 600 nm'de optik yoğunluğun (OD600) ölçülmesiyle hücre büyümesi izlenmiştir. Büyüme eğrisi belirlendiğinde ve bakteriler durağan faza ulaştığında sporlandırma işleminden sonra bakteriler santrifüjleme ile toplanmıştır (Şekil 4.3) [40].



Şekil 4. 3 Mikroorganizma Büyüme Eğrisi

Buna ek olarak büyüme kinetiğinden oluşturulan regresyon formülünden faydalanarak koloni oluşturan birimler (KOB) ve bakterilerin iki katına çıkma süresi (t_d) hesaplanmıştır (Formül 2 ve 3).

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu X \tag{4.3}$$

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \tag{4.4}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \tag{4.5}$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \tag{4.6}$$

Burada; t = zaman, X = KOB mL^{-1} t zamanındaki, X_0 = KOB mL^{-1} t_0 zamanındaki, μ = spesifik büyüme hızı (h^{-1}) ve t_d= iki katına çıkma süresi (h), S = sübstrat (mg/L), Ks= sabit (mg/L).

4.4.5 Karbonhidrat Analizi

Bakterilerin üretildiği besiyerindeki toplam karbonhidrat içeriğini belirlemek için fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır. 20 g damıtılmış suya 80 g fenol ilave edilerek fenol % 80 (a / a) olacak şekilde hazırlanmıştır. Karbonhidrat analizinde standart olarak glikoz kullanılmıştır. Standart eğriyi oluşturmak için tüplerde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan glikoz çözeltilerine 0.05 mL fenol ilave edildikten sonra 5 mL H2S04 ilave edilmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra, numunelerin absorbansı spektrofotometre (PG Instruments T60 UV) ile 490 nm'de ölçülmüştür [38].

4.5 Probiyotik İçerikli Sert Yüzey Temizleyicinin Hazırlanması

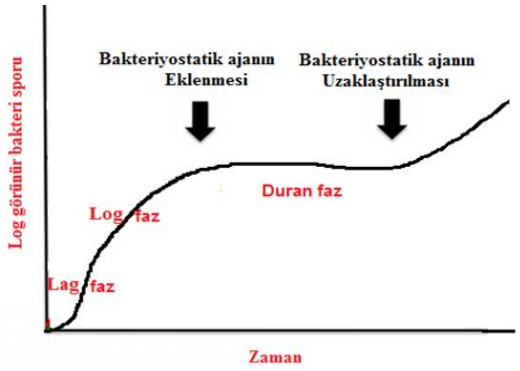
4.5.1 Sürfaktanların *Bacillus* İzolatlarına Karşı Antimikrobiyal Etkisi

Temizleyici formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan sürfaktanların antibakteriyel etkileri kuyucuk ve disk difüzyon yöntemi kullanılarak Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerine karşı tespit edilmiştir. 6 mm çapındaki disk kağıtlarına ve kuyucuklara 30 µL yüzey aktif madde çözeltileri otomotik pipet ile emdirilmiştir. Patojenik ve probiyotik türler için Tryptic soy agar (TSA) besiyeri yüzeyine eküvasyonla yayılan bakteri süspansiyonlarına diskler yerleştirilip veya kuyucuklar (6 mm çapında) steril agar delici ile açılıp 30 µL yüzey aktif madde

çözeltileri emdirildikten sonra 24 saat 37 °C'de inkübasyona brakılmıştır. Yüzey aktif madde konsantrasyonları saf ve formülasyonda kullanılan oranlara göre distile su le hazırlanmıştır. Benzer şekilde, negatif kontrol olarak steril distile su kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında disklerde oluşan inhibisyon zonları okunmuştur [63, 103]. Analizler üç kopya halinde ve ortalama değerler hesaplanarak yapılştır.

4.5.2 Sıvı Kültürlerde Sürfaktanların Bakteriyostatik ve Bakterisit Etkileri

Antimikrobiyal etkisinin yüksek olacağı düşünülen anyonik sürfaktanların (LAS ve SLS) *B. subtilis*'e karşı bakteriyostatik ve bakterisit etkileri sıvı besiyerinde (TSB) belirlenmiştir (Şekil 4.4). *B. subtilis* ile aşılanmış TSB ortamına inkübasyonun yaklaşık 2.nci saatinde (OD=0.5) % 5 ve % 10 konsantrasyonlarda sürfaktanlar ilave edilmiştir. Bunun için; hücre kültürleri TSB'ye aşılandıktan 2 saat sonra yüzey aktif maddeler TSB büyüme ortamına ilave edildikten sonra 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilip 1 saatlik aralıklarla spektrofometre ile absorbansı ölçülerek büyüme oranındaki değişimler gözlenmiştir. Büyüme deneyleri, 10 mL yeni aşılanmış TSB büyüme ortamı ve farklı konsantrasyonlarda (% 5 ve 10) LAS, SLS ve sitrik asit içeren steril 50 mL'lik tüp içinde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon 37 °C'de bir döner çalkalayıcı (150 rpm) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Numunelerin optik değeri UV-Vis spektrofotometre ile düzenli aralıklarla ölçülmüştür [63].



Şekil 4. 4 Bakteriyostatik ajanın etkisinin şematik gösterimi

4.5.3 Probiyotik İçerikli Sert Yüzey Temizleyicinin Formülasyonu

Kullanılan probiyotik bazlı çözelti %1 iyonik olmayan ve %1 amfoterik yüzey aktif madde ve % 1 spor (6×10^7 KOB / ml) probiyotik bakteri (*Bacillus* spp) içermektedir (Şekil 4.5). Probiyotik bazlı yüzey temizleyici ayrıca *Bacillus* türüne karşı herhangi bir zararı olmadığı belirlenen katkı maddelerini içermektedir. Bu katkı maddeleri;

parfüm, parfüm çözücü, opaklaştırıcı ve renk koruyucudan oluşmaktadır. Ayrıca koruyucu (biyosit) içeren ve koruyucu içermeyen olmak üzere iki çeşit formülasyon hazırlanmıştır.



Şekil 4. 5 Probiyotik içerikli sert yüzey temizleyicinin hazırlanması

Hazırlanan probiyotik bazlı çözeltiler 4, 20, 27, 35, 40°C gibi farklı sıcaklıklarda inkübe edilerek bakterilerin canlılığı/ stabilitesi gözlenmiştir [6, 30].

4.5.4 Probiyotik Temizleyicideki Spor Sayısının Kantitatif Analizi

Probiyotik içerikli temizleyicilerden 5 mL'lik örnek alınıp oda sıcaklığında 10 dk 5.000 x g'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılıp topak kısmı, 5 mL PBS tamponu içinde yeniden süspanse edilmiştir. Süspansiyon, yukarıda tarif edildiği gibi santrifüj edilmiştir. Ardından yeniden süspansiyon / yıkama prosedürü toplam 3 kez tekrarlanmıştır. Prosedür tamamlandıktan sonra, 0,1 mL her resüspansiyonun 0,9 mL PBS tamponu ile karıştırılmasıyla seri seyreltmeler yapıldı ve seyreltmeler, 10^{-7} değerine ulaşılana kadar tekrarlanmıştır. Daha sonra, her preparasyondan ve seyreltmeden 100 µL'lik bir numune, önceden kurutulmuş Petri plakaları üzerinde yayılmıştır. Plakalar 24 saat 30 °C'de inkübe edilmiştir. Probiyotik temizleyicideki spor sayısı KOB / mL şu şekilde hesaplanmıştır [38, 104].

$$\frac{CFU}{mL} = \frac{CFU \times df}{0.1\ mL} \tag{4.7}$$

KOB: koloni oluşturan birim

df: Seyreltme faktörü

4.6 Probiyotik İçerikli Sert Temizleyicinin Antagonistik Etkisi

4.6.1 Probiyotik İçerikli Sert Yüzey Temizleyicinin Antibakteriyel Etkisi

Çalışmada üretilen mikrobiyal bazlı temizlik ürününün antimikrobiyal aktivitesi EN 1276 testi ile araştırılmıştır. Yaklaşık 10^7 KOB/mL *Bacillus* sporu içeren probiyotik bazlı temizleyiciler, çalışma boyunca seyreltilmeden kullanılmıştır.

%1 *Bacillus* sporları içeren temizleyiciler, *E. coli* indikatör bakterileri kullanılarak test edilmiştir. Çalışmada 1 mL 10^8 KOB/mL *E.coli* ve 1 mL BSA 2 dakika bekletildikten sonra 8 mL mikrobiyal bazlı temizlik ürünü ilave edildikten sonra 5 dk, 1 saat ve 2 saat bekletilmiştir. Bundan sonra, 8 mL nötrleştiriciye 1 mL çalışan bir bakteri *E. coli* solüsyonu ilave edilmiştir. Antiseptiklerin aktivitesini söndürmek için kullanılan nötralize edici solüsyon: 5 gr/L Tween 80 (Himedia) ile Eugonic LT Broth içermektedir. Ardından 5 dakika bekledikten sonra *E.coli* için seçici olan 1 mL MAC besiyeri eklenip 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Solüsyon 5 dakikalık temastan sonra MAC üzerine kaplanmıştır. Geri kazanılan KOB/mL sayısı, sayma yöntemiyle değerlendirilmiştir [105, 106].

4.6.2 Probiyotik İçerikli Sert Yüzey Temizleyicinin Antifungal Etkisi

Ikili kültür yöntemi ile probiyotik içerikli sert yüzey temizleyicinin antifungal aktivitesi değerlendirilmiştir. PDA plakalarının bir yanına 50 µL probiyotik içerikli temizleyici emdirilen antimikrobiyal disk yerleştirilmiştir, diğer yanına ise 6 mm'lik PDA mantar diskleri yerleştirilerek 'ikili kültür yöntemi' ile antifngal etki belirlenmiştir. Steril Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri ortamı (15 mL plaka^{-1}), mantar mikroorganizmasının önceki kültürlerinden (7 günlük) 6 mm agar delici ile alınarak aşılanmıştır. Patates dekstroz agar (PDA) plakaları 7 gün boyunca 27 °C'de inkübe edilmiştir. *Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium oxysporum, Aspergillus niger* ve *Aspergillus brasiliensis* misel büyümesinin probiyotik içerikli sert yüzey temizleyicinin içeriğindeki *Bacillus* sporları tarafından inhibisyon oranı mm ve inhibisyon yüzdesi ile ölçülmüştür. Engelleme oranı (EO %) denklem (4.1) kullanılarak hesaplanmıştır [38, 49, 97].

4.7 Probiyotik İçerikli Yüzey Temizleyicinin Performans Testleri

4.7.1 Probiyotik içerikli sert yüzey temizleyicinin yüzeylerde çimlenmesi

Probiyotik içerikli sert yüzey temizleyicide bulunan *Bacillus* spp. sporlarının kuru cansız yüzeylerde çimlenme kabiliyeti *in vitro* çimlenme deneyleri ile değerlendirilmiştir. Kısaca, 10^7 *Bacillus* spor / mL içeren temizleyici, distile su ile 1.4 : 100 oranında seyreltildi ve kontrollü steril bir yüzeye swab ile yayılarak uygulanmıştır. Çimlenmeden 3, 20 ve 96 saat ve 4 haftaya kadar steril yüzeydeki bakteri hücreleri swab ile toplandı ve 1 mL LB içerisinde süspanse edildi ve 80 ° C'de 15 dakika termal şok uygulandıktan sonra TSA plakalarına yayılmıştır. Bakteriyel büyüme, 37 °C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir [3].

4.7.2 Deterjan Performans Testi için Kir Monitörleri

Kirli test malzemeleri Center For Testmaterials (CFT) Hayat Kimya A.Ş. temin edilmiştir. CFT DM 76 Melamin karo üzerine renkli mısır nişastası, amilaz enzimlerinin performansını ölçmek için standart kirli renkli mısır nişasta karosudur. CFT DM 77 Melamin karo üzerine renkli karışık (mısır/pirinç) nişastası, amilaz enzimlerinin performansını ölçmek için standart kirli renkli karışık (mısır/pirinç) nişasta karosudur. CFT DM 78 Melamin karo üzerine renkli pirinç nişastası, Amilaz enzimlerinin performansını ölçmek için standart kirli renkli pirinç nişasta karosu. CFT karoların bazıları sert yüzey temizleme testlerinde de kullanılabilir. Endüstriyel standartlar çok fazla ev içi kirlenmeyi öngörmektedir [107]. Sporların ve spor içeren temizleyicinin temizleme performansını belirlemek için, 1'nci, 7'nci ve 14'üncü günlerde 50 µL ticari sporlar, üretilen *Bacillus* spp., ve % 1 probiyotik içeren sert yüzey temizleyici ve probiyotiksiz kontrol temizleyicileri yüklü melamin karo üzerine damlatılarak temzileme performansına bakılmıştır.

4.8 Merkezi kompozit tasarımı

Merkezi Kompozit Tasarım, *B. subtilis* ATCC 6633'ün büyümesi üzerinde pozitif etkisi olan anlamlı değişkenler arasındaki etkileşimi ve optimum seviyeyi belirlemek için kullanılmıştır. Merkezi Kompozit Tasarım kullanılarak

optimizasyon için sıcaklık (A) ve pH (B) değişkenleri seçilmiştir. Her faktör deney düzeyinde -1, 0, +1 olarak incelenmiştir. Optik yoğunluk analizi için PG Instruments T-60 UV Görünür Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Bakterilerin optik yoğunluğu, 600 nm'de 24 saat inkübasyonun ardından ölçülmüştür[38, 108].

4.9 Istatistiksel Analiz

Kültür koşullarının optimizasyonu için istatistiksel parametreleri değerlendirmek için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık kriteri olarak <0.05 olasılık anlamlı olarak kabul edilmiştir. *İn vitro* analizlerden elde edilen veriler, 3 faktörlü varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizleri JMP (release 6.0.0) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Student's *t* karşılaştırma testi ile tespit edilen ortalamalar arasındaki asgari önemdeki farklara (AÖF) göre belirlenmiştir.

5
DENEYSEL BULGULAR VE SONUÇLAR

5.1 Bakterilerin Topraktan İzolasyonu ve Morfolojik İdentifikasyonu

5.1.1 Örneklerin Topraktan İzolasyonu

Bu çalışmada topraklardan alınan örneklerden 3 adet Gram pozitif basil izole edilmiştir. Yapılan Gram ve spor boyama deneyleri ile bu bakterilerin Gram pozitif, spor oluşturabilen basil şeklinde bakteriler olduğu gözlemlenmiştir. İzole edilen bakteriler TSA besiyerinde çizgi ekim yöntemiyle üretildikten sonra, diğer çalışmalarda kullanılmak üzere gliserol stokları yapılmış ve bundan sonraki çalışmalarda bu stoklar kullanılmıştır.

5.1.2 Gram-pozitif Basillerin Morfolojik Özellikleri

Gram-pozitif basillerin morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyonu için bakteriler sıvı besiyerlerine inoküle edildikten sonra 20 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İzolatlar hücre şekli, koloni görünümü (şekli, büyüklüğü, yüzey düzgünlüğü, mat ve parlaklık durumu, vb), endospor oluşumu yönünden analiz edilmiştir (Tablo 5.1).

Tablo 5. 1 Tanımlanan Gram-pozitif basillerin morfolojik özellikleri

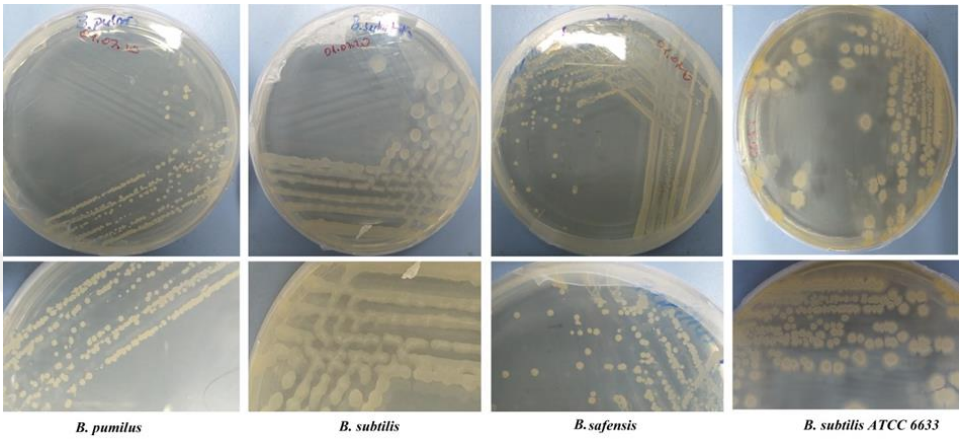
İzolat-Suş	Koloni rengi	Koloni Tipi	Koloni Büyüklüğü	Gram boyama	Spor
B. subtilis	Krem	M	Büyük	+	+
B. pumilis	Krem	D	Küçük	+	+
B. safensis	Krem	D	Küçük	+	+
B. subtilis **ATCC 6633**	Krem	P	Büyük	+	+

P: Pürtüklü, M: Mukoid, D: Düz, +: Pozitif, -:Negatif

Gram pozitif basiller morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile TSB sıvı ve TSA katı besiyerilerine ekimleri yapılmış ve Gram boyama, spor boyama, agarda

koloni tipi, koloni rengi, koloni büyüklüğü, LB ve TSB sıvı büyüme ortamı içerisinde üreme özellikleri gibi çeşitli morfolojik özellikleri tespit edilmiştir (Tablo 5.1, Şekil 5.1). Elde edilen bu veriler tür analizlerinde kullanılmıştır.

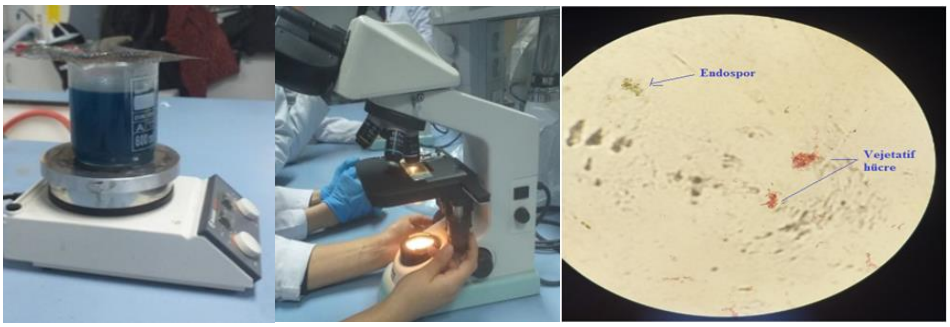
Mikroorganizma gelişimini etkileyen fiziksel etkenlerden sıcaklık (25-35 °C), pH (3-8) etkilerini ve besin ortamını araştırmak için koloniler ayrı ayrı 10 mL'lik LB ve TSB besiyerlerine inoküle edilerek 30 saat inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 5. 1 *Bacillus* suş-izolatlarının agardaki koloni görüntüsü

5.1.3 Gram-pozitif Basillerin Sporlandırılması ve Spor Sayısının Belirlenmesi

Üretilen bakteriler 15 dakika 80 °C sıcaklığa maruz bırakılıp sporlanması sağlanmıştır ve spor boyama yapılıp mikroskop altında sporlanmanın başarısı değerlendirilmiştir (Şekil 5.2). Spread plate yayma yöntemi ile sporlanmadan önce ve sporlandıktan sonra koloni oluşturan birimler sayılmıştır. Sporlandırıldıktan sonra 12000 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek süpernatantı mikrobiyolojik analizler için 0.45 µL lik filtreden geçirilerek +4ºC'da saklanmıştır. Elde edilen pellet ise saf su ile yıkanarak tekrar 12.000 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra kurutulmak için liyofize edilmiştir. Liyofilizasyondan sonra kuru ağırlığı tartılıp diğer çalışmalarda kullanılmak üzere +4 ºC'da saklanmıştır. Schaeffer-Fulton spor boyama yöntemine göre *Bacillus* izolatlarının endospor oluşturabilen basiller şeklinde bakteriler olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5. 2 Schaeffer-Fulton spor boyama yöntemi ve sonuçların gözlenmesi

5.1.4 Seçilen Bakteri İzolatlarının Moleküler Yöntemler ile Tanımlanması

İzolatların moleküler tanımlanması için öncelikle genomik DNA`sı izole edilmiş. Daha sonra, genomik DNA örneğine PZR yöntemi uygulanmıştır. Belirlenen dizinin kromatogramı, genel veritabanında (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) bulunan dizilerle karşılaştırılarak filogenetik olarak en yakın tür seçilmiştir.

GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTG
AACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGA
TGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
CAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
TTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCG
AATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTA

16S rDNA dizisi Clustal Multiple Alignment Programı kullanılarak elde edilen dizi sonuçlarına göre *Bacillus* sp. A suşu %98 oranında **OM327701** *Bacillus subtilis* olarak tanımlanmıştır.

GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTG
AACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGA
TGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGG
CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
TTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGT
AACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA

CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC

16S rDNA dizisi Clustal Multiple Alignment Programı kullanılarak elde edilen dizi sonuçlarına göre *Bacillus* sp. B suşu %98 oranında **OM327702** *Bacillus pumilus* olarak tanımlanmıştır.

AGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCG
GATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCT
GTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAT
GGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
AAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACT
GGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCT
CTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
TAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGC
TTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGA
TCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATG
ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCAAG
ACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGC
AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT

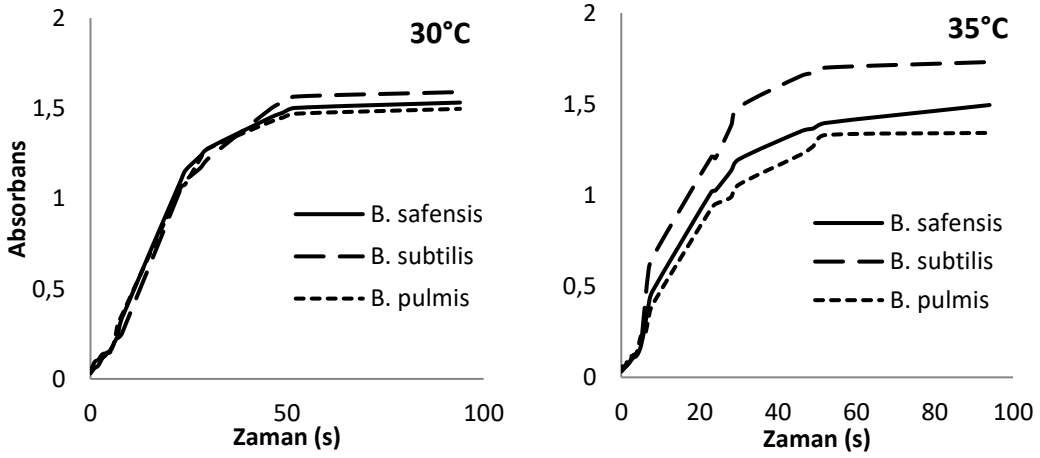
CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
CACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTTACCTTTAT
GGAGCCACGCCGCCCGAAGCGTGGGCCAC

16S rDNA dizisi Clustal Multiple Alignment Programı kullanılarak elde edilen dizi sonuçlarına göre *Bacillus* sp. C suşu %98 oranında **OM327703** *Bacillus safensis* olarak tanımlanmıştır.

5.2 Gram pozitif Basillerin Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

5.2.1 İzolatların Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Topraktan izole edilen *B. subtilis*, *B. safensis* ve *B. pumilus* türlerinin LB sıvı besiyeri kullanılarak 30±2°C ve 35±2°C gibi farklı sıcaklıklarda bakterilerin büyümesindeki etkisi incelenmiştir. Bunun için tek koloniden alınan bakteri 10 mL'lik LB sıvı besiyerine ekim yapılmış ve 4 gün boyunca durağan faza ulaşıncaya kadar 30±2°C ve 35±2°C sıcaklıklarda bakteriler inkübe edilip üremesi sağlanmıştır ve sıcaklığın bakteri büyümesindeki etkisi incelenmiştir (Şekil 5.3). Rowe ve Howard'a göre [109], *B. subtilis*'in 30 °C'de LB besiyerinde büyümesi sonucunda, ilk 5 saat için gecikme fazı kaydedilmiş, bunu 8 saat boyunca üstel büyüme fazını izleyerek $2.60 \times 10^8 \pm 1.17 \times 10^7$ hücre yoğunluğuna ulaştığını belitmiştirler. Şekil 5.3'e göre 30 ºC ve 35 ºC'de üretilen *Bacillus* türlerinin büyüme eğrisine bakıldığında *B. subtilis'*in en yüksek ve *B. pumilus*'in en düşük büyüme gösterdiği görülmüştür.

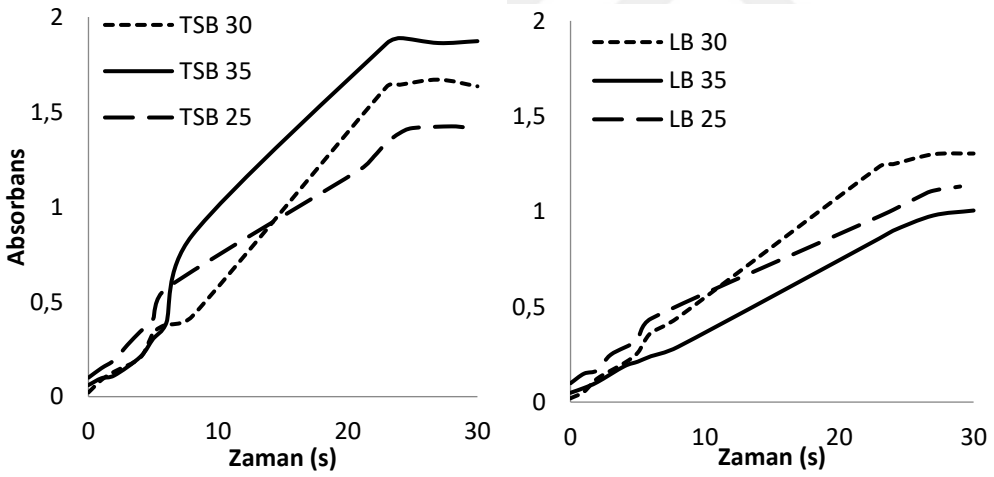


Şekil 5. 3 *Bacillus* izolatlarının 30 ºC ve 35 ºC'de büyüme eğrileri

B. safensis, B. subtilis ve *B. pumilus* türlerinin 30 ºC ve 35 ºC'de inkübasyonu sonucunda büyüme eğrileri incelendiğinde *B. safensis* ve *B. pumilus* türlerinin 30 ºC'de ve *B. subtilis*'in 35 ºC'de daha yüksek büyüme gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 5.3). Her iki sıcaklıkta diğer türlere kıyasla *B. subtilis* daha yüksek büyüme göstermiştir.

5.2.2 *Bacillus* Türüne Besin Ortamının Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada TSB ve LB sıvı besiyerleri kullanılarak *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun büyümesindeki etkisi incelenmiştir. Bunun için tek koloniden alınan bakteri 10 mL'lik sıvı besiyerine (TSB ve LB) ekim yapılmış ve 30 saat boyunca durağan faza ulaşıncaya kadar 25±2°C, 30±2°C ve 35±2°C gibi farklı sıcaklıklarda bakteriler inkübe edilip üremesi sağlanmıştır ve farklı besiyerlerinde sıcaklığın bakteri büyümesindeki etkisi incelenmiş (Şekil 5. 4). Şekil 5. 4'e göre *B. subtilis* ATCC 6633 her bir farklı sıcaklıkta TSB sıvı besiyerinde üretildiğinde LB sıvı besiyerine göre daha yüksek büyüme gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 5. 4 TSB ve LB sıvı besin ortamlarında 25±2°C, 30±2°C ve 35 ±2°C gibi farklı sıcaklıklarda inkübe edilen *B. subtilis* ATCC 6633'ün büyümne eğrisi

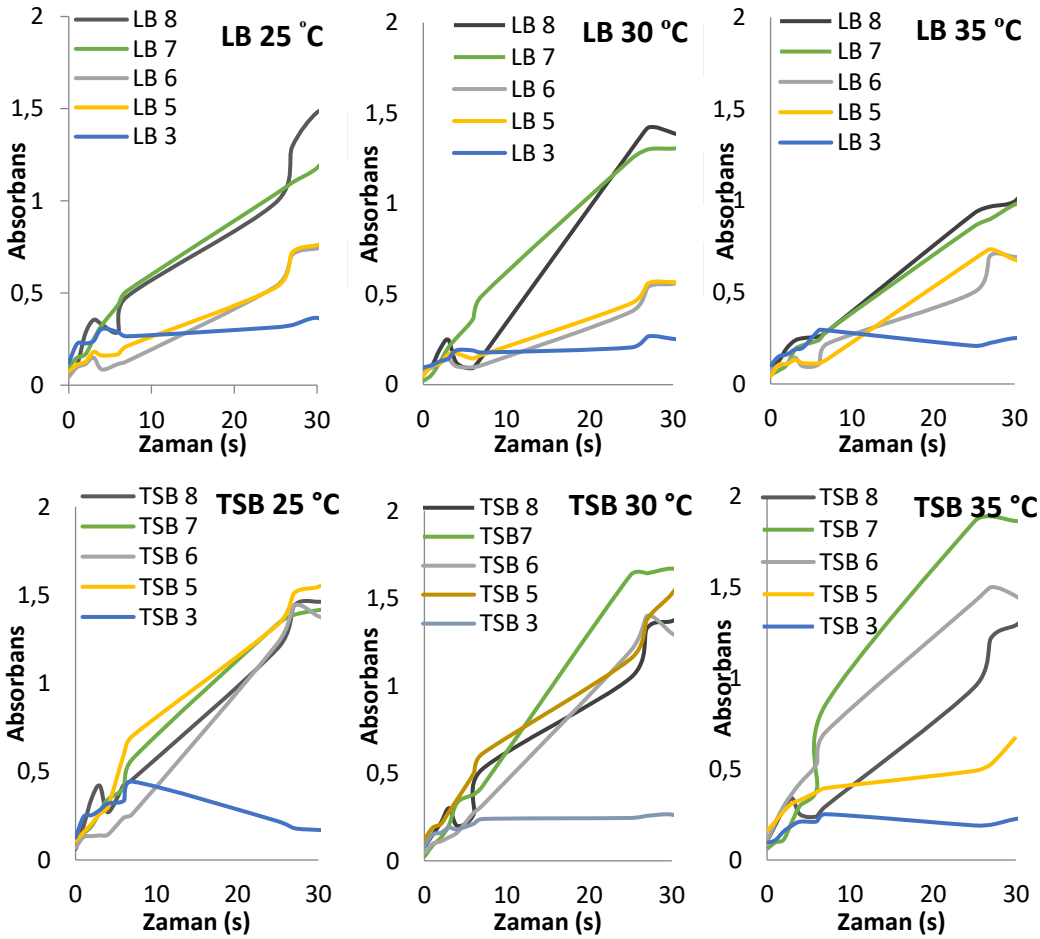
Şekil 5.4'e göre *B. subtilis* ATCC 6633 35±2°C TSB sıvı besiyerinde üretildiğinde diğer sıcaklıklara göre daha yüksek büyüme gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca en düşük büyüme 25±2°C'da gösterdiği görülmüştür. Ancak *B. subtilis* ATCC 6633 35±2°C LB sıvı besiyerinde üretildiğinde diğer sıcaklıklara göre en düşük büyüme gösterdiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak, *B. subtilis* ATCC 6633'ün büyüme eğrisi incelendiğinde *B. subtilis*'in TSB ortamında 35 °C'da inkübe edildiğinde en yüksek büyüme gösterdiği ancak

LB ortamında 35 °C'da inkübe edildiğinde en düşük büyüme gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca TSB ortamında 25±2°C, 30±2°C ve 35±2°C gibi farklı sıcaklıklarda *B. subtilis* inkübe edildiğinde daha yüksek büyüme gösterdiği ancak LB ortamında aynı sıcaklıklarda inkübe edildiğinde TSB'ye kıyasla daha düşük büyüme gösterdiği gözlenmiştir.

5.2.3 *Bacillus* türünün Büyüyebildiği pH Aralıklarının Belirlenmesi

Asidik ve alkali pH'ta hücre büyümesini incelemek için, *B. subtilis* ATCC 6633 hücreleri, LB ve TSB besin ortamında, pH 3.0'ten pH 8.0'e kadar çeşitli pH değerlerinde 25 ºC, 30 ºC ve 35 ºC gibi farklı sıcaklıklarda inkübe edilip büyüme eğrileri elde edilmiştir (Şekil 5.5).

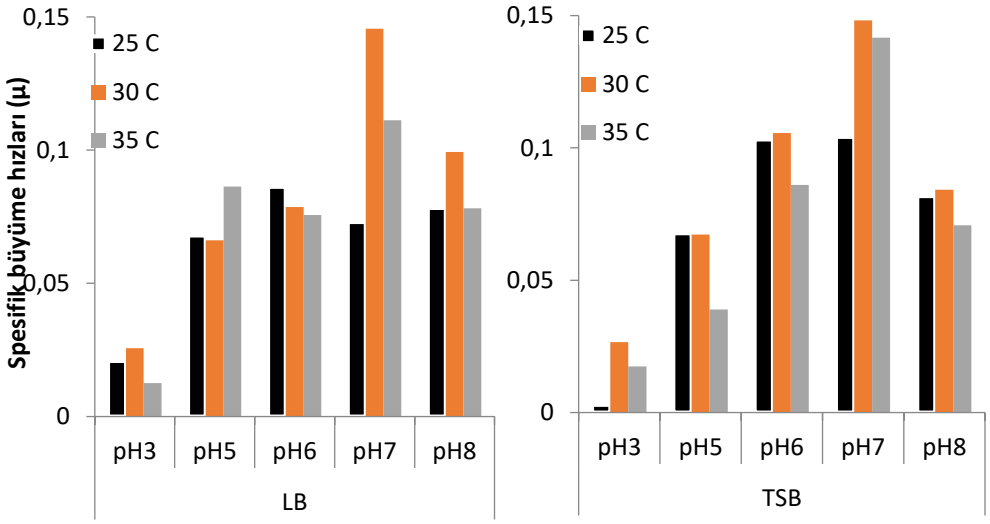


Şekil 5. 5 pH 3.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'de LB ve TSB büyüme ortamındaki farklı sıcaklıklarda inkübe edilen *B. subtilis* ATCC 6633'ün büyüme eğrisi

Hücreler pH 3.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'de büyütüldüğünde, adaptasyon fazının daha uzun sürdüğü ve adaptasyon fazından sonra bazı hücrelerin öldüğü sonradan logaritmik faza geçtiği gözlenmiştir. Hücreler pH 3.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'de

büyütüldüğünde, adaptasyon fazı ilk 4-6 saat boyunca gözlenmiştir. Adaptasyon aşamasından sonra, pH 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0 değerinde büyütülen hücreler büyüme fazına geçerken, pH 3.0 değerinde büyütülen hücreler ölüm fazına geçmiştir (Şekil 5.5).

LB besin ortamında 25 ºC, 30 ºC ve 35 ºC'de en yüksek büyüme pH 7.0 ve 8.0'de en düşük büyüme ise pH 3.0'te gözlenmiştir. Ancak hücreler TSB besin ortamında büyütüldüğünde 25 ºC'da pH 5.0, 6.0, 7.0, ve 8.0'de benzer ve yüksek büyüme gösterirken, 30 ve 35 ºC'da en yüksek büyüme besiyerinin kendi pH değeri olan pH 7.0 değerinde gözlenmiştir. Benzer şekilde TSB besin ortamında en düşük büyüme pH 3.0'te elde edilmiştir.



Şekil 5. 6 Her bir besiyerinde 25, 30 ve 35 ºC sıcaklıklarda pH 3.0 ila pH 8.0 aralığındaki spesifik hücre büyüme hızları (µ).

Spesifik hücre büyüme oranları, farklı pH değerlerinde 10 mL TSB ortamında logaritmik aşamadaki hücre büyüme eğrilerinden belirlenmiştir. Spesifik hücre büyüme hızları ve iki katına çıkma süresi, denklemler (4.5 ve 4.6) kullanılarak hesaplanmıştır.

B. subtilis ATCC 6633'ün, 25, 30 ve 35 ºC sıcaklıkta ve LB ve TSB besiyerinde farklı pH değerlerinde büyütüldüğünde spesifik hücre büyüme hızları µ (4.6) ve iki katına çıkma süreleri $t_{1/2}$ (4.5) formüllerine göre, büyüme evresinin logaritmik fazında OD600 değerleri kullanılarak hesaplanmıştır[40]. Spesifik hücre büyüme hızları (µ), pH 3.0, 5.0, 6.0, 7.0, ve 8.0 aralıklarında 10 mL LB ve TSB besin ortamında logaritmik evredeki hücre büyüme eğrilerinden belirlenmiştir (Şekil 5.6).

Şekil 5.6'a bakıldığında, pH 3.0 dışında diğer tüm pH değerlerinin hücre büyümesi için uygun olduğunu görülmüştür. Her iki besin ortamı değerlendirildiğinde pH 7.0 'de hücre büyüme oranının, pH 5.0, 6.0 ve 8.0'e kıyasla daha yüksek olduğu, ayrıca pH 5.0, 6.0 ve 8.0'deki spesifik büyüme hızlarının daha düşük ve benzer olduğunu gözlenmiştir. En yüksek hücre büyümesi besiyerinin de kendi pH değeri olan pH 7.0'de olduğu gözlenmiştir. Ayrıca her iki besin ortamında en düşük spesifik büyüme hızı pH 3.0'te elde edilmiştir (Tablo 5.2).

Tablo 5. 2 *B. subtilis*'in LB ve TSB ortamında farklı pH ve sıcaklık değerlerinde spesifik hücre büyüme hızları μ (h^{-1}) ve iki katına çıkma süresi $t_{1/2}$ (h).

B. subtilis **büyüme ortamı**	**Sıcaklık** **ºC**	**Spesifik büyüme hızı μ (h^{-1})**		**İki katına çıkma süresi $t_{1/2}$ (h)**	
		LB	**TSB**	**LB**	**TSB**
	25	0.021	0.003	33.0	231
pH 3	30	0.026	0.027	26.6	25.6
	35	0.013	0.017	53.3	40.7
	25	0.068	0.068	10.2	10.2
pH 5	30	0.066	0.067	10.5	10.3
	35	0.070	0.039	09.9	17.7
	25	0.086	0.103	08.1	06.7
pH 6	30	0.079	0.106	08.8	06.5
	35	0.075	0.086	09.2	08.1
	25	0.073	0.104	09.5	06.7
pH 7	30	0.145	0.148	04.8	04.7
	35	0.111	0.142	06.2	04.9
	25	0.078	0.082	08.9	08.5
pH 8	30	0.099	0.084	07.0	08.3
	35	0.078	0.070	08.9	09.9

Wang vd. (2014)[40], pH 7.5-8.5'te *E. coli*'nin, hücre büyüme hızının pH 6.5 ila 7.0'a kıyasla daha düşük olduğunu ve özellikle hücre büyümesinde yaklaşık % 21'lik bir gecikmenin pH 8.5'te olduğunu göstermiştirler.

B. subtilis'in LB ve TSB besin ortamında 25, 30 ve 35 ºC sıcaklıkta ve pH 8.0'de elde edilen spesifik büyüme hızları, pH 5.0'te elde edilen spesifik büyüme hızından daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.6, Tablo 5.2). Örneğin, 30°C LB

ortamında *B.subtilis*'in optik yoğunluk değeri, pH 8.0'de 27. saat için yaklaşık olarak 1.42A, ancak pH 5.0'te 30.saat saat için 0.566A olarak daha düşük değerlerde elde edilmiştir. Ayrıca en yüksek büyüme oranı pH 7.0' de gözlenmiştir.

Farklı sıcaklıklarda yetiştirilen *B.subtilis*'in büyümesinde sıcaklığın etkisi değerlendirildiğinde, 25, 30 ve 35 °C gibi farklı sıcaklıklarda oldukça benzer büyüme profilleri gözlenmiştir. Büyüme ortamı karşılaştırıldığında, TSB ortamında yetişen *B. subtilis*, LB ortamından daha yüksek büyüme göstermiştir (Şekil 5.6). *Bacillus* spp.'nin mide suyunda yaşayabilirliği, önemli bir probiyotik özellik olan düşük pH'ı tolere etme yeteneklerine bağlıdır [110]. Hyronimus vd. [111]; *Bacillus laevolacticus* ve *Bacillus racemilacticus*'un asitli ortamlara tolerans gösterme özellikleri incelenmiş ve sonuç olarak sadece *B. laevolacticus*'un pH 2.5'te önemli bir sağkalım gösterdiği gözlemlenmiştir.

5.2.4 İzolatların Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

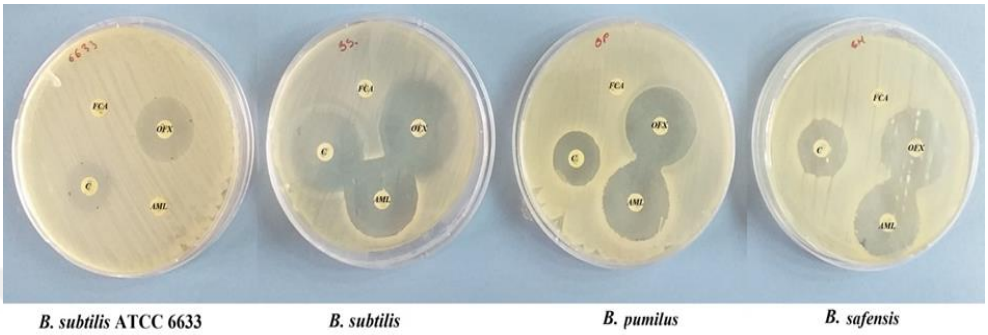
İzolatların direnç profillerini belirlemek amacı ile çeşitli gruplara ait antibiyotikler kullanılmıştır. Antibiyotikler; hücre duvarı ve protein sentezini engelleyerek, hücre membran fonksiyonunu inhibe edenler, DNA/RNA sentezini inhibe ederek etkilerini gösterirler[112]. Tablo 5.3'te *B. subtilis* ATCC 6633, ve *B. subtilis, B. safensis* ve *B. pumilus* izolatlarının Chloramphenicol C30, Amoxicillin AML10, Ofloxacin OFX5, Fluconazole FCA25 antibiyotiklerine karşı inhibisyon zonu (mm) ve NCCLS standat değerleri ile karşılaştırılarak bakteri test edilen antibiyotiğe karşı "duyarlı-S" veya "dirençli-R" olarak değerlendirilmesi gösterilmiştir(Şekil 5.7) [96, 113].

Tablo 5. 3 *B. subtilis* ATCC 6633, *Bacillus* izolatlarının antibiyotiklerine karşı inhibisyon zonu

Probiyotik tür	**İnhibisyon zonu (mm)**							
	C30		**AML10**		**OFX5**		**FCA25**	
B. safensis	20.00±1.41	**S**	26.00±1.41	**S**	27.50±0.70	**S**	0.00±0.00	**R**
B. pumilus	20.00±1.41	**S**	27.00±2.82	**S**	28.00±1.41	**S**	0.00±0.00	**R**
B. subtilis	28.00±2.82	**S**	28.00±1.41	**S**	33.00±2.82	**S**	0.00±0.00	**R**
ATCC6633	15.50±0.70	**I**	0.00±0.00	**R**	22.50±0.70	**S**	0.00±0.00	**R**

Sonuçlar n=3 ± standart sapma olarak verilmiştir.

B. safensis, B. pumilus ve *B. subtilis* türlerinin Chloramphenicol C30, Amoxicillin AML10, Ofloxacin OFX5 antibiyotiklerine karşı duyarlı ve Fluconazole FCA25'e karşı dirençli olduğu gözlenmiştir. *B. subtilis* ATCC 6633 türünün Chloramphenicol C30'a karlı orta, Amoxicillin AML10'a Fluconazole FCA25 antibiyotiklerine karşı dirençli ve Ofloxacin OFX5' e karşı duyarlı olduğu gözlenmiştir.



Şekil 5. 7 *B. subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis, B. pumilus* ve *B. safensis* türlerinin antibiyotik direnci

Flukonazol FCA25, çeşitli mantar ve maya enfeksiyonlarını önlemek ve tedavi etmek için kullanılmaktadır. Azol antifungalleri adı verilen bir ilaç sınıfına aittir. Belirli mantar türlerinin büyümesini durdurarak etki göstermektedir[16]. Çalışmamızda görüldüğü gibi *Bacillus* türü probiyotik bakterilere karşı herhangi bir engelleyici özellik göstermemiştir. Boyiri ve Onyango [37] izolatların (ampisilin, basitrasin, kloramfenikol, eritromisin, kanamisin, penisilin, streptomisin ve tetrasiklin) antibiyotiklere duyarlılığını ölçmüştür. Sonuç olarak, sadece *B. safensis* tüm test antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu gözlenmiştir.

5.2.5 İzolatların Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi

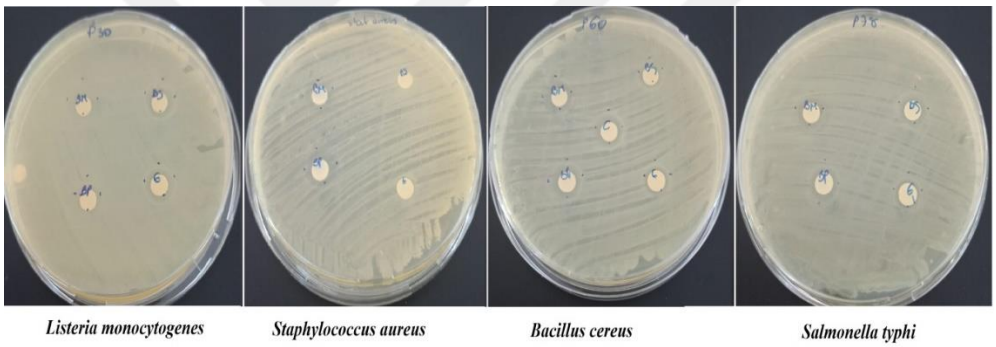
Probiyotikler tarafından üretilen antimikrobiyal peptidler (bakteriyosinler) geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite göstermektedir[30, 42]. Önceki araştırmalarda, antimikrobiyal peptitlerin oksidatif strese neden olduğu, bu sayede hücre zarının bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir. Hücre zarının oksidasyonu; lipitler ve steroller de geçirgenliğe yol açabilmektedir[76]. Topraktan izole edilen ve tanımlanan *Bacillus* cinsine ait *Bacillus subtilis, Bacillus safensis* ve *Bacillus pumilus* izolatlarının ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 türünün bakteriyosin içerikleri *Listeria monocytogenes, Salmonella typhi, Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* indikatör bakterileri kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 5.4).

İzolatlar LB besiyerinde 37 °C'de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Ardından hücreler, 12.000 rpm'de santrifüj edilerek toplanmıştır. Bakteriyosin içerdiği düşünülen süpernatant kısımları antibakteriyal aktivite denemeleri için indikatör bakterilerine karşı bakteriyosin etkisi için kullanılmıştır.

Tablo 5.4 *Bacillus* türlerinin farklı bakteri suşlarına karşı inhibisyon bölgesinin boyutu (mm)

Türler	*Listeria monocytogenes*	*Salmonella typhi*	*Bacillus cereus*	*Staphylococcus aureus*
B. subtilis	10.00 ± 1.41	10.00 ± 0.70	09.00 ± 0.00	07.00 ± 0.70
B. pumilus	10.50 ± 1.41	11.00 ± 0.70	11.50 ± 0.00	11.75 ± 1.06
B. safensis	12.00 ± 0.00	10.75 ± 0.35	10.50 ± 1.41	11.00 ± 0.00
ATCC 6633	09.75 ± 1.06	09.00 ± 0.00	08.50 ± 0.70	07.00 ± 0.00

* Veriler ortalama ± standart sapma (n=3) olarak sunulmuştur.



Şekil 5. 8 *B. subtilis, B. safensis* ve *B. pumilus* izolatlarının ve *B. subtilis* ATCC 6633 türlerinin bakteriyosin aktivitesi

Şekil 5.8'e göre topraktan izole edilen ve tanımlanan *Bacillus* cinsine ait *Bacillus subtilis, Bacillus safensis* ve *Bacillus pumilus* izolatlarının ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 türünün patojenik türlerine karşı inhinisyon oranı Tablo 5.4'te verilmiştir.

Yararlı mikroorganizmaların yüzeyde kolonize olabilmesi için diğer mikroorganizmalar ve funguslarla rekabet etmesi gerekmektedir. *Bacillus* suşu, kolonileşerek ve antibiyotik üreterek hem patojenik türlerle hem de habitattaki diğer türlerle güçlü bir rekabet gücüne sahiptir[114–116].

Kumar vd. [117], topraktan izole ettikleri *B. subtilis* MTCC8114 suşunun 37 °Cde 120 rpm'de süreklı karıştırmalı inkübasyonunun statik duruma oranla daha fazla

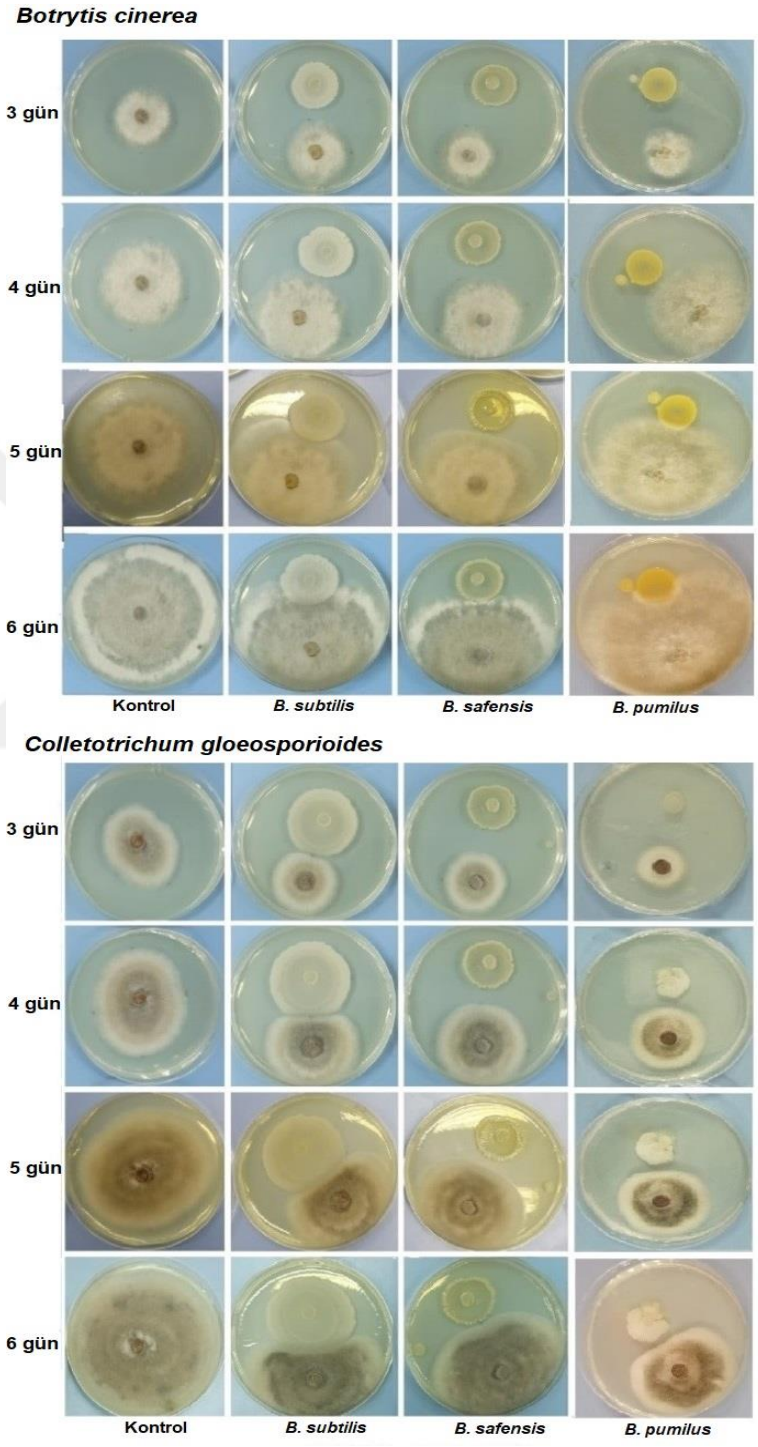
antibiyotik ürettiği görülmüştür. Sonuç olarak, pH 7'de ve 37 ºC'de 48 saatlik inkübasyonu sonucunda optimum antibiyotik üretimini gerçekleştirdiklerini bildirmiştirler. Lertcanawanichakul ve Sawangnop [118]; *Bacillus* türlerinin 72 saat inkübasyondan sonra inhibe edici aktivite sergilediğini ve 5. güne kadar kaldığını ve *S. aureus*'un *E. coli*'den daha duyarlı olduğunu gözlemlediler.

5.2.6 *Bacillus* spp. Misel Gelişimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Bacillus, peptit ve lipopeptit antibiyotikler ve bakteriyosinler dahil olmak üzere çeşitli antimikrobiyal ajanlar üretmektedir [119]. *Bacillus* bakteriyosinleri, genel olarak daha geniş inhibitör spektrumları nedeniyle daha değerli hale gelmektedir ve bazıları, insanlar için patojen olan Gram-pozitif bakterilere ek olarak Gram-negatif bakteriler, maya, mikroalgler veya mantarlara karşı inhiitör aktivite içerebilir [120]. Mateus vd.,[121] yaptıkları çalışmada *B. safensis*'in stabilitesini ve ayak çürüklüğü hastalığına neden olan *Plenodomus destruens* üzerindeki sınırlı etkisini göstermişlerdir. Yapılan çeşitli biyokontrol çalışmalarında *Bacillus* suşlarının geniş spektrumlu antifungal aktivitelerinin olduğu gösterilmiştir [32, 46]. Mantar hücre duvarı yıkımı, mantar antagonizması ve antifungal biyokontrol stratejisinin önemli bir öğesidir [46].

Rong vd.[122]; çalışmalarında *Bacillus safensis* B21'in *M. oryzae*'ye karşı antifungal aktiviteleri değerlendirilmiştir. *O. fragrans* meyvesinden izole edilen *B. safensis* B21, in vitro ve in vivo olarak *M. oryzae*'ye karşı güçlü antifungal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştirler. Diğer bir çalışmada *B. subtilis'in* antifungal etkisi *Penicillum* ve *Aspergillus* fungusları üzerinde incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, *B. subtilis*'in *Penicillium* üzerinde daha yüksek antifungal aktivite gösterdiği bildirilmiştir [93]. Gajbhiye vd.,[123] araştırması, *B. subtilis*'in pamuk rizosferinden izolasyonuna ve *F. oxysporum*'a karşı bir biyokontrol ajanı olarak değerlendirilmesine dayanmaktadır. *Bacillus* izolatı, *F. oxysporum*'a karşı %38 rekabetçi aktivite gösterdiği ve ikili kültür biyoanalizinde %50'den fazla misel inhibisyonu sergilediği bildirilmiştir. Sera koşullarında yapılan saksı deneyinin sonuçları, *F. oxysporum*'a karşı in vitro antagonizma gösteren *Bacillus* suşlarının etkinliğini ortaya koymaktadır. Chittara vd. [124], tarafından yapılan çalışmada hasat öncesi mısırdan izole edilen *B. subtilis* YM10-20 suşunun ürettiği antifungal bileşiğin *Penicillium roqueforti*'nin spor çimlenmesi ve gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Kumar vd. [117], topraktan izole ettikleri *B. subtilis* MTCC8114

suşunun antifungal etkinliğinin farklı besiyeri içeriği, pH, inkübasyon peryodu, aerasyon ve sıcaklık gibi değişkenlerin etkisi araştırmıştır. Çalışmanın sonucunda Trypticase Soy Broth (TSB) besiyerinde bakterinin antifungal üretimin en yüksek olduğu bildirilmiştir.



Şekil 5.9 *Bacillus* izolatlarının *B. cinerea* ve *C. gloeosporioides* antifungal aktivitesini gösteren "İkili Kültür yöntemi" in vitro inhibisyon testi

Tablo 5.5 *Bacillus* isolatların antifungal aktivitesini *B. cinerea* (B) ve *C. gloeosporioides* (C) in vitro misel engelleme oranları (%)

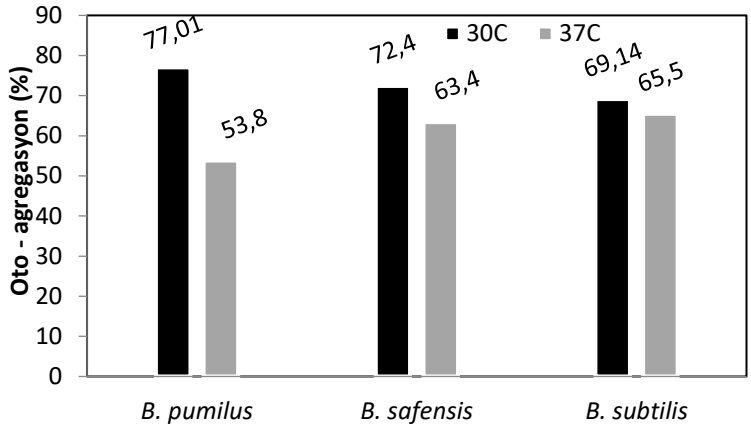
Gün	*B. safensis*		*B. subtilis*		*B. pumilus*	
	% C.	**% B.**	**% C.**	**% B.**	**% C.**	**% B.**
3.	11.9± 1,4	08.1± 0.7	16.0±0.3	01.5±0.7	12.0±0.5	5.0±1.0
4.	16.1±1.7	11.5±0.3	22.5±0.0	03.9±0.7	13.2±0.5	7.5±0.5
5.	19.1± 2.1	18.6± 0.7	27.6±0.3	15.7±0.0	37.1±0.5	13.0±0.5
6.	20.9±1.7	24.7±0.3	31.2±1.0	24.4±0.7	43.5±1.0	20.1±0.7

Veriler ortalama ± standart sapma (n = 3) olarak sunulmuştur. ($p < 0.01$).

Bacillus spp. izolatların antifungal aktivitesi "İkili Kültür yöntemi" ile farklı inkübasyon günlerinde *B. cinerea* ve *C. gloeosporioides* in vitro misel engelleme oranları (%) ölçülerek değerlendirilmiştir. *B. cinerea* ve *C. gloeosporioides* in vitro misel engelleme oranları (%) (4.1) formülüne göre hesaplanmıştır. Tablo 5.5'e göre *B. subtilis* ve *B. pumilus* izolatları *C. gloeosporioides* mantar türüne karşı *B. safensis* türüne kıyasla en yüksek engelleme oranı göstermiştir. *B. cinerea* mantar türüne karşı ise *B. pumilus* izolatı en düşük engelleme oranı göstermiştir. İzolatların *B. cinerea* ve *C. gloeosporioides'*e karşı in vitro misel engelleme oranları (%) karşılaştırıldığında ise tüm izolatlar *C. gloeosporioides'*e karşı daha yüksek engelleme oranı gösterirken *B. cinerea'*ya karşı daha düşük engelleme oranı sergilemiştir (Şekil 5.9).

5.2.7 İzolatların Otoagregasyon analizi

Faydalı etkilerini ortaya çıkarmak için, probiyotik bakterilerin toplanarak yeterli bir kütle elde etmeleri gerekmektedir[100]. Kendiliğinden toplanma kabiliyeti, bakterilerin biyotik ve abiyotik yüzeylere ilk bağlanmasıyla doğrudan ilişkilidir. Bakteriyel hücrelerin kendi kendine toplanma yetenekleri, türe göre değişiklik göstermiştir. Probiyotik türlerin antimikrobiyal aktiviteleri için önerilen mekanizmalar, yapışma bölgeleri ve besin maddeleri için patojenlerle rekabeti ve patojenik büyümeyi önleyen bileşiklerin üretilmesini, patojenlerin rekabetçi olarak dışlanmasını içermektedir [98].



Şekil 5. 10 30 ve 37 °C LB besin ortamında inkübe edilen *B. pumilus, B. safensis* ve *B.subtilis*'in otomatik toplanma yetenekleri (%) (n=3)

Hücreler arasındaki bağlanma kabiliyetinden sorumlu olan otomatik toplama kabiliyeti sıcaklık, ozmolalite ve asidik koşullara göre değişmektedir [98]. Çalışmamızda bakteriyel hücrelerin kendi kendine toplanma yetenekleri, inkübasyon sıcaklığına göre değişiklik göstermiştir. En yüksek otomatik toplanma yetenekleri, sırasıyla 30 °C LB ortamında inkübe edilen *B. pumilus* (% 77.01), *B. safensis* (% 72.40) ve *B. subtilis*'te (% 69.14) gözlenmiştir. Ancak 37 °C LB ortamında inkübe edilen *B. pumilus* (% 53.80), *B. safensis* (% 63.40) ve *B. subtilis*'in (% 65.50) sırasıyla daha düşük otomatik toplanma yetenekleri sergilediği gözlenmiştir. Bu gözlem, bakteri inkübasyonu için kullanılan sıcaklığın, hücre yüzeyi özelliğini değerlendirirken dikkate alınması gereken bir özellik olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, probiyotiklerin toplanabilmesi, faydalı etkilerini ortaya çıkarmak için istenen bir özelliktir (Şekil 5.10).

Collado vd. [100]; yaptıkları çalışmada patojenik ve probiyotik türleri 20 ve 37 °C'de 4 saat inkübe ettikten sonra oto-agregasyon yüzdelerini hesaplamıştırlar. Raporladıkları sonuçlara göre bakteriler 20 °C'de inkübe edildiklerinde daha yüksek oto-agregasyon özelliği sergilemiştirler. Benzer şekilde çalışmamızda probiyotik *Bacillus* türleri 30 ve 37°C'de inkübe edilmiştir ve 30 °C'de inkübe edilen türlerde daha yüksek oto-agregasyon yüzdesi elde edilmiştir. Ritter vd. [110]; probiyotik *Bacillus* izolatları ile yaptıkları çalışmada oto-agregasyonu % 52.9 olarak raporlamıştırlar. Nithya ve Halami, [125] yaptıkları çalışmada; gıdalardan izole edilen, *Bacillus* spp. otomatik toplama özelliğini % 70-100 arasında değişen değerler ile tanımlanmıştır. Jeon vd. [126], 4 saatlik

inkübasyondan sonra izolatların oto-agregasyon kabiliyetini değerlendirdi, *B. clausii* ATCC 700160 ve *B. subtilis* P223, sırasıyla % 85.10 ± 1.56 ve % 88.13 ± 3.55 oranında oto-agregasyon yetenekleri göstermiştir. Algburi vd. [127]; 24 saatlik inkübasyondan sonra *Bacillus* izolatlarının oto-agregasyon kabiliyetini değerlendirdi, *B. subtilis* KATMIRA1933 ve *B. amyloliquefaciens* sırasıyla % 59.50 ve % 89.50 oto-agregasyon yetenekleri sergilediği gözlenmiştir.

5.3 Merkezi Kompozit Tasarım Sonuçları

Merkezi Kompozit Tasarım, birkaç bağımsız değişkenin sistem yanıtı üzerindeki etkilerini analiz etmek için yararlı olan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir kombinasyonudur. Bu bağlamda, bakterilerin büyümesi için en iyi sonuçları elde etmek için, ortamın büyüme koşulları, Merkezi Kompozit Tasarım yardımıyla farklı kültür koşulları kullanılarak optimize edilmiştir. Modeli geliştirmek için sıcaklık ve pH parametreleri kullanılmıştır. Her bir parametre için belirtilen kodlar ve *B.subtilis* ATCC 6633 üretimi için hücre yoğunluğunu modellemek için kullanılan parametre aralığı Tablo 5.6 ve 5.7'de verilmiştir.

Tablo 5. 6 Deneysel tasarım ve merkezi kompozit tasarım sonuçları

Std	Çalıştırmak	Faktör 1		Faktör 2		Cevap 1
		A:A	˚C	B:B	pH	OD(600nm)
6	1	1	35	0	7	0.859
11	2	0	30	0	7	1.136
5	3	-1	25	0	7	0.945
10	4	0	30	0	7	1.134
1	5	-1	25	-1	6	0.536
4	6	1	35	1	8	0.93
9	7	0	30	0	7	1.136
7	8	0	30	-1	6	0.54
2	9	1	35	-1	6	0.5
3	10	-1	25	1	8	0.99
8	11	0	30	1	8	1.1

Bakteriyel büyüme için her bir faktörün optimum seviyesini belirlemek için sıcaklık (A) ve pH (B) değişkenleri seçilmiştir. Sıcaklık 25-35 ° C ve pH 6-8 aralığında kullanılarak üretilen B.subtilis ATCC 6633 kültürlerin 30 saat inkübasyonu sonucunda optik yoğunluk (OD600nm) ölçümleri yapılarak maksimum büyüme elde etmek için kullanılması gereken optimum sıcaklık ve pH değişkenleri tasarım matrisi kullanılarak belirlenmiştir. Test edilen değişkenlerin tasarım matrisi deneysel sonuçları Tablo 5.6, 5.7 ve 5.8'da gösterilmektedir.

Farklı sıcaklık 25-35 °C ve pH 6-8 değerleri kullanılarak üretilen *B.subtilis* ATCC6633 kültürlerin 30 saat inkübasyonu sonucunda maksimum büyüme elde etmek için kullanılması gereken optimum sıcaklık ve pH değişkenleri tasarım matrisi kullanılarak belirlenmiştir.

Tablo 5. 7 *B. subtilis* üretimini modellemek için kullanılan parametrelerin aralığı ve her parametre için belirtilen kodlar

Adı	Birim	Çeşit	Değişim	Standart sapma		Düşük		Yüksek	
A	˚C	Factor	Easy	0	30	-1	25	1	35
B	pH	Factor	Easy	0	7	-1	6	1	8
R1	OD(600nm)	Response		0.06289		0.5		1.136	

Tablo 5. 8 Uyum İstatistikleri

Standart sapma	**0.0677**	**R²**	**0.9691**
Ortalama	0.9005	Ayarlanmış R²	0.9382
C.V. %	7.52	Tahmini R²	0.7612
		Adeq Hassasiyeti	14.1823

Tahmini R^2=0.7612, Düzeltilmiş (Ayarlanmış) R^2=0.9382 ile uyum içinde olduğu; yani fark 0.2'den küçük olduğu gözlenmiştir. Bu model tasarımının kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Düzeltilmiş belirleme katsayısının değeri (R^2ayarlanmış = 0.9382) modelin önemini gösterecek kadar yüksek elde edilmiştir [108]. Her iki faktörün (sıcaklık ve pH) anlamlı olduğu bulunmuştur.

Tablo 5. 9 İkinci dereceden model için ANOVA değerleri

Kaynak	Kareler toplamı	df	Ortalama karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	0.620	5	0.124	31.36	0.0009	anlamlı
Kalan	0.019	5	0.0039			
Uyum Eksikliği	0.0198	3	0.0066	4944.68	0.0002	anlamlı
Kor toplamı	0.6401	10				

Model F değeri: 31.36, modelin anlamlı olduğunu ifade etmektedir. 0.0500'den küçük P değerleri, model terimlerinin anlamlı olduğunu göstermektedir. Bu

durumda B, A^2, B^2 önemli model terimleridir. Fit (uyum) Eksikliği F Değeri: 4944.68, Fit Eksikliğinin anlamlı olduğunu göstermektedir. Tespit katsayısı (R2) 0.9691 olarak hesaplanmış ve uyumlu bulunmuştur (Tablo 5.9).

Deneysel sonuçlar, hangi faktörlerin en etkili etkileşimler olduğunu ve hangilerinin hücre büyümesini arttırmada en etkili olduğunu bulmak için varyans analizi (ANOVA) tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Tablo 5.9 'daki ANOVA değerlerine göre modelin f değeri 31.36 olarak bulunmuştur ki bu modelin anlamlı olduğu anlamına gelmektedir. Buna ek olarak p değeri 0,0009 olup 0,0500'den küçüktür ve bu da model terimlerinin anlamlı olduğunu gösterir. *B. subtilis* üretimini tahmin etmek ve biyokütle verimini etkileyen deneysel parametreleri incelemek için aşağıdaki bir regresyon denklemi elde edilmiştir.

$$Y_{büyüme} = 1.10 - 0.0303\text{A} + 0.2407\text{B} - 0.0060\text{AB} - 0.1532A^2 - 0.2352B^2 \qquad (6.1)$$

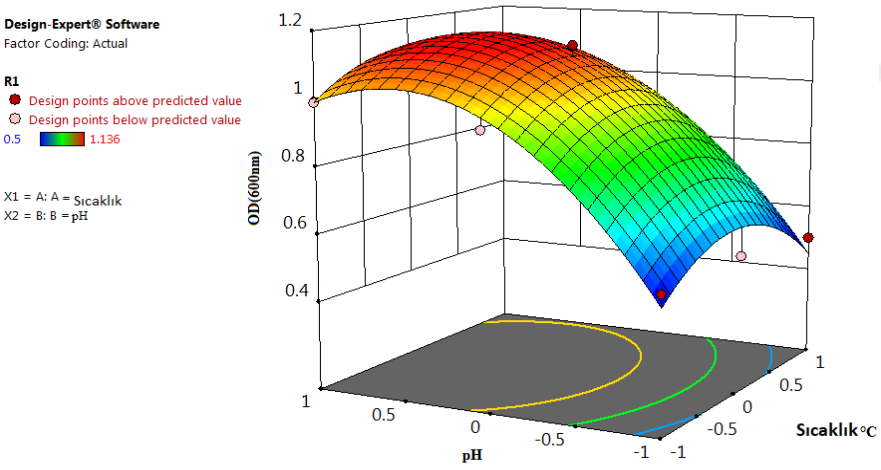
Yukarıda verilen regresyon denkleminden pH katsayısının sıcaklıktan yüksek olduğu görülebileceği gibi, *B. subtilis* üretimine etkisinin en güçlü olduğu da belirtilebilir. Ayrıca *B. subtilis* üretiminin pH artışından olumlu etkilendiği not edilebilir. Öte yandan sıcaklık artışı *B. subtilis* üretimini ters yönde etkilemiştir. AB'nin etkileşimli etkisi çok küçük bir katsayı değerine sahiptir. Ancak, kare katsayılarının bireysel etkilerin katsayısı kadar yüksek olduğuna dikkat edilmelidir. pH'ın *B. subtilis* üretimini olumlu yönde etkilerken, pH karesinin olumsuz yönde etkilendiği, yani bu parametrenin daha fazla artmasının *B. subtilis* üretiminde azalmaya neden olacağı görülmüştür.

Tablo 5. 10 Kodlanmış Faktörel Katsayılar

Faktör	Tahmini katsayılar	df	Standart Hata
	1.10	1	0.0323
A-A	-0.0303	1	0.0257
B-B	0.2407	1	0.0257
AB	-0.0060	1	0.0314
A^2	-0.1532	1	0.0395
B^2	-0.2352	1	0.0395

Hangi faktörlerin en etkili etkileşimlere ve aynı zamanda hücre büyümesinin arttırılmasında hangilerinin en etkili olduğunu bulmak için varyans analizi (ANOVA) tekniği kullanılarak deneysel sonuçlar analiz edilmiştir (Tablo 5.10).

3D grafik (Şekil 5.11), seçilen iki faktör arasındaki etkileşim için görsel bir yorum sağlar ve böylece *B.subtilis*'in maksimum hücre büyümesi için her değişkenin optimum seviyelerinin belirlenmesini sağlamaktadır. Dışbükey form ve kırmızı noktaların alan dışında olması seviyelerin iyi seçildiğini ifade etmektedir.



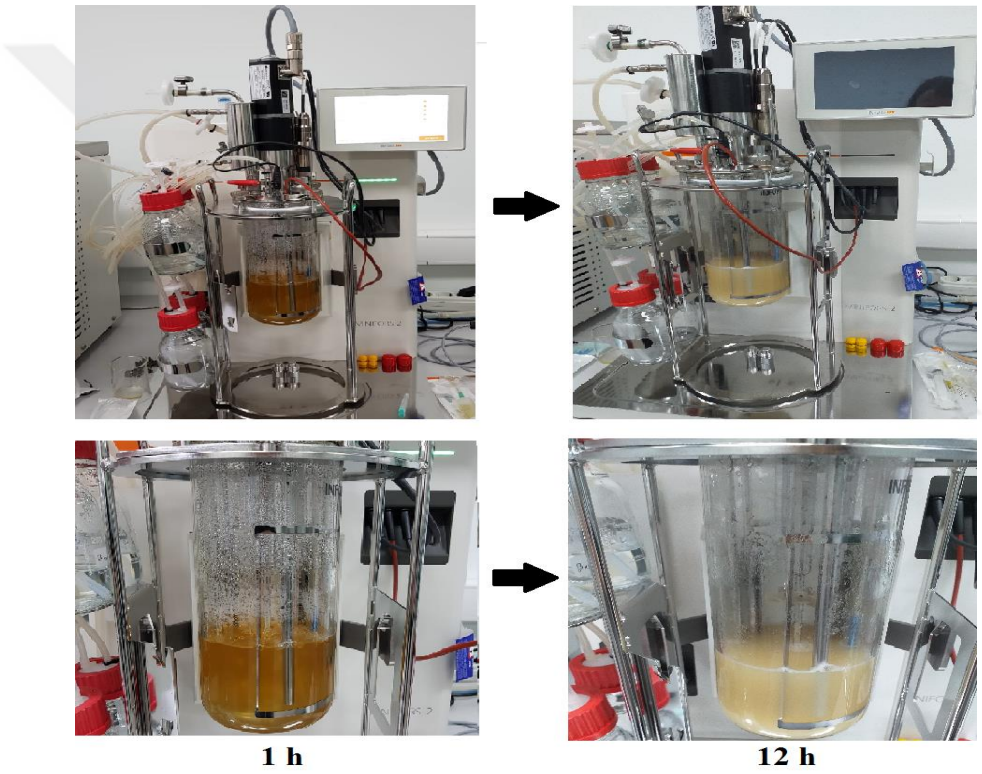
Şekil 5. 11 *B. subtilis* büyümesi için sıcaklık ve pH değerinin etkilerini gösteren üç boyutlu tepki yüzey grafikleri

*B. subtilis'*in üç boyutlu grafik incelenmesi (OD600 = 1.1) sonucunda, sıcaklık 29.5 ° C'ye ve pH 7.5'e ayarlandığında büyümenin arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak *B.subtilis* ATCC 6633 türü büyük ölçekte üretime alındığında Merkezi Kompozit Tasarım sonuçları göz önüne alınarak optimum sıcaklık 29.5 °C'ye ve pH 7.5'e ayarlanarak maksimum büyüme hızına ulaşılacağı düşünülmektedir. *B. subtilis* KC3, 33°C civarında bir optimum büyüme sıcaklığına sahiptir [128].

5.4 Probiyotik Bakterilerin Büyük Ölçekte Üretilmesi

5.4.1 *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun biyoreaktör sisteminde üretimi

Biyoreaktörde 100-150 dk^{-1} karıştırma hızı, 30°C sıcaklıkta yaklaşık 12 saat süreyle *B. subtilis* ATCC 6633 üretimi gerçekleştirilmiştir. Başlangıç pH değeri pH 7.38 olan 1000 cm^3 hacımlı biyoreaktör üretim ortamına 1/2 (500 mL) oranında besiyeri (TSB) aktarılmıştır ve pH değeri 7.5'e ayarlanmıştır. Çalışmada kullanılan biyoreaktör, pH, karıştırma hızı, çözünmüş oksijen ve sıcaklık kontrollü kesikli biyoreaktör sistemidir (Şekil 5.12).



Şekil 5. 12 Biyoreaktör sisteminde *B. subtilis*'in 1 ve 12 saateki görüntüsü

Bu kapsamda, 0.5 dm^3 çalışma hacımlı biyoreaktörde, toplam akış hızı = 0.5 L/dk, pHo 7.50 koşullarında çözünmüş oksijen, hücre, glukoz, ürün derişimleri ile oksijen aktarımı etkisi araştırılmıştır. Proses süresince pH değerleri gözlenmiş ve hücre derişiminin hızla arttığı ve pH'ın düştüğü gözlenmiştir (Tablo 5.11).

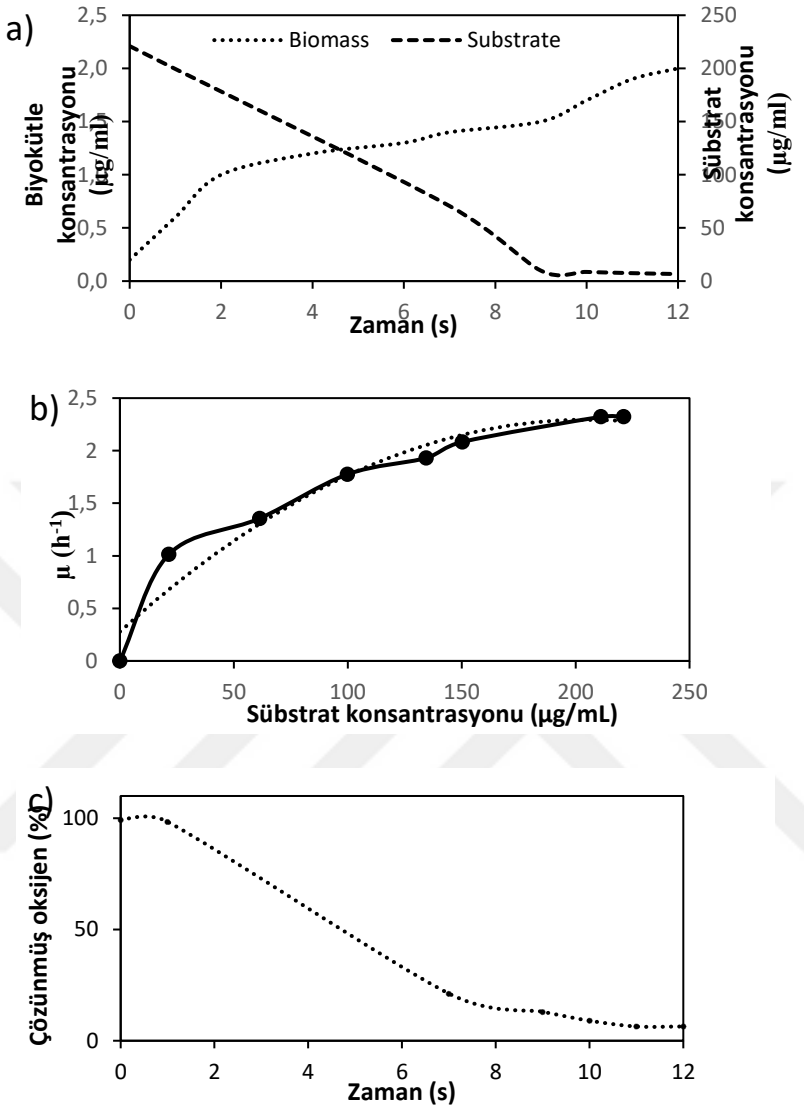
Tablo 5. 11 Biyoreaktör sisteminde çözünmüş oksijen, hücre ve glükoz konsantrasyonları

Zaman (s)	Çözünmüş oksijen pOH (%)	Absorbans (nm)	Hücre kütlesi (µg/mL)	Glükoz miktarı (µg/mL)
0	107.3	0.111	600	220.96
1	98.4	0.306	1000	199.45
4	58.5	0.765	1200	130.65
7	21.2	1.419	1400	70.61
9	13.0	1.790	1600	9.80
11	6.40	2.272	1800	7.47

Biyoproses üretim ortamında çözünmüş oksijen derişimleri incelendiğinde, prosesin başlangıcında to ve 1 saate çözünmüş oksijen değerinin sırasıyla % 99.3 ve 98.4 olduğu için başlangıçtaki karıştırma hızının devam ettiği ancak, hücre derişiminin hızlı arttığı 7. st'te ortamdaki çözünmüş oksijenin % 21.2'ye düştüğü, ve hücre derişiminin maksimum olduğu 9 ve 10 st'de ortamdaki çözünmüş oksijen oranının sırasıyla % 13 ve 6.4 değerine düştüğü ve sistemin oksijeni arttırmak için karıştırma hızını sırasıyla 500-600 dk^{-1} değerine yükselttiği gözlenmiştir. Karıştırma hızının artışına bağlı olarak kültürde köpüklenme gözlendiği için bu adımda antifoam (Antifoam 204, Sigma Aldrich) sisteme verilmiştir ve bu sayede köpük oluşumu önlenmiştir[38]. Yeh vd. [129]; yaptıkları çalışmada, çözünmüş oksijen seviyesinin (DO) erken hücre büyümesinde % 70'ten % 2'ye düştüğünü ve üstel hücre büyümesi sırasında neredeyse sıfırda kaldığını göstermiştirler. En yüksek oksijen ihtiyacı, OD = 1.95 - 2.272 A değer aralığında, pH = 7.50 koşulunda t = 10-11 st'de görülmüştür (Tablo 5.12).

Biyoproses üretim ortamında tüketilen sübstrat derişimleri incelendiğinde, prosesin başlangıcında to ve 1 st'de 0.111-0.306 A değerlerinde glükoz derişiminin sırasıyla 220.96 ve 199.45 µg/mL olduğu görülmüştür. Ancak, hücre derişiminin hızlı arttığı 7 st'de 1.419 A değerinde, ortamdaki glükoz derişiminin azaldığı ve 70.61 değerine düştüğü gözlenmiştir. Hücre derişiminin maksimum olduğu ve absormansın 2.272 A değerine ulaştığı t = 9, 10 ve 11 st'de ortamdaki tüketilen glükoz derişiminin sırasıyla 9.8, 8.63 ve 7.47 µg/mL değerine düştüğü gözlenmiştir (Tablo 5.11, Şekil 5.13). Şekil 5.13a'da görüldüğü gibi zamanla mikrobiyal üretim artarken ortamdaki substrat azalmaktadır. Şekil 5.13a'dan elde edilen verilere göre, substrat

konsantrasyonuna karşı büyüme hızı Şekil 5.13b'de sunulmuş ve μmax, Ks, Yx/s ve Yx/o sırasıyla 2.42 h^{-1}, 31.55 μg/ml, 0.02 ve 0.1 olarak hesaplanmıştır.



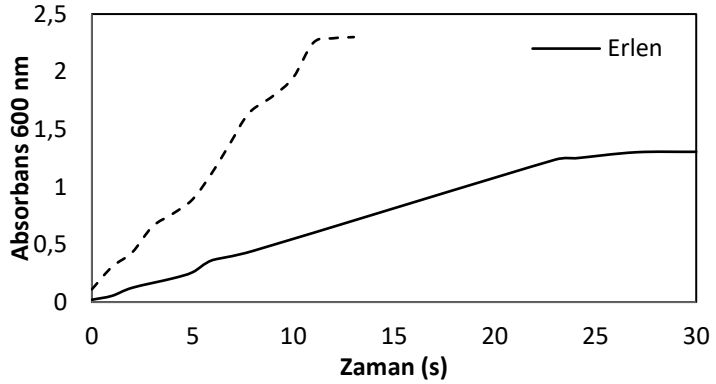
Şekil 5. 13 a) Biyoreaktörde 12 saatlik inkübasyondan sonra biyokütle miktarı olarak sunulan hücre büyüme eğrileri b) substrat konsantrasyonuna göre büyüme hızı c) zamana göre çözünmüş oksijendeki değişim

İnkübasyon sırasında glikoz konsantrasyonunun değişmesi, hücre konsantrasyonu hızla artarken glikozun yaklaşık %49.77'sinin tüketildiği görülmüştür. İşlemin sonunda, başlangıçtaki glikoz konsantrasyonunun %96'sından fazlası tükendiği gözlenmiştir.

Glukoz derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi, proses süresince, hücre derişiminin hızlı artış gösterdiği ilk 4 saatte, glukozun yaklaşık %50'sinin tüketilmiş olduğu bulunmuştur. Prosesin ilerleyen saatlerinde, hücre derişiminin

daha yüksek olduğu, ve 8 saate glukoz tüketim hızı %95 olduğu gözlenmiştir. Proses sonunda ise başlangıç glukoz derişiminin %95'sından fazlasının tükendiği gözlenmiştir (Şekil 5.14).

B. subtilis erlende yetiştirildiğinde 30. saatte 1.304 A değeri ile maksimum absorbans değerine ulaşmıştır. Öte yandan biyoreaktör yetiştiriciliğinin maksimum absorbans değeri 11 saatte 2.200 A'ya ulaşmıştır (Şekil 5.14). Sonuç olarak, *B. subtilis* biyoreaktörde üretildiğinde, 30 saatlik erlen inkübasyonuna (1.304 A) kıyasla 11 saatlik daha kısa sürede daha yüksek bir büyüme (2.200 A) göstermiştir.



Şekil 5. 14 *B. subtilis* suşunun erlen ve biyoreaktörde inkübasyonda hücre büyüme eğrisi.

Sonuç olarak, erlende üretimin gerçekleştirildiği önceki çalışmalarda 30 ˚C 30 st. inkübasyon sonucunda elde edilen maksimum absorbans değeri OD=1.304 olarak gözlenirken, biyoreaktör sisteminde 12 saat inkübasyon sonucunda OD= 1.95 - 2.272 A değer aralığında *B. subtilis*'in daha kısa süre içerisinde çok daha yüksek büyüme gösterdiği gözlenmiştir.

5.4.2 Erlen ve Biyoreaktörde üretilen *B. subtilis'*in Spor Sayısı

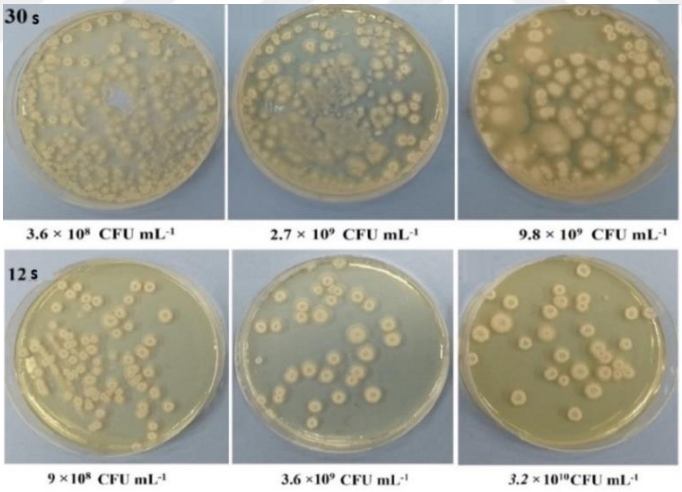
B. subtilis ATCC 6633 sporları hayvanlarda ve insanlarda kullanılabilecek umut verici probiyotikler ve biyokontrol ajanları olarak değerlendirilmektedir [38]. *B. subtilis'*in sporulasyon işleminden sonra, spor sayısı spread plate yöntemine göre PBS ile 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} ve 10^{-8} seri olarak seyreltilip TSA agar plakalarına ekilmiştir (Tablo 5.12). Bazı çalışmalarda optimal koşullar altında üretilen *B. subtilis* için hücre sayısı seri seyreltme ve sayma yöntemleri kullanılarak 1.00×10^8 –1.52×10^{10} KOB / mL aralığında olduğu bildirilmiştir [102].

Tablo 5. 12 Erlen ve biyoreaktörde optimum koşullarda üretilen *B. subtilis*'in spor sayısı

Seyreltme	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	KOB mL^{-1}	Log KOB mL^{-1}
Biyoreaktör	TNTC	125	90	36	31	1.00×10^{10}	10.00
Erlen	TNTC	365	276	98	-	4.30×10^{9}	9.63

TNTC: sayılamayacak kadar fazla

Koloni sayısı, biyoreaktörde 12 saat süreyle *B. subtilis* üretiminden sonra koloni sayma yöntemi ile belirlenmiştir ve KOB mL^{-1} olarak ifade edilmiştir. *B.subtilis*'in spor sayısı, 1.00×10^{10} KOB mL^{-1}'ye kadar elde edilmiştir. Yüksek spor üretimi, bu biyoproses yaklaşımıyla kısa bir inkübasyon periyodunda (12 saat) elde edilmiştir. Öte yandan, 30 saat boyunca erlende üretildikten sonra, *B.subtilis* sporlarının sayısı 4.30 x 10^9 KOB mL^{-1} olarak elde edilmiştir. Sonuç olarak, biyoreaktörde üretilen *B.subtilis*'in çok sayıda spora ulaştığı gözlenmiştir (Tablo 5.12, Şekil 5.15).



Şekil 5. 15 12 saatlik biyoreaktör ve 30 saatlik erlen inkübasyon sonucunda *B. subtilis*'in spor sayısı

Posada-Uribe vd. [102], çalkalama koşullarında erlende gerçekleşen üretimde 1.37 × 10^9 KOB / mL spor hücre yoğunluğuna ve % 93.5 sporülasyon verimliliğine ulaştıklarını öne sürmüştür. Chen vd. [130]; *B. subtilis* WHK-Z12'nin spor verimini, küçük ölçekli erlen ve 30 L fermentör koşulları altında sırasıyla 1.52 ± 0.06 × 10^{10} spor mL^{-1} ve 1.56 ± 0.07 × 10^{10} spor mL^{-1}'e yükselttiklerini bildirmiştirler.

5.5 Probiyotik İçerikli Sert Yüzey Temizleyicinin Hazırlanması

5.5.1 Sürfaktanların *Bacillus* İzolatlarına Karşı Antimikrobiyal Etkisi

Probiyotik temizleme bileşimi bir veya daha fazla noniyonik, anyonik, katyonik, amfoterik, zitteriyonik yüzey aktif madde veya bunların karışımlarını içermektedir. Probiyotik içeren temizleme bileşiminde kullanılan sürfaktanların *Bacillus* türleri üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olmamalıdır [30].

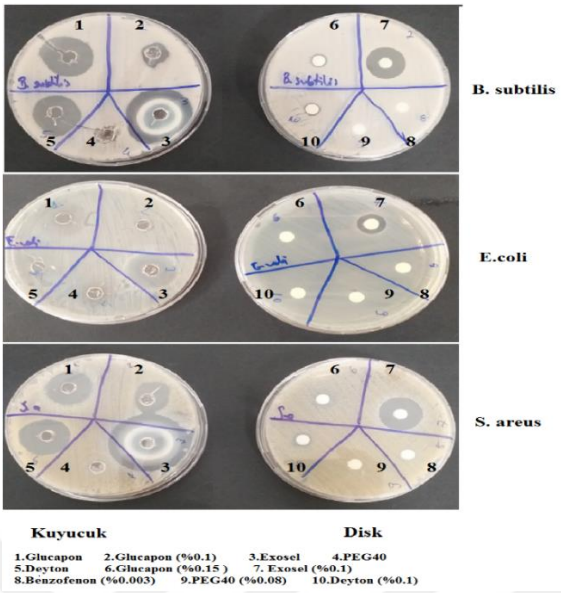
Tablo 5. 13 Çeşitli yüzey aktif maddelerin farklı bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi ve inhibisyon zonları (mm)

Yüzey Aktif Maddeler (YAM)	**Bakteri inhibisyon zonu (mm)**			
	B.subitilis	***E.coli***	***S.areus***	**Yöntem**
Kouyucu (saf)	32.00	23.00	36.00	kuyucuk
Kouyucu (%1)	19.00	12.00	20.00	disk
Noniyonik (saf)	23.00	20.00	21.00	kuyucuk
Noniyonik (%1)	13.00	-	18.00	kuyucuk
Noniyonik (%1.5)	-	-	-	disk
Benzofenon (%0.03)	-	-	-	disk
Peg 40 (saf)	-	7.00	-	kuyucuk
Peg 40 (%0.8)	-	-	-	disk
Katyonik (saf)	21.00	-	22.00	kuyucuk
Katyonik (%1)	07.00	-	07.00	disk

‘ seyreltmeler YAM hazırlanacak formülasyon içeriğindeki yüzdesine göre yapılmıştır.

Agar kuyucuk yöntemi kullanılarak temizleyici formülasyonunda kullanılmak üzere sürfaktanların belirlenmesi için, *B. subtilis, E.coli* ve *S.areus* türlerine karşı etkisi incelenmiştir (Tablo 5.13). Bu çalışmadaki amaç temizleyici formülasyonunda kullanılmak üzere *B. subtilis* türüne daha düşük antimikrobiyal etki gösteren sürfaktanların belirlenmesidir. Ardından temizleyici formülasyonunda kullanılmak üzere seçilen diğer sürfaktanların diğer *Bacillus* türlerine olan etkisi incelenmiştir. TSA petrilerine topraktan izole edilen *B. subtilis, B. safensis, B. pumilus,* ve *B. subtilis* ATCC 6633 probiyotik bakteri türleri agar yüzeyine yayıldıktan sonra agar üzerinde kuyucuklar açılarak distile su ile

seyreltilen yüzey aktif maddeler 30 µL damlatılıp 37 ºC'da 24 h inkübasyondan sonra kuyucuklar etrafındaki inkübasyon zonları ölçülmüştür (Tablo 5.13).



Şekil 5. 16 Yüzey aktif maddelerin *B. subtilis, E. coli* ve *S. areus* türlerine karşı antimikrobiyal etkisi

Temizleyici formülasyonunda yaygın kullanılan bazı yüzey aktif maddelerin saf ve Tablo 5.13'deki oranda seyreltilmiş halde hem agar disk difüzyon hem de kuyucuk yöntemine göre *B. subitilis, E. coli, S. areus* probiyotik ve patojenik türlerine karşı antimikrobiyal etkisine bakılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde kuyucuk yönteminde ajan (sürfaktant) agarla doğrudan temas ettiği ve daha kolay emildiği için inhibisyon zonlarının daha büyük olduğu görülmüştür (Şekil 5.16). Buna ek olarak sürfaktanlar seyreltildiğinde inhibisyon zonunun daha küçük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, yüzey aktif maddelerin bakteriler yoluyla etkilerinin bakteri türlerine özgü olduğunu ve daha fazla araştırma gerektirdiğini göstermiştir.

Test edilen mikroorganizmalar arasında karşılaştırıldığında, test edilen Gram-negatif bakteriler, yüzey aktif maddeye, test edilen Gram-pozitif bakterilerden daha dirençli olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, Gram negatif bakterilerin hücre duvarının Gram pozitif bakterilere göre daha karmaşık yapısı ile açıklanabilir. Gram negatif bakteriler, peptidoglikanı kaplayan bir fosfolipid çift tabakası ve lipopolisakaritleri (LPS) içeren bir dış zara sahiptir. Gram pozitif bakteriler sadece daha kalın peptidoglikan tabakasına sahiptir, ancak dış zar yapısından yoksundur. LPS, hidrofobik özelliklere sahip yüzey aktif madde moleküllerinin penetrasyonunu engelleyerek hücre zarına girmelerini daha zor hale getirir [131].

Yüzey aktif maddeler bakteri hücreleri ile uyumlu hem hidrofilik hem de lipofilik kısımlar içermesine rağmen, sonuçta test edilen yüzey aktif maddelerin Gram negatif bakterileri inhibe etmekte Gram pozitif bakterilere göre daha zor olduğunu göstermiştir.

Tablo 5. 14 Çeşitli yüzey aktif maddelerin *Bacillus* türlerine karşı antimikrobiyal etkisi ve inhibisyon zonları (mm)

Yüzey Aktif Maddeler	*B.safensis*	*B. subtilis*	*B. pumilus*	*ATCC 6633*
Polyethylene Glycol (PEG) 40	-	-	-	-
APG - Noniyonik	-	-	-	22.50±3.53
Benzofenon	-	-	-	-
Sitrik Asit	-	-	-	-
Parfüm	-	-	-	-
Izopropil Alkol (IPA)	-	-	-	-
Noniyonik A	-	37.0±0.00	-	26.00±4.24
Mono Propilen Glikol	-	-	-	05.00±7.07
Anyonik A	36.0±1.41	45.0±0.00	26.0±±1.41	29.50± 0.70
Trietilen Amin (TEA)	-	-	-	20.50±7.77
Anyonik B	15.5±0.70	18.0±4.24	15.0±0.00	19.75±0.35
Noniyonik B	13.8±2.4	24.0±0.00	13.0±0.00	19.26±1.06
Amfotermik	17.5±4.94	25.0±0.00	17.3±1.06	21.00±0.00
Noniyonik C	11.5±2.12	30.0±0.00	11.5±2.12	19.25±2.47

- (kuyu çapı = 6 mm).

-İnhibisyon Zonu yok

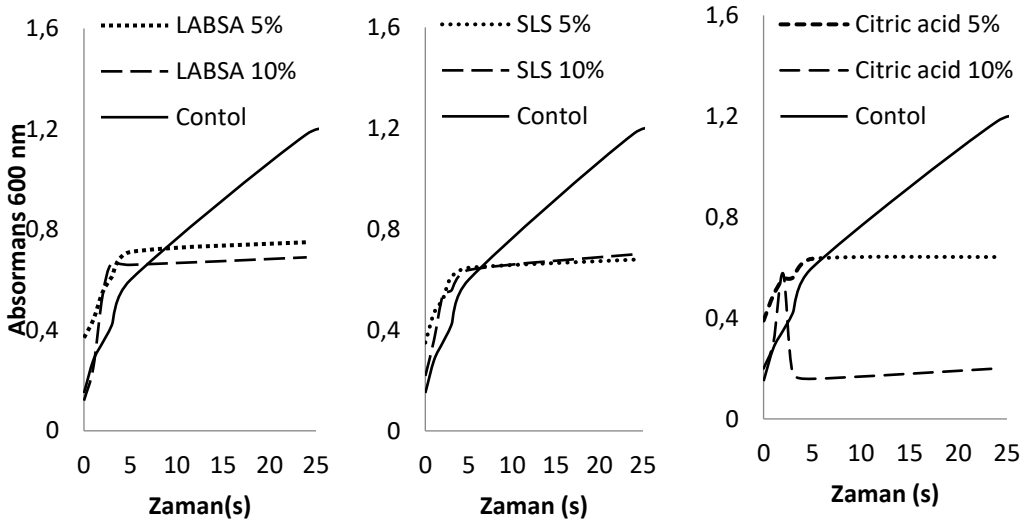
Sonuç olarak probiyotik temizleyici formülasyonunda kullanılan sürfaktanların *Bacillus* türüne karşı engelleyici etki göstermemesi gerektiğinden bu sürfaktanlardan daha düşük antimikrobiyal etki gösterenler formülasyonda tercih edilmiştir. Buna ek olarak farklı sürfaktanların ve yaygın kıllanılan diğer katkı maddelerin topraktan izole edilen diğer *Bacillus* türlerine karşı antimikrobiyal etkisi kuyucuk yöntemi ile denenmiştir.

Koruyucular, içerisinde bulundukları temizleyici maddelerin zamanla istenmeyen dış mikroorganizmalar tarafından kolonizasyonu engellemek için temizleyici formülasyonuna çok düşük miktarlarda katılmaktadır.

Probiyotik temizleme bileşimi ayrıca katkı maddeleri içerebilir. Bu tür katkı maddeleri viskozite değiştiricileridir; kokuları; köpürtücü ajanlar; su yumuşatıcı maddeler; koruyucular; stabilize edici ajanlar; ilave ortaklar arasında anyonik, katyonik, noniyonik, amfoterik ve zitteriyonik sürfaktanlar; fiziksel kararlılık için ilave organik çözücüler; sekestrasyon ajanları (kenetleme ajanları); amino karboksilat kenetleme maddeleri (EDTA ve metal tuzları); karboksilat kenetleme maddeleri; aromatik maddeler ve bunların karışımları ve renklendirici maddeleri içermektedir [30]. Sitrik asit kozmetik endüstrisinde, gıda endüstrisinde, su yumuşatma, temizlik endüstrisinde vb. kullanılmaktadır özellikle koku ve temizleme özelliği nedeniyle temizlik ürünlerinde kullanılmıştır. Bu isteğe bağlı bileşenler, *Bacillus* türleri üzerinde çok az veya hiç olumsuz etkisi olmayacak şekilde seçilmelidir [5, 30]. Peg 40, Benzofenon, Sitrik Asit, parfüm, Izopropil Alkol (IPA), Nano Propil Glikol ve Trietilen Amin (TEA) gibi katkı maddelerin *Bacillus* türüne karşı herhangi bir olumsuz inhibe edici etkisi olmadığı için probiyotikli sert yüzey temizleyici formülasyonunda kullanılabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak Tablo 5.14'e göre iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin *Bacillus* türleri ile daha uyumlu olduğu gözlenmiştir.

5.5.2 Anyonik sürfaktanların sıvı kültürde *Bacillus*'un büyümesi üzerindeki etkisi

Probiyotik bakterilerin zaman içinde antibakteriyel sürfaktanlara karşı tepkisi incelenmiştir. Probiyotik temizleme bileşimi ağırlıkça % 0.1 ila 35 anyonik ve / veya iyonik olmayan yüzey aktif madde içerebilir [5]. Anyonik sürfaktanlar, alkil benzen sülfonik asit ve alkil eter sülfatın bir amin tuzudur [74]. Noniyonik sürfaktanlara kıyasla anyonik sürfaktanlar daha yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği için bu tür sürfaktanlar farklı miktarlarda alkil sülfatların inhibe edici etkisi sadece *B. subtilis* ATCC 6633 üzerinde denenmiştir [63]. TSB sıvı besiyeri tek koloni *B. subtilis* kültürü ile aşılandı ve 2 saatlik inkübasyondan sonra optik yoğunluğu yaklaşık olarak OD=0.5 nm'ye ulaştığında aynı ortama anyonik yüzey aktif maddeler (LAS ve SLS) ve sitrik asit % 5 ve % 10'luk konsantrasyonlarında ilave edilmiştir (Şekil 5.17). Canlı kalan bakteri konsantrasyonları, zamana karşı spektrofotometrede absorbans ölçümü ile değerlendirilmiştir. Büyüme 24 saat, 37 ° C'de inkübasyonda spektrofotometre ile 600 nm'de saatlik olarak ölçülmüştür.



Şekil 5. 17 *B. subtilis*'in farklı konsantrasyonlarda Sodyum Lauril Sülfat (SLS), Lineer alkilbenzen sülfonat (LAS) ve sitrik asit içeren sıvı ortamdaki büyüme eğrileri

B. subtilis kültür ortamına LAS ve SLS eklenene kadar üssel büyüme göstermiştir. Kültürler sitrik asit ve anyonik yüzey aktif maddeler (LAS ve SLS) ile muamele edildiğinde, üstel büyüme fazını sabit faz izlemiştir ve hücre büyümesi sabit faza geçmiştir. Cowles (1938)[74], yaptığı çalışmada Gram pozitif bakterilerin genellikle kullanılan alkil sülfat konsantrasyonları tarafından inhibe edildiğini, ancak Gram negatif bakterilerin (iki tür hariç) inhibe olmadığını bulmuştur. Ayrıca, *Escherichia coli*'nin diğer Gram negatif bakterilere kıyasla iki yüzey aktif maddenin çok daha yüksek konsantrasyonlarına dayanabildiği gözlenmiştir [74].

Şekil 5.17, sitrik asit konsantrasyonu % 5'ten % 10'a çıkarıldığında *B. subtilis* suşunun büyümesinin aşamalı olarak inhibe edildiğini göstermektedir. Brandt vd. [132], yaptıkları çalışmada dört amonyak oksitleyen bakteri (AOB) suşunun tamamının büyümesinin, LAS konsantrasyonu arttıkça doğrusal olarak inhibe edildiğini göstermişlerdir.

Moon vd. [133], çalışmalarında büyüme ortamına % 0.05-0.2 konsantrasyonunda sitrik asit eklenmesinin *L. monocytogenes* büyümesi üzerindeki etkisini, gecikme fazının bir uzantısını ve maksimum OD değerinde bir azalma sergilediğini açıklamıştırlar. Benzer şekilde çalışmamızda, sitrik asit ilavesinin bakteriyel büyüme üzerindeki etkisi, maksimum OD değerinde azalma ve sabit fazın uzaması olarak gözlenmiştir (Şekil 5.17).

5.5.3 Probiyotik İçerikli Sert Yüzey Temizleyicinin Formülasyonu

Hazırlanan probiyotik bazlı çözelti %1 iyonik olmayan ve %1 amfoterik yüzey aktif madde ve %1 *Bacillus* spp. (6×10^7 KOB / mL) spor içermektedir[6, 30].

Bacillus spp. büyük ölçekte biyoreaktör sisteminde üretildikten sonra spor sayımı yapılarak spor sayısı 8.9 x 10^9 KOB mL^{-1} olarak elde edilmiştir. Ardından 12000 rmp de 20 dk santrifüjlendikten sonra dipte kalan çökelti (pellet) 2 gün boyunca -50 ºC'da liyofizatörde kurutularak saklanmıştır. *Bacillus* spp. ile hazırlanan formülasyon 4 ay boyunca besiyerine ekilip *Bacillus* sporlarının canlılığı ve stabilitesi gözlenmiştir (Tablo 5.15).

Tablo 5. 15 Temizleyici içeriğindeki *Bacillus* türlerinin farklı günlerde hücre sayısının KOB/mL şeklinde gösterimi

ÜRÜN	10 gün	20 gün	30 gün	40 gün	60 gün	120 gün
M 4 ºC	2.8 x 10^7	1 x 10^7	1 x 10^6	10^6	4 x 10^6	7 x 10^6
K 4 ºC	2.6 x 10^7	3 x 10^7	1 x 10^6	4 x 10^6	2 x 10^6	1 x 10^6
M 20 ºC	3 x 10^7	3 x 10^7	1 x 10^6	3 x 10^6	6 x 10^6	6 x 10^6
K 20 ºC	5 x 10^7	10^7	1 x 10^6	10^6	4 x 10^6	5 x 10^6
M 27 ºC	2 x 10^7	3 x 10^6	3 x 10^6	2 x 10^6	1 x 10^6	2 x 10^6
K 27 ºC	2 x 10^6	10^6	3 x 10^6	1 x 10^6	4 x 10^6	11 x 10^6
M 35 ºC	2 x 10^6	1 x 10^6	10^6	7 x 10^6	7 x 10^6	4 x 10^6
K 35 ºC	2 x 10^6	2 x 10^6	10^6	3 x 10^6	3 x 10^6	15 x 10^6
M 40 ºC	10^7	5 x 10^7	2 x 10^6	10^6	2 x 10^6	1 x 10^6
K 40 ºC	10^7	9 x 10^7	1 x 10^6	2 x 10^6	10^6	3 x 10^6

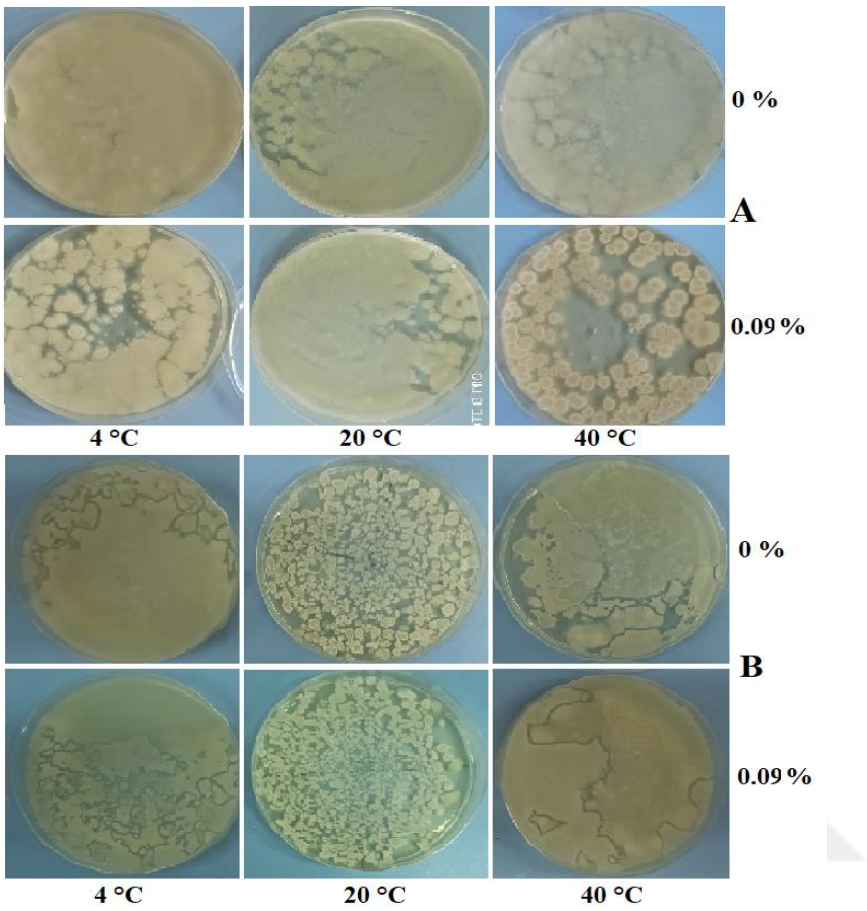
M- Mevcut ürün (%0.09 Biyosit)

K- Koruyucu içermeyen ürün (%0 Biyosit)

Probiyotik bazlı çözelti %1 iyonik olmayan ve %1 amfoterik yüzey aktif madde ve %1 spor halinde *Bacillus* spp (6×10^7 KOB / mL) içermektedir [5, 6]. Temizleyici üretildikten yaklaşık 4 ay boyunca 4, 20, 27, 35 ve 40 °C gibi farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen temizleyici içeriğindeki canlı kalan *Bacillus* spp. hücre sayısı hesaplanmıştır.

Mikrobiyal bazlı temizleyici deki *Bacillus* sporlarının canlılığı 4 ay boyunca izlenmiştir. Çalışmaya paralel olarak deterjan içeriklerindeki *Bacilli* sporları

sayılmış ve hazırlanan formülasyondan 100 µL petri kablarına ekilmiş ve *Bacillus* sporlarının canlılığı ve spor sayıları incelenmiştir (Şekil 5.18).



Şekil 5.18 % 0.09 biyosit içeren ve içermeyen probiyotik bazlı temizleyicide *Bacillus* spp. sporlarının üretimden (A) 4 ay ve (B) 10 ay sonra canlılığı

% 0,09 biyosit içeren probiyotik bazlı temizleyicinin, biyosit içermeyen temizleyiciye göre daha düşük çimlenme gösterdiği görülmüştür (Şekil 5.18). Benzer şekilde, 4 ve 20 ° C'de inkübe edilen probiyotik bazlı temizleyici, 40 ° C'de inkübasyona kıyasla daha yüksek çimlenme gösterir. Biyosit içeren probiyotik bazlı temizleyici petri kabında çimlendiğinde küçük bir azalma gözlendi. Bu azalma, bakterilerin çimlenme aşamasında biyosit tarafından inhibe edilmesinden kaynaklanmaktadır. Şekil 5.18'a bakıldığında *Bacillus* spp. sporlarının besiyerinde başarılı bir şekilde çimlendiği ve sporların temizleyici içeriğindeki koruyucudan etkilenmediği ve temizleyici içerisinde canlı kalabildiği görülmektedir.

Deterjan formülasyonlarında kullanılabilen *Bacillus* izolatlarının nötr pH'da daha yüksek büyüme ve canlılık gösterdiği ve pH 3'te ölüm fazına girdiği gözlemlenmiştir (Şekil 5.5). Bu nedenle mikrobiyal temizleyicilerin

formülasyonunda kullanılan katkı maddeleri, temizleyicinin pH'ını değiştirseler bile *Bacillus* türlerinin büyümesini engellemez. Bu katkı maddeleri arasında viskozite değiştiriciler, kokular, köpürtücü maddeler, su yumuşatıcılar, koruyucular, anyonik, katyonik, iyonik olmayan ve amfoterik yüzey aktif maddeler, fiziksel stabilite için ek organik çözücüler, şelatlama maddeleri, karboksilat şelatlama maddeleri, aromatikler ve bunların karışımları ve renklendirme maddeleri bulunur (Tablo 5.15)[5, 30]. Sonuç olarak probiyotik temizleyici bileşimde kullanılacak yüzey aktif maddeler ve diğer katkı maddelerinin *Bacillus* spp.'nin canlılığını engellemediğine dikkat edilmelidir.

5.5.4 Probiyotik İçerikli Temizleyicinin Antifungal etkisi

Probiyotik bazlı temizleyiciler kullanılarak gözlemlenen patojen yükünün azalması, muhtemelen rekabetçi dışlama, doğal antimikrobiyal aktivitelerle ilgili diğer mekanizmalar ve *Bacillus* spp.'nin antibiyofilm aktivitesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir [6]. Bu çalışma, probiyotik bazlı sanitasyon stratejisinin, kontamine yüzeylerde patojenik bakteri ve mantarların etkili bir şekilde azaltılmasıyla sonuçlandığını göstermiştir(Tablo 5.16- 5.19).

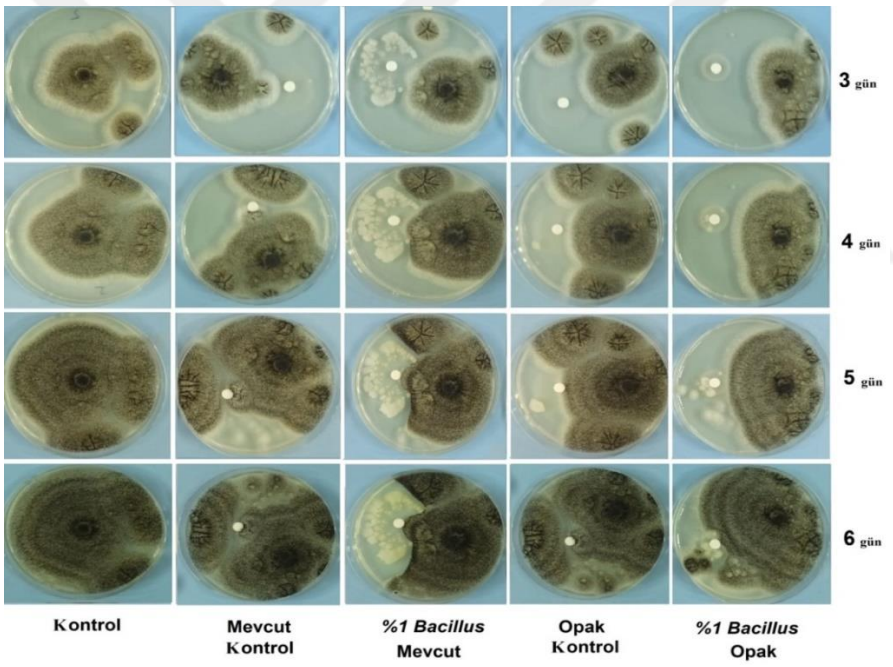
Bacillus cinsinin lipopeptidler, surfaktin, bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri maddeler dahil olmak üzere çeşitli antimikrobiyal bileşikler ürettiği bilinmektedir [3, 4]. Bu antimikrobiyal ajanlar tipik olarak Gram pozitif bakteriyel patojen türlere karşı aktiftir, ancak bazıları mantar patojenlerine ve ayrıca Gram negatif bakteriyel patojenlere karşı aktivite gösterir. Probiyotiklerin antagonistik aktiviteleri, pH değerini düşüren ve patojenler üzerinde rekabetçi bir dışlama etkisine sahip olan organik asitlerin üretiminden kaynaklanmaktadır [134].

Bu çalışmada, temizliğin daha iyi anlaşılmasını sağlamak amacıyla rekabetçi dışlama yöntemi ile antifungal etki değerlendirilmiştir. Engelleme oranları (EO %) (4.1) denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Mevcut probiyotik bazlı temizleyicinin *Aspergillus niger*'e karşı antifungal aktivite oranı % 25.0 iken, opak probiyotik bazlı temizleyicinin *Aspergillus niger'*e karşı antifungal aktivite oranı % 21.1 olmuştur (Tablo 5.16, Şekil 5.19).

Tablo 5.16 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *Aspergillus niger*'e karşı antifungal aktivitesini gösteren ikili kültür yöntemi

Gün	Kontrol	Mevcut (Kontrol)	Opak (Kontrol)	%1 *Bacillus* (Mevcut)	%1 *Bacillus* (Opak)
3.	58.00± 2,8	51.50± 2,1	52.00±1.4	50.00±1.4	53.00±0.0
4.	75.75± 1,7	70.50± 2,1	70.75± 1,0	60.00±0.0	61.50±0.3
5.	90.00±0.0	72.75±0.3	73.75± 1,7	66.00±0.0	67.50±0.3
6.	90.00±0.0	90.00±0.0	90.00±0.0	67.50±0.3	71.00±0.0

Veriler, ortalama ± standart sapma (n=3), ($p < 0.05$) olarak sunulmuştur.



Şekil 5.19 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *A. niger*'e karşı antifungal aktivitesi

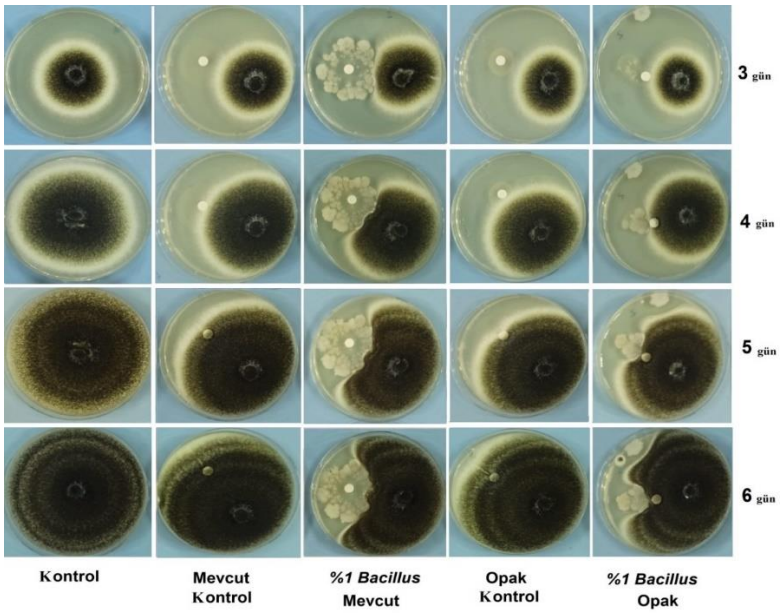
60'tan fazla farklı türde endospor oluşturan *Bacillus*, iyi stres direnci ve mantarlar için toksik olan antimikrobiyal bileşiklerin üretimi gibi özelliklere sahiptir ve bu da onları biyokontrol ajanları olarak geliştirmeye uygun hale getirir [135]. *Bacillus* tarafından üretilen çeşitli antimikrobiyal bileşiklerden iturin, fengycin ve surfactin dahil olmak üzere siklik lipopeptitlerin bitki hastalıklarının kontrolünde etkili olduğu bilinmektedir [43, 47].

Tablo 5.17 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *Aspergillus brasiliensis*'e karşı antifungal aktivitesini gösteren ikili kültür yöntemi

Gün	Kontrol	Mevcut (Kontrol)	Opak (Kontrol)	%1 *Bacillus* (Mevcut)	%1 *Bacillus* (Opak)
3.	61.00±1.4	57.75± 1,0	57.25± 1,7	52.25± 1,0	54.00± 1.4
4.	79.00±1.4	70.75± 1,0	69.50± 2,1	62.75± 1,0	66.50±0.7
5.	90.00±0.0	80.50±0.7	79.75± 1,7	65.75± 0,3	67.50±0.7
6.	90.00±0.0	90.00±0.0	90.00±0.0	66.00±0.0	69.00±0.0

Veriler, ortalama ± standart sapma (n=3), ($p < 0.05$) olarak sunulmuştur.

Mevcut probiyotik bazlı temizleyicinin *Aspergillus brasiliensis*'e karşı antifungal etkisi % 26,6 oranında gözlenmiştir. Ek olarak, opak probiyotik bazlı temizleyicilerin *Aspergillus brasiliensis*'e karşı antifungal aktivitesi % 23.3 idi (Tablo 5.17). İkili kültür yöntemi kullanılarak yapılan ilk tarama, probiyotik bazlı temizleyicilerin antifungal aktiviteler sergilediğini ve test edilen tüm suşların misel büyümesini engellediğini görülmektedir (Şekil 5.20).



Şekil 5. 20 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *A. brasiliensis*'e karşı antifungal aktivitesi

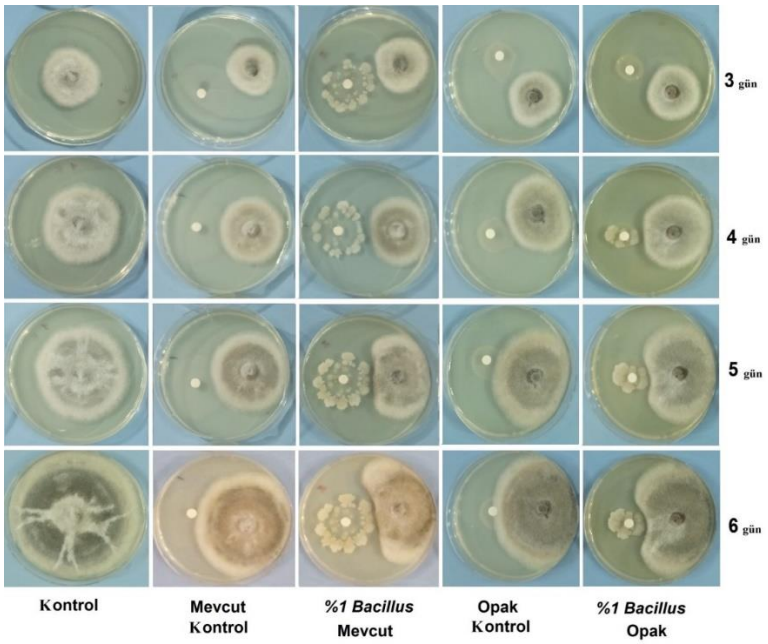
Probiyotik temizleyici içeriğindeki probiyotiklerin agar üzerinde çimlendiği ve mantar gelişimini engellediği gözlemlenmiştir. Öte yandan probiyotik içermeyen

temizleyicilerin mantar gelişimini engellemede hiçbir etkisinin olmadığı ve bu Petri kaplarında mantarların kontrol kadar çimlendiği gözlemlendi (Şekil 5.20). Bu çalışmalar ile *Bacillus* spp.'nin antifungal potansiyelinin iyi olduğu belgelenmiştir. Antibakteriyel ve/veya antifungal aktiviteye sahip çeşitli metabolitlerin sentezlenmesi, biyolojik kontrol ajanı olarak kullanıldığında patojenlerle savaşma kabiliyetinin bir belirleyicisidir [136]. Çoklu enzimler tarafından katalize edilen bir sentez yoluyla nonribozomal olarak sentezlenen fungisidal veya fungistatik peptitler üreterek güçlü antifungal aktiviteye sahiptir [49].

Tablo 5.18 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı antifungal aktivitesini gösteren ikili kültür yöntemi

Gün	Kontrol	Mevcut (Kontrol)	Opak (Kontrol)	%1 *Bacillus* (Mevcut)	%1 *Bacillus* (Opak)
3.	42.00±0.0	38.75±0.3	38.50±0.0	36.25±0.3	38.00±0.0
4.	55.00±0.0	50.75±0.3	49.00±1.4	44.75±0.3	46.50±0.0
5.	67.00±1.4	58.50±0.7	57.00±0.0	51.75±0.3	53.75±0.3
6.	80.00±0.0	69.00±0.0	68.50±0.7	61.00±1.4	60.00±1.4

Veriler, ortalama ± standart sapma (n=3), ($p < 0.05$) olarak sunulmuştur.



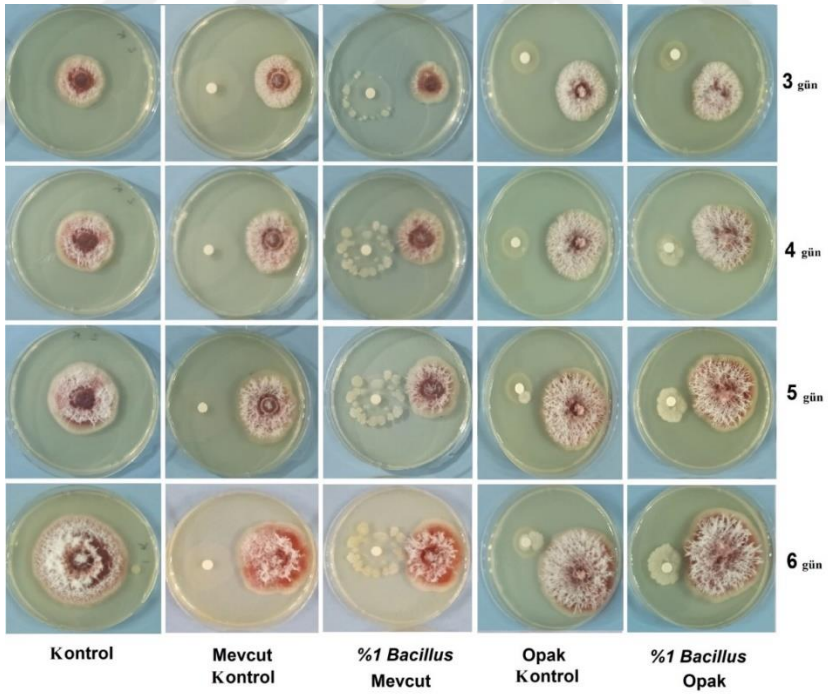
Şekil 5.21 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı antifungal aktivitesi

Mevcut probiyotik bazlı temizleyicilerin *Colletotrichum gloeosporioides'*e karşı inhibisyon oranı % 23.8'dir. Opak probiyotik bazlı temizleyicilerin *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı antifungal aktivitesi % 25.0 olarak elde edilmiştir (Tablo 5.18, Şekil 5.21).

Tablo 5.19 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *Fusarium oxysporum*'a karşı antifungal aktivitesini gösteren ikili kültür yöntemi

Gün	Kontrol	Mevcut (Kontrol)	Opak (Kontrol)	%1 *Bacillus* (Mevcut)	%1 *Bacillus* (Opak)
3.	38.00±0.0	33.75±0.3	34.00±0.0	32.25±0.3	33.50±0.0
4.	49.00±0.0	39.75±0.3	40.50±0.7	35.75±0.3	38.75±0.3
5.	57.00±1.4	48.50±0.7	47.00±0.0	41.50±0.7	43.50±0.7
6.	69.00±0.0	52.00±0.0	53.00±0.0	46.00±0.0	49.00±1.4

Veriler, ortalama ± standart sapma (n=3), ($p < 0.05$) olarak sunulmuştur.



Tablo 5.22 Probiyotik bazlı temizleyicilerin *Fusarium oxysporum'*a karşı antifungal aktivitesini gösteren ikili kültür yöntemi

Fusarium oxysporum'a karşı mevcut ve opak probiyotik bazlı temizleyicilerin inhibisyon oranları sırasıyla % 33.3 ve % 28.9 olarak elde edilmiştir (Tablo 5.19,

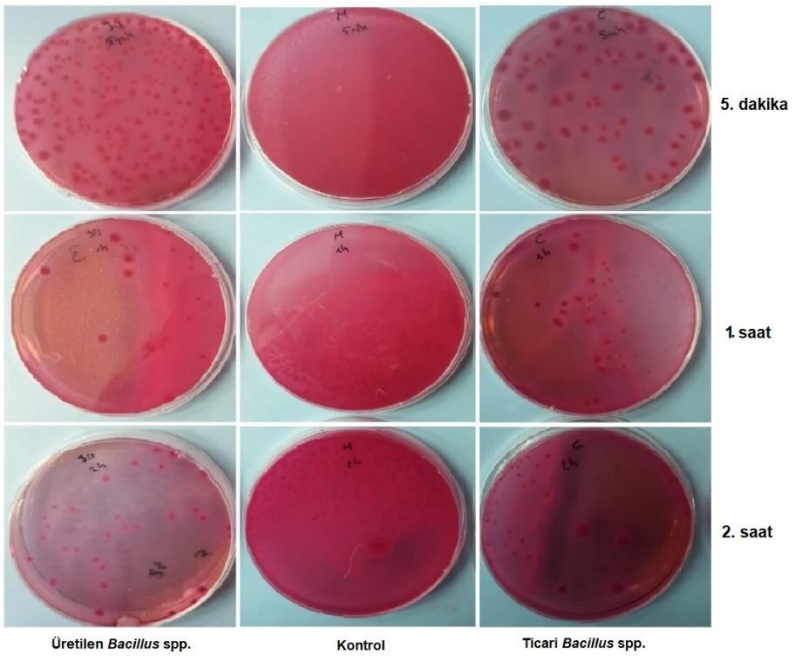
Şekil 5.22). Yapılan diğer çalışmalarda *B. subtilis* suşları, *Fusarium* sp.'ye karşı antagonistik aktivite gösterdiği bildirilmiştir[47, 137].

Bu çalışmada probiyotik bazlı temizleyicilerin en yüksek inhibisyon oranları *F.oxysporum* ve *A niger*'e karşı elde edilmiştir. *A. brasiliensis* ve *C. gloeosporioides'e* karşı daha düşük bir antagonistik etki elde edilmiştir.

Probiyotikler için, patojenlerle besinler için rekabet, antibiyotik aktivitesi olan çeşitli biyoaktif maddelerin üretimi ve hücre duvarını tahrip eden bileşikler ve sistemik direncin indüklenmesi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik kontrol mekanizmaları önerilmiştir. *Bacillus* üyeleri, çeşitli patojenlere karşı biyolojik kontrol ajanları olarak kullanım için büyük potansiyele sahiptirler [38, 120, 138].

5.5.5 Probiyotik içerikli temizleyicinin antimikrobiyal etkisi

Probiyotik bazlı formülasyonlar, *Escherichia coli*'ye karşı EN 1276 testi ile hem mükemmel koşullarda hem de enterferans yapan maddelerin (kontrol) varlığında değerlendirilmiştir. Sonuçlar, yaşayabilir sayımdaki ortalama log azalması olarak ifade edilmiştir. Log azaltma, bir dezenfektan tarafından ortadan kaldırılan canlı mikropların nispi sayısını ifade eder. 1 log10 azalması daha yaygın olarak 1-log şeklinde yazılır - hedef mikropların veya koloni oluşturan birimlerin (KOB'lar) %90'ını kapsayan hedef mikropların sayısındaki 10 kat azalmaya eşittir. Lertcanawanichakul ve Sawangnop [118], *Bacillus* türlerinin inhibitör aktiviteye sahip olduğunu ve *S. aureus*'un *E. coli*'den daha duyarlı olduğunu öne sürmüşlerdir. *Bacillus* türleri, özellikle *B. subtilis*, çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı antifungal ve antibakteriyel aktivite sergileyen antimikrobiyal maddelerin en önemli üreticisidir [139]. Çoğu antibakteriyel ajan, bakteriyel sitoplazmik membranı ve hücre duvarını yok eder. Bakteriyel membran geçirgenliği dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar, taşıma süreçlerini, hücre içi substrat rezervuarlarını, yük gradyanlarını, kofaktör konsantrasyonlarını, iyon gradyanlarını ve besin konsantrasyonlarını etkiler [76, 140].



Şekil. 5. 23 Uygulama sonrası Macconkey (MAC) agarda kalan *E. coli* bakteri sayısı

Tablo 5.20 Probiyotik bazlı temizleyici tarafından üretilen canlı sayımdaki ortalama Log azalma ve yüzde engelleme oranları

Süre dk	**Ticari *Bacillus* spp.**			**Üretilen *Bacillus* spp.**			**Kontrol- probiyotiksiz ürün**		
	KOB	%	Log	KOB	%	Log	KOB	%	Log
5	65	99.990	4	212	99.990	4	High	90.00	1
60	160	99.990	4	23	99.999	5	$59x10^2$	99.90	3
120	40	99.999	5	31	99.999	5	$32x10^2$	99.90	3

*Bakteri inokulum boyutu 10^8

*Log: canlı sayısında azalma

*KOB: koloni oluşturan birimler

5-log ve 4-log arasındaki fark, 5-log'un 10 kat daha güçlü olması ve 4-log'dan 10 kat daha az mikrop bırakmasıdır. 5 dk ve 1 saatlik bekleme süreleri arasındaki fark, 1 saatin 10 kat daha etkili olmasıdır. Bu, önceki bir milyon KOB örneğinden % 99,999'luk bir azalmanın 10 canlı hücre bıraktığı anlamına gelir. Probiyotik temizleyicinin mikroorganizmalara karşı çok etkili bir biyosit olduğunu kanıtlıyor. Bu, logaritmik ölçeğin ne kadar hızlı yükseldiğini gösterir. 1 ile 2 saat bekleme

süreleri arasında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir(Şekil 5.23, Tablo 5.20).

Daha temiz bir çözümün performansını incelerken bekleme sürelerini de dikkate almamız gerekir. Bu, belirli bir öldürme oranına ulaşmak için bir temizleyicinin bir yüzeyle temas etmesi için geçen süredir. Bu nedenle, bir yüzeye bir solüsyon püskürtürseniz, silmeden önce solüsyonun ne kadar süre kalması gerektiğidir. Özellikle probiyotik bazlı temizleyicilerin, uygulanan yüzeyi etkileyip kolonize edebilmesi için belirli bir süre yüzeyde kalması gerekir. Bu nedenle bu çalışmada *Bacillus* sporlarının yüzeyde etkili hale gelmesi için standart 5 dakikalık bekleme süresi ve 1 ve 2 saatlik bekleme süreleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, bekleme süresi arttıkça patojenlerin öldürme oranı artmıştır.

Dikkate almamız gereken bir diğer faktör de, temizleme solüsyonu uygulandıktan, silindikten ve temiz bırakıldıktan sonra patojenlerin yeniden büyüme oranlarıdır. Ancak yüzey probiyotik içerikli bir temizleyici ile silindikten sonra, *Bacillus* sporları aktif hale geldikleri, uzun süre kaldıkları ve yüzeyde kolonize oldukları için yüzeydeki patojenlerin yeniden üremesini geciktirir.

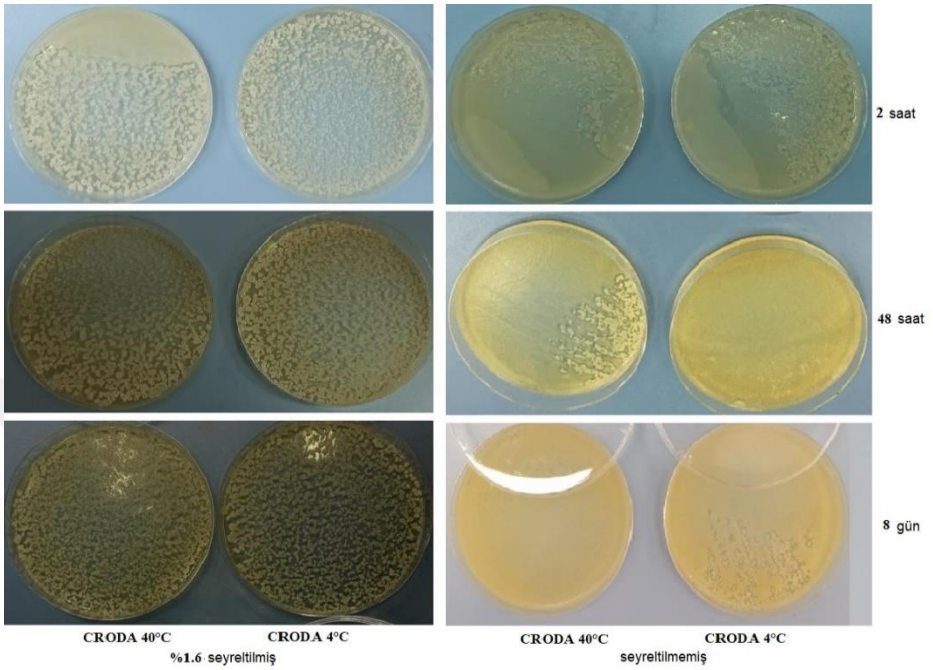
Mikrobiyal bazlı temizleyicideki basil sporları, yüzeydeki sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörler de dahil olmak üzere farklı faktörlerden etkilenir. Bununla birlikte, ilk etapta patojenleri öldürme hızı ne kadar yüksekse ve *Bacillus* sporları yüzeyde ne kadar uzun süre kalırsa, patojenlerin geri dönmesi o kadar uzun sürer.

5.5.6 Probiyotik İçerikli Temizleyicinin Yüzeylerde Çimlenmesi

Probiyotik bazlı temizleyicide bulunan *Bacillus* spp. sporlarının kontrollü yüzeylerde çimlenme kabiliyeti bir in vitro çimlenme deneyleri ile değerlendirilmiştir [141]. *Bacillus* türlerinin sporları yıllarca uykuda ve dirençli durumda kalabilir. Gerçekten de bakteriler, sporlanma yetenekleri sayesinde eski bir ilkel dünya koşullarında hayatta kalmışlardır, ancak belirli ajanlara maruz kalmak, çimlenme sürecinde sporların dakikalar içinde hayata dönmesine neden olabilir [142].

10^6 *Bacillus* spor / mL içeren temizleyici, saf olarak ve distile su ile % 1.6 seyreltilerek çimlenme kabiliyeti değerlendirilmiştir. Bunun için, suda 1.6 : 100 oranında seyreltildi ve kontrollü bir ortamda 90 mm'lik steril bir yüzeye swab ile yayılarak uygulanmıştır. Çimlenmeden 2, 48 saat ve 8 gün sonra steril yüzeydeki

bakteri hücreleri swab ile toplandı ve 1 mL LB içerisinde süspanse edildi ve 80 ° C'de 15 dakika termal şok uygulandıktan sonra TSA plakalarına yayılmıştır. Bakteriyel büyüme, 37 ° C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir (Şekil 5.24) [3].



Şekil 5. 24 Probiyotik bazlı temizleyicideki *Bacillus* sporların 2. ve 48. saat ve 8. günden sonra yüzeylerde çimlenmesi

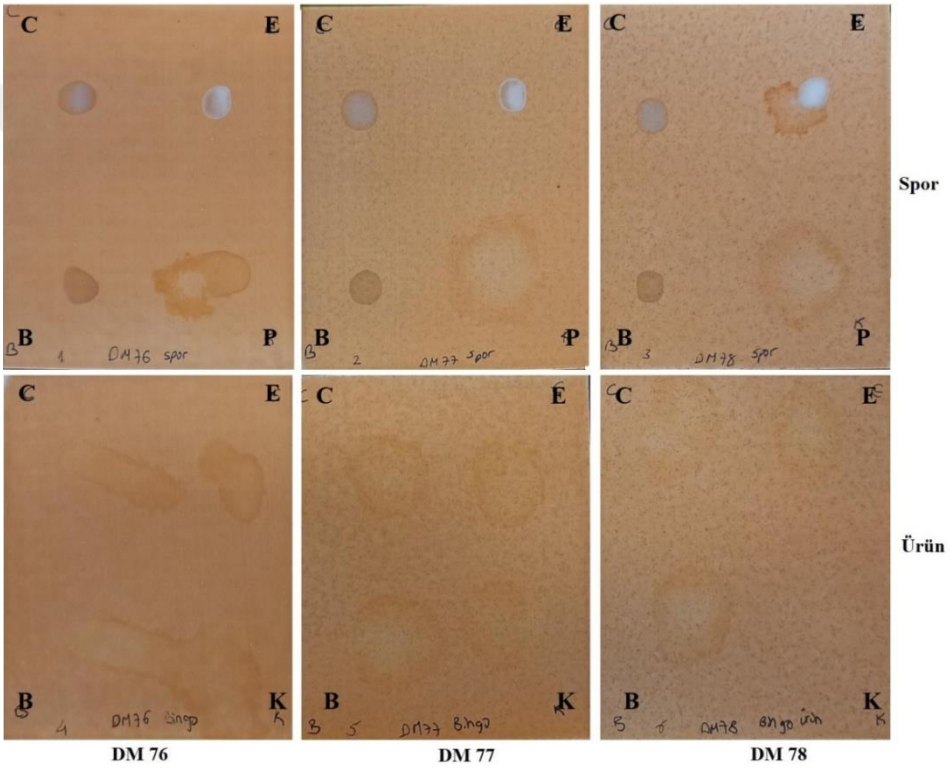
Şekil 5.24'e göre Probiyotik bazlı temizleyicideki *Bacillus* spp. sporların uygulandığı yüzeyde uzun süreli varlığı ve ilk temizlemeden uzun süre sonra aktif hale gelme yetenekleri, ilave kirlerin çıkarılmasına ve yüzeyin uzun süre temiz kalmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca probiyotik bazlı temizleyicideki *Bacillus* spp. sporların uygulandığı yüzeyde 8 güne kadar aktif ve canlı kalabildiği gözlenmiştir.

5.5.7 Deterjan Performans Testi Sonuçları

Çalışmada probiyotik deterjan performans testi için 3 adet Melamin karo üzerinde; CFT DM 76 Melamin karo üzerine renkli mısır nişastası, amilaz enzimlerinin performansını ölçmek için standart kirli renkli mısır nişasta karosu. CFT DM 77 Melamin karo üzerine renkli karışık (mısır/pirinç) nişastası, amilaz enzimlerinin performansını ölçmek için standart kirli renkli karışık (mısır/pirinç) nişasta karosu. CFT DM 78 Melamin karo üzerine renkli pirinç nişastası, Amilaz enzimlerinin performansını ölçmek için standart kirli renkli pirinç nişastası gibi monitörleri

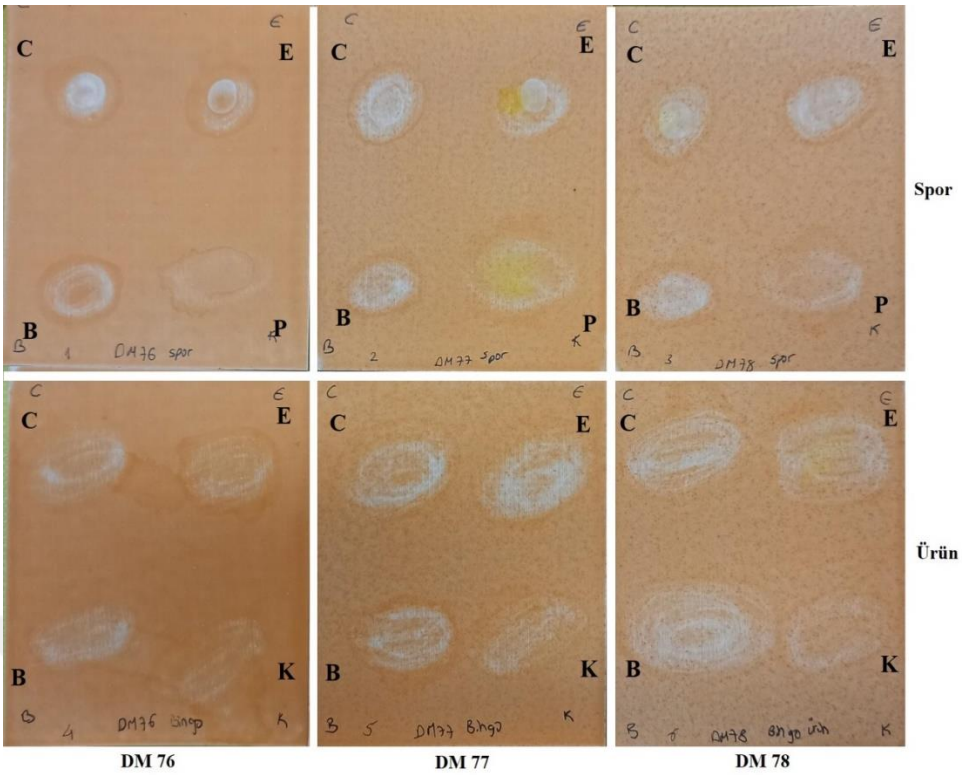
kullanılmıştır. 1'nci, 7'nci ve 14'üncü günlerde 50 µL C: ticari, ve üretilen *Bacillus* spp., ve % 1 probiyotik içeren sert yüzey temizleyici ve probiyotiksiz kontrol temizleyicileri yüklü melamin karo üzerine damlatılarak temzileme performansına bakılmıştır (Şekil 5.25).

1'nci günde 50 µL C: ticari, E: ticari, ürettiğimiz *Bacillus* spp. sporları ve bu sporlarla hazırlanan % 1 probiyotik spor içeren sert yüzey temizleyici ve probiyotiksiz kontrol temizleyicileri yüklü melamin karo üzerine damlatılarak 20 gün sonra temzileme performansına ve damlatılan bakterilerin canlılığına bakılmıştır(Şekil 5.26).



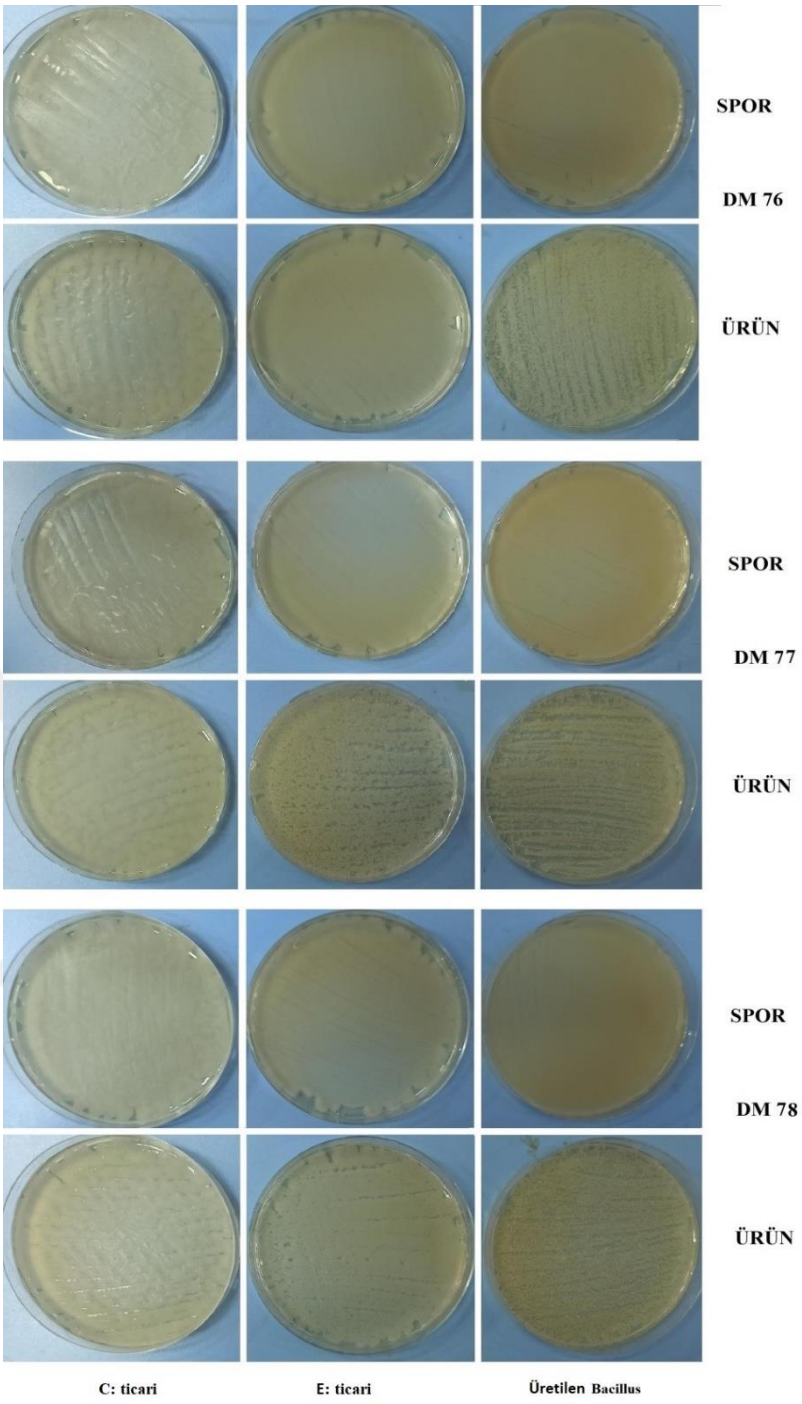
Şekil 5.25 CFT Metodu ile probiyotik sporlarının ve probiyotik spor içerikli temizleyici ile kirlerin giderilmesi. C: ticari, E: ticari, B: üretilen *Bacillus* sporları, P: PBS, K: kontrol temizleyici

20 gün sonra saf su ile ıslatılmış swab ile yaklaşık 2 mm lik ortam sılınmiştir ve ortaya çıkan beyazlık gözlenmiştir. Şekil 5.26'ye göre en iyi sonuçlar DM 77 Karışık (mısır/pirinç) nişasta karosunda ve saf probiyotik sporlar ile muamele edilen örneklerde elde edilmiştir. Ek olarak %1 probiyotik içerikli temizleyicinin kontrol temizleyiciye göre daha yüksek etkisi olduğu gözlenmiştir.



Şekil 5.26 CFT Metodu ile probiyotik sporlarının ve probiyotik spor içerikli temizleyici ile kirlerin giderilmesi. C: ticari, E: ticari, B: üretilen *Bacillus* sporları, P: PBS, K: kontrol temizleyici

Şekil 5.27'a göre saf probiyotik sporlarının uygulandığı örneklerde %1 probiyotik içeren temizleyicilerden daha fazla mikrobiyal yük elde edilmiştir. DM76 mısır nişastası, DM 77 karışık (mısır/pirinç) nişasta, ve DM 78 pirinç nişastası gibi melamin karo üzerindeki probiyotik bakterilerin 20 gün boyunca hayatta kaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 5.27 DM76 mısır nişastası, DM 77 karışık (mısır/pirinç) nişasta, ve DM 78 pirinç nişastası gibi melamin karo üzerindeki probiyotik bakterilerin canlılığının 20 gün sonra tespiti

Sonuç olarak, *Bacillus* sporlarının yüzeydeki kirleri enzimatik olarak parçalayarak yüzeyden daha kolay uzaklaştırılmalarını sağladığı ayrıca yüzeyde canlı ve aktif kaldığı gözlenmiştir.

6
SONUÇLAR

- Probiyotik deterjan formülasyonunda kullanılan *Bacillus* sp. pH 3 gibi asidik pH değerlerinde ölüm fazına geçerken, nötr pH değerinde daha yüksek büyüme ve canlılık göstermiştir. Probiyotik temizleyici formülasyonunda kullanılan katkı maddeleri *Bacillus* sp. gelişimini engellemez ve besiyerinin pH'ını düşürmez.
- Probiyotik deterjan formülasyonunda kullanılan *Bacillus* sp. yüksek antibiyotik direnci ve otoagregasyon yeteneği sergilediği gözlemlenmiştir.
- Bakteri üremesi için en iyi sonuçları elde etmek için merkezi kompozit tasarımı yardımıyla farklı kültür koşulları değerlendirilerek ortamın büyüme koşulları optimize edilir. *B. subtilis'*in üç boyutlu yanıt yüzey grafiği incelemesi (OD600=1,1) sonucunda sıcaklık 29.5 °C ve pH 7.5'e ayarlandığında büyümenin arttığı gözlendi.
- *Bacillus* türleri büyük ölçekte biyoreaktör sisteminde üretildikten sonra temizleyici formülasyonuna eklenmiştir. Biyoreaktörde optimum büyüme koşulu ile üretilen *B. subtilis* ATCC 6633'ün çok kısa bir inkübasyon süresinde yüksek sayıda spora ulaştığı görülmüştür. Biyoreaktörde 12 saat süreyle üretilen *B. subtilis*'in spor sayıları 1.18×10^{10} KOB mL^{-1} olarak elde edilmiştir.
- Probiyotik temizleme bileşimi ayrıca bir veya daha fazla noniyonik, anyonik, katyonik, amfoterik ve zwit terionik yüzey aktif madde veya bunların karışımlarını içerir. Yüzey aktif maddelerin *Bacillus* türlerine karşı antimikrobiyal etkisi incelendiğinde iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin daha az engelleme oranı gösterdiği gözlenmiştir.
- Temizleyici formulasyonunda kullanılan katkı maddeleri; viskozite değiştiricilerdir; köpürtücü maddeler; su yumuşatıcı maddeler; koruyucular; stabilize edici ajanlar; ek ortaklar arasında anyonik, katyonik, iyonik olmayan, amfoterik ve zwitteriyonik yüzey aktif maddeler yer alır; fiziksel stabilite için ek organik çözücüler; sekestrasyon ajanları (şelatlama ajanları); amino

karboksilat şelatlama maddeleri (EDTA ve bunların metal tuzları); karboksilat şelatlama maddeleri; aromatik maddeler ve bunların karışımları ve renklendirici maddelerin *Bacillus* türlerinin gelişimini engellemediği ve ortamın pH'ını düşürmediği sonucuna varılmıştır. Çalışmada kullanılan sürfaktanların ve koruyucunun *Bacillus* türlerinin stabil kalmasında destek olduğu gözlenmiştir.

- LABSA ve SLES, *Bacillus* hücreleri üzerinde bakteriyostatik etki göstermeleri ve hücre ölümüne neden olmamaları nedeniyle probiyotik temizleyici formülasyon için tercih edilebilir.
- Hazırlanan probiyotik bazlı çözelti %1 iyonik olmayan ve %1 amfoterik yüzey aktif madde ve %1 *Bacillus* spp. (6×10^7 KOB / mL) spor içermektedir.
- Probiyotik deterjan formülasyonundaki *Bacillus* sp. sporlarının temizleyici içeriğinde stabil kaldığı ve yüzeye uygulandığında yüzeyde vejetatif hale geçerek çimlendiği gözlenmiştir. Yaklaşık olarak 1 yıl boynca spor sayısı sayılarak *Bacillus* spp. temizleyici içerisindeli canlı ve stabil kaldığı gözlenmiştir.
- Hazırlanan probiyotik içerikli sert yüzey temizleyicinin bakteri ve mantar patojenlerine karşı antimikrobiyal etkili olduğu gözlenmiştir. *Bacillus* sp. 'nin yüzeylerdeki patojen bakteri ve mantarları etkin bir şekilde yok edeceğini ve uzun vadede yüzeylerdeki patojenik mikroorganizmaları etkin bir şekilde temizlemek için temizleyicinin probiyotik *Bacillus* türlerini içermesi gerektiğini doğrulamıştır.
- Temizleme performansı için kullanılan melanın karolardan gözlendiği gibi *Bacillus* sporlarının yüzeydeki kirleri enzimatik olarak parçalayarak yüzeyden daha kolay uzaklaştırılmalarını sağladığı ayrıca yüzeyde canlı ve aktif kaldığı gözlenmiştir.
- Bu nedenle *Bacillus* sp. 'nin patojenik türleri ortamdan uzaklaştırmak ve uzun vadede patojen türlerin gelişmesini önlemek için probiyotik/mikrobiyal temizleyici formülasyonunda umut verici yeni bir stratejik yöntemdir.

KAYNAKÇA

[1] S. M. Teasdale and A. Kademi, "Quality challenges associated with microbial-based cleaning products from the Industry Perspective," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 116, pp. 20–24, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.fct.2017.10.029.

[2] G. M. Armin Spöka, George Arvanitakisb, "Status of microbial based cleaning products in statutory regulations and ecolabelling in Europe, the USA, and Canada.," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 116, pp. 10–19, 2018.

[3] E. Caselli *et al.*, "Impact of a probiotic-based cleaning intervention on the microbiota ecosystem of the hospital surfaces: Focus on the resistome remodulation," *PLoS One*, vol. 11, no. 2, Feb. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0148857.

[4] E. Caselli *et al.*, "Impact of a probiotic-based hospital sanitation on antimicrobial resistance and HAI-associated antimicrobial consumption and costs: A multicenter study," *Infect. Drug Resist.*, vol. 12, pp. 501–510, 2019, doi: 10.2147/IDR.S194670.

[5] A. Brooke, U.S. Patent No. 8,801,864. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 2014.

[6] P. B. and S. M. Alberta Vandini, Alessia Frabetti, Paola Antonioli, Daniela Platano, Alessio Branchini, Maria Teresa Camerada, Luca Lanzoni, "Reduction of the Microbiological Load on Hospital Surfaces Through Probiotic-Based Cleaning Procedures: A New Strategy to Control Nosocomial Infections," *J. Microbiol. Exp.*, vol. 1, no. 5, Oct. 2014, doi: 10.15406/jmen.2014.01.00027.

[7] E. Caselli, "Hygiene: microbial strategies to reduce pathogens and drug resistance in clinical settings," *Microb. Biotechnol.*, vol. 10, no. 5, pp. 1079–1083, Sep. 2017, doi: 10.1111/1751-7915.12755.

[8] K. Papadimitriou *et al.*, "Discovering probiotic microorganisms: In vitro, in vivo, genetic and omics approaches," *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. FEB, pp. 1–28, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00058.

[9] M. C. Fundagül Erem, Ahmet Küçükçetin, "*Bacillus* türlerinin probiyotik olarak değerlendirilmesi," *Gida*, 2013, doi: 10.5505/gida.2013.32042.

[10] M. Kechagia *et al.*, "Health Benefits of Probiotics: A Review," *ISRN Nutr.*, vol. 2013, pp. 1–7, 2013, doi: 10.5402/2013/481651.

[11] D. Romero-Alvarez *et al.*, "Potential distributions of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* biovar anthracis causing anthrax in Africa," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 14, no. 3, pp. 1–20, 2020, doi: 10.1371/journal.pntd.0008131.

[12] B. A. Borsa, M. E. Aldağ, B. Tunali, U. Dinç, Z. Güngördu Dalar, and V. C. Ozalp, "Nadir Görülen Firsatçi Patojen *Bacillus pumilus*'un Neden Olduğu Bir Sepsis Olgusu," *Mikrobiyol. Bul.*, vol. 50, no. 3, pp. 466–470, Jul. 2016, doi: 10.5578/mb.27575.

[13] Y. Yuzugullu-Karakuş, A. Sertel, Y. Duman, and F. Polat, “Morphological, biochemical and molecular characterization of *Bacillus* isolates as a producer of industrial enzymes,” *Turk Hij. ve Deney. Biyol. Derg.*, vol. 75, no. 4, pp. 353–364, 2018, doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.87004.

[14] N. A. Logan, P. D. Vos, *Bacillus*. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria, pp. 1-163, 2015.

[15] S. Tasaki, M. Nakayama, and W. Shoji, “Self-organization of bacterial communities against environmental pH variation: Controlled chemotactic motility arranges cell population structures in biofilms,” *PLoS One*, vol. 12, no. 3, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0173195.

[16] F. A. Lima, O. S. Santos, A. W. V. Pomella, E. J. Ribeiro, and M. M. de Resende, “Culture Medium Evaluation Using Low-Cost Substrate for Biosurfactants Lipopeptides Production by *Bacillus amyloliquefaciens* in Pilot Bioreactor,” *J. Surfactants Deterg.*, vol. 23, no. 1, pp. 91–98, 2020, doi: 10.1002/jsde.12350.

[17] S. M. Cutting, “*Bacillus* probiotics,” *Food Microbiol.*, vol. 28, no. 2, pp. 214–220, 2011, doi: 10.1016/j.fm.2010.03.007.

[18] A. Chaibi, L. H. Ababouch, and F. F. Busta, “Inhibition of bacterial spores and vegetative cells by glycerides,” *J. Food Prot.*, vol. 59, no. 7, pp. 716–722, 1996, doi: 10.4315/0362-028X-59.7.716.

[19] T. M. Barbosa, C. R. Serra, R. M. La Ragione, M. J. Woodward, and A. O. Henriques, “Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 2, pp. 968–978, 2005, doi: 10.1128/AEM.71.2.968-978.2005.

[20] W. Il Cho and M. S. Chung, “*Bacillus* spores: a review of their properties and inactivation processing technologies,” *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 29, no. 11, pp. 1447–1461, 2020, doi: 10.1007/s10068-020-00809-4.

[21] A. O. Henriques and C. P. Moran, “Structure, assembly, and function of the spore surface layers,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 61, pp. 555–588, 2007, doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093224.

[22] W. L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, and P. Setlow, “ Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments ,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 64, no. 3, pp. 548–572, 2000, doi: 10.1128/mmbr.64.3.548-572.2000.

[23] Standards Unit and Public Health England, “UK Standards for Microbiology Investigations,” *Bacteriol. - Identif.*, vol. 9, no. 3, p. 9, 2018.

[24] G. Özlük Çilak and K. Halkman, “A research on the effect of various culture media for sporulation strenght of *Bacillus cereus*,” *Gida / J. Food*, pp. 347–355, Mar. 2018, doi: 10.15237/gida.gd18016.

[25] A. Pandey, K. Dhakar, A. Sharma, P. Priti, P. Sati, and B. Kumar, “Thermophilic bacteria that tolerate a wide temperature and pH range colonize the Soldhar (95 °C) and Ringigad (80 °C) hot springs of Uttarakhand, India,” *Ann. Microbiol.*, vol. 65, no. 2, pp. 809–816, 2015, doi: 10.1007/s13213-014-0921-0.

[26] T. J. Beveridge, “Use of the Gram stain in microbiology,” *Biotech.*

Histochem., vol. 76, no. 3, 2001, doi: 10.1080/bih.76.3.111.118.

[27] R. Borriss, "*Bacillus*, a plant-beneficial bacterium," in *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*, 2015.

[28] I. B. Sorokulova *et al.*, "The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use," *Dig. Dis. Sci.*, vol. 53, no. 4, pp. 954–963, Apr. 2008, doi: 10.1007/s10620-007-9959-1.

[29] E. Baril *et al.*, "The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 146, no. 1, pp. 57–62, 2011, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.042.

[30] M. Vehapi and D. Özçimen, "Investigation of *B. subtilis* viability at different pH ranges for use in microbial cleaner formulation." *Bull. Biotechnol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1-7, 2020.

[31] G. G. Corrêa *et al.*, "A modular autoinduction device for control of gene expression in *Bacillus subtilis*," *Metab. Eng.*, vol. 61, pp. 326–334, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.ymben.2020.03.012.

[32] H. T. Kiesewalter *et al.*, "Complete genome sequences of 13 *Bacillus subtilis* soil isolates for studying secondary metabolite diversity," *Microbiol. Resour. Announc.*, vol. 9, no. 2, pp. 6–8, 2020, doi: 10.1128/mra.01406-19.

[33] P. P. Reddy, "*P*lant growth promoting rhizobacteria for horticultural crop protection," vol. 10, pp. 978-81. New Delhi, India:: Springer India.2014.

[34] M. C. Vega, "Advanced Technologies for protein complex production and characterization. Preface," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 896, 2016.

[35] V. V. Kothari *et al.*, "Erratum: Genome Sequence of Salt-Tolerant *Bacillus safensis* Strain VK, Isolated from Saline Desert Area of Gujarat, India," *Genome Announc.*, vol. 2, no. 2, pp. 2046, 2014, doi: 10.1128/genomeA.00337-14.

[36] F. Abdelli *et al.*, "Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4," *Biodegradation*, vol. 30, no. 4, pp. 287–300, 2019, doi: 10.1007/s10532-018-09865-4.

[37] B. B. Boyiri, E. M. Onyango, P. Satya Prakash, and E. M. Onyango, "probiotic potential of bacterial isolates from 'amabere amaruranu', a kenyan traditional cultured milk," *Int. J. Probiotics Prebiotics*, vol. 10, no. 4, pp. 117–132, 2015, [Online]. Available: www.newcenturyhealthpublishers.com.

[38] M. Vehapi, B. İnan, S. Kayacan-Cakmakoglu, O. Sagdic, and D. Özçimen, "Optimization of Growth Conditions for the Production of *Bacillus subtilis* Using Central Composite Design and Its Antagonism Against Pathogenic Fungi," *Probiotics Antimicrob. Proteins*, no. 0123456789, 2022, doi: 10.1007/s12602-021-09904-2.

[39] S. C. Parija, "Textbook of Microbiology & Immunology (Google eBook)," vol. 7, no. 2. 2014.

[40] H. Wang *et al.*, "Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli*

BL21 (DE3) under acetate stress: An alkaline ph shift approach," *PLoS One*, vol. 9, no. 11, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0112777.

[41] S. Ahmed, G. Mustafa, M. Arshad, and M. I. Rajoka, "Fungal Biomass Protein Production from Trichoderma harzianum Using Rice Polishing," *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/6232793.

[42] N. K. Lee, S. Y. Kim, S. Y. Choi, and H. D. Paik, "Probiotic *Bacillus subtilis* KU201 having antifungal and antimicrobial properties isolated from kimchi," *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 22, no. 5, pp. 1–5, Oct. 2013, doi: 10.1007/s10068-013-0225-3.

[43] H. Cawoy, W. Bettiol, P. Fickers, and M. Onge, "*Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases," in *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management*, 2011.

[44] L. H. Shi, K. Balakrishnan, K. Thiagarajah, N. I. Mohd Ismail, and O. S. Yin, "Beneficial properties of probiotics," *Trop. Life Sci. Res.*, vol. 27, no. 2, pp. 73–90, 2016, doi: 10.21315/tlsr2016.27.2.6.

[45] I. M. Banat *et al.*, "Microbial biosurfactants production, applications and future potential," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 87, no. 2. pp. 427–444, Jun. 2010, doi: 10.1007/s00253-010-2589-0.

[46] A. Schönbichler, S. M. Díaz-Moreno, V. Srivastava, and L. S. McKee, "Exploring the Potential for Fungal Antagonism and Cell Wall Attack by *Bacillus subtilis* natto," *Front. Microbiol.*, vol. 11, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00521.

[47] Ö. Baysal, M. Çalişkan, and Ö. Yeşilova, "An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici," *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, vol. 73, no. 1–3, pp. 25–32, 2008, doi: 10.1016/j.pmpp.2008.11.002.

[48] F. Alvarez *et al.*, "The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP 218 and ARP 23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 112, no. 1, pp. 159–174, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x.

[49] S. Vinodkumar, S. Nakkeeran, P. Renukadevi, and V. G. Malathi, "Biocontrol potentials of antimicrobial peptide producing *Bacillus* species: Multifaceted antagonists for the management of stem rot of carnation caused by Sclerotinia sclerotiorum," *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. MAR, Mar. 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00446.

[50] F. Cladera-Olivera, G. R. Caron, and A. Brandelli, "Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 38, no. 4, 2004, doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01478.x.

[51] J. C. Oscáriz, I. Lasa, and A. G. Pisabarro, "Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 178, no. 2, 1999, doi: 10.1016/S0378-1097(99)00370-5.

[52] C. Perez, C. Suarez, and G. R. Castro, "Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15," *J. Biotechnol.*, vol. 26, no. 2–3, 1992, doi:

10.1016/0168-1656(92)90017-4.

[53] Z. Ul Hassan, R. Al Thani, H. Alnaimi, Q. Migheli, and S. Jaoua, “Investigation and Application of *Bacillus licheniformis* Volatile Compounds for the Biological Control of Toxigenic *Aspergillus and Penicillium* spp,” *ACS Omega*, vol. 4, no. 17, pp. 17186–17193, Oct. 2019, doi: 10.1021/acsomega.9b01638.

[54] L. Zhi *et al.*, “Synthesis and Performance of Double-Chain Quaternary Ammonium Salt Glucosamide Surfactants,” *Molecules*, vol. 27, no. 7, p. 2149, 2022, doi: 10.3390/molecules27072149.

[55] W. Von Rybinski and K. Hill, “Alkyl Polyglycosides,” 2003, doi: 10.1201/9780203911730.ch2.

[56] A. Pradhan and A. Bhattacharyya, “Quest for an eco-friendly alternative surfactant: Surface and foam characteristics of natural surfactants,” *J. Clean. Prod.*, vol. 150, pp. 127–134, 2017, doi: 10.1016/j.jclepro.2017.03.013.

[57] Y. Lisans Tezi Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı Danışman and Y. Doç Füsun Ekmekyapar, “Anyonik ve katyonik yüzey aktif maddelerin toprak ortaminda parçalanabilirliklerinin tarla koşullarinda belirlenmesi,” Dilek OKYAY ÇELTİKLİ.

[58] N. Fatma, M. Panda, Kabir-ud-Din, and M. Beg, “Ester-bonded cationic gemini surfactants: Assessment of their cytotoxicity and antimicrobial activity,” *J. Mol. Liq.*, vol. 222, pp. 390–394, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.molliq.2016.07.044.

[59] X. Cui, S. Mao, M. Liu, H. Yuan, and Y. Du, “Mechanism of surfactant micelle formation,” *Langmuir*, vol. 24, no. 19, pp. 10771–10775, 2008, doi: 10.1021/la801705y.

[60] A. Karthick, B. Roy, and P. Chattopadhyay, “A review on the application of chemical surfactant and surfactant foam for remediation of petroleum oil contaminated soil,” *J. Environ. Manage.*, vol. 243, no. May, pp. 187–205, 2019, doi: 10.1016/j.jenvman.2019.04.092.

[61] H. Epstein, “Skin care products,” *Cosmet. Sci. Technol.*, 121, 2009.

[62] M. S. Kamal, I. A. Hussein, and A. S. Sultan, “Review on Surfactant Flooding: Phase Behavior, Retention, IFT, and Field Applications,” *Energy and Fuels*, vol. 31, no. 8, pp. 7701–7720, 2017, doi: 10.1021/acs.energyfuels.7b00353.

[63] M. Vehapi and D. Özçimen, “Antimicrobial and bacteriostatic activity of surfactants against *B. subtilis* for microbial cleaner formulation,” *Arch. Microbiol.*, vol. 203, no. 6, pp. 3389–3397, 2021, doi: 10.1007/s00203-021-02328-0.

[64] A. Tanveer, N. Abbas, M. E. Safdar, and R. M. Ikram, “O uso do sulfato de alquil éter na melhora da eficácia de herbicidas contra a ançarinha-branca e a corriola na cultura do trigo,” *Planta Daninha*, vol. 35, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1590/S0100-83582017350100084.

[65] R. L. Anderson, D. J. Bray, A. Del Regno, M. A. Seaton, A. S. Ferrante, and P. B. Warren, “Micelle formation in alkyl sulfate surfactants using dissipative particle dynamics,” *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 14, no. 5, pp.

2633–2643, 2018, doi: 10.1021/acs.jctc.8b00075.

[66] V. K. Bajpai, D., & Tyagi, "Fatty Imidazolines : Chemistry , Synthesis , Properties," *J Oleo Sci*, vol. 55, no. 7, pp. 319–329, 2006.

[67] M. Jadhav, R. S. Kalhapure, S. Rambharose, C. Mocktar, and T. Govender, "Synthesis, characterization and antibacterial activity of novel heterocyclic quaternary ammonium surfactants," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 47, pp. 405–414, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.jiec.2016.12.013.

[68] S. Sequeira, E. J. Cabrita, and M. F. Macedo, "Antifungals on paper conservation: An overview," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 74, pp. 67–86, 2012, doi: 10.1016/j.ibiod.2012.07.011.

[69] S. Le Guenic, L. Chaveriat, V. Lequart, N. Joly, and P. Martin, "Renewable Surfactants for Biochemical Applications and Nanotechnology," *J. Surfactants Deterg.*, vol. 22, no. 1, pp. 5–21, 2019, doi: 10.1002/jsde.12216.

[70] A. G. Kohli, C. L. Walsh, and F. C. Szoka, "Synthesis and characterization of betaine-like diacyl lipids: Zwitterionic lipids with the cationic amine at the bilayer interface," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 165, no. 2, pp. 252–259, 2012, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2012.01.005.

[71] R. Coşkun, K. Öncel, and Y. Akköz, "Multifunctional amphoteric resin to remove both anionic and cationic dyes from aqueous solution," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 138, no. 43, pp. 1–16, 2021, doi: 10.1002/app.51283.

[72] K. Abe, M. Toyofuku, N. Nomura, and N. Obana, "Autolysis-mediated membrane vesicle formation in *Bacillus subtilis*," *Environ. Microbiol.*, vol. 23, no. 5, pp. 2632–2647, 2021, doi: 10.1111/1462-2920.15502.

[73] S. Loyawattananan, "Characterization and application of alternative antimicrobial surfactants on food contact surface," (Doctoral dissertation, Kasetsart University), 2020.

[74] P. B. Cowles, "Alkyl Sulfates: Their Selective Bacteriostatic Action.," *Yale J. Biol. Med.*, vol. 11, no. 1, pp. 33–8, 1938, [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21433797%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2602013.

[75] Z. Baker, R. W. Harrison, and B. F. Miller, "Action of synthetic detergents on the metabolism of bacteria," *J. Exp. Med.*, vol. 73, no. 2, pp. 249–271, 1941, doi: 10.1084/jem.73.2.249.

[76] E. Paluch, J. Szperlik, Ł. Lamch, K. A. Wilk, and E. Obłąk, "Biofilm eradication and antifungal mechanism of action against *Candida albicans* of cationic dicephalic surfactants with a labile linker," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 8896, Apr. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-88244-1.

[77] A. D. Russell and F. R. C. Path, "Chlorhexidine: Antibacterial action and bacterial resistance," *Infection*, vol. 14, no. 5, pp. 212–215, 1986, doi: 10.1007/BF01644264.

[78] M. Bustelo, A. Pinazo, M. A. Manresa, M. Mitjans, M. P. Vinardell, and L. Pérez, "Monocatenary histidine-based surfactants: Role of the alkyl chain length in antimicrobial activity and their selectivity over red blood cells," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 532, pp. 501–509, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.04.017.

[79] J. Jiao, "Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 15, pp. 1663–1673, 2008, doi: 10.1016/j.addr.2008.09.002.

[80] H. A. Hong, J. M. Huang, R. Khaneja, L. V. Hiep, M. C. Urdaci, and S. M. Cutting, "The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus* indicus as food probiotics," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 105, no. 2, pp. 510–520, 2008, doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03773.x.

[81] F. N. Niyonzima, "Detergent-compatible bacterial cellulases," *J. Basic Microbiol.*, vol. 59, no. 2, pp. 134–147, 2019, doi: 10.1002/jobm.201800436.

[82] P. M. de Souza and P. de O. e Magalhães, "Application of microbial α-amylase in industry - a review," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 41, no. 4, pp. 850–861, 2010, doi: 10.1590/s1517-83822010000400004.

[83] R. M. Subasinghe *et al.*, "Bacterial and fungal composition profiling of microbial based cleaning products," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 116, 2018, doi: 10.1016/j.fct.2017.12.006.

[84] A. Vandini *et al.*, "Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products," *PLoS One*, vol. 9, no. 9, Sep. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0108598.

[85] P. André *et al.*, "Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* r14 against multidrug-resistant bacteria," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 38, pp. 704–709, 2007.

[86] M. M. Sankar, K. Gopinath, R. Singla, and S. Singh, "In-vitro antimycobacterial drug susceptibility testing of non-tubercular mycobacteria by tetrazolium microplate assay," *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 7, Jul. 2008, doi: 10.1186/1476-0711-7-15.

[87] A. Yilmaz, F. Bozkurt, P. K. Cicek, E. Dertli, M. Z. Durak, and M. T. Yilmaz, "A novel antifungal surface-coating application to limit postharvest decay on coated apples: Molecular, thermal and morphological properties of electrospun zein–nanofiber mats loaded with curcumin," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 37, pp. 74–83, 2016, doi: 10.1016/j.ifset.2016.08.008.

[88] J. P. Bohin, D. Rigomier, and P. Schaeffer, "Ethanol sensitivity of sporulation in *Bacillus subtilis*: a new tool for the analysis of the sporulation process," *J. Bacteriol.*, vol. 127, no. 2, 1976, doi: 10.1128/jb.127.2.934-940.1976.

[89] H. M. Nakata, "Effect of pH on intermediates produced during growth and sporulation of *Bacillus cereus*," *J. Bacteriol*., vol. 86, no. 3, pp. 577-581. [Online]. Available: http://jb.asm.org/.

[90] G. Prabakaran and K. Balaraman, "Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var israelensis," *Biol. Control*, vol. 36, no. 3, pp. 288–292, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.biocontrol.2005.09.018.

[91] R. Dulbecco and M. Vogt, "Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses," *J. Exp. Med.*, vol. 99, no. 2, 1954, doi: 10.1084/jem.99.2.167.

[92] A. Dagga, M. A. Aziz, A. Amnama, M. Al-Sharif and M. Hindi, "Isolation

and molecular characterization of cry gene for *Bacillus thuringiensis* isolated from soil of Gaza Strip." *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 5, no. 4, pp. 659-666, 2016, doi.org/10.20546/ijcmas.2016.504.075.

[93] S. Hussain, S. D. Lane, and D. N. Price, "A preliminary evaluation of the use of microbial culture filtrates for the control of contaminants in plant tissue culture systems," 1994.

[94] G. C. Baker, J. J. Smith, and D. A. Cowan, "Review and re-analysis of domain-specific 16S primers," *J. Microbiol. Methods*, vol. 55, no. 3, pp. 541–555, 2003, doi: 10.1016/j.mimet.2003.08.009.

[95] E. Dertli, E. Mercan, M. Arici, M. T. Yilmaz, and O. Sağdiç, "Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics," *Lwt*, vol. 71, pp. 116–124, 2016, doi: 10.1016/j.lwt.2016.03.030.

[96] A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck, "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 45, no. 4, 1966, doi: 10.1093/ajcp/45.4_ts.493.

[97] I. A and M. MT, "Evaluation of Selected Bacterial Endophytes for Biocontrol Potential against Phytophthora Blight of Bell Pepper (Capsicum annuum L.)," *J. Plant Pathol. Microbiol.*, vol. 08, no. 10, 2017, doi: 10.4172/2157-7471.1000424.

[98] J. Woo and J. Ahn, "Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 56, no. 4, 2013, doi: 10.1111/lam.12051.

[99] N. C. Gómez, J. M. P. Ramiro, B. X. V. Quecan, and B. D. G. de Melo Franco, "Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes, Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation," *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. JUN, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00863.

[100] M. C. Collado, J. Meriluoto, and S. Salminen, "Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 226, no. 5, 2008, doi: 10.1007/s00217-007-0632-x.

[101] V. Arutchelvan, V. Kanakasabai, R. Elangovan, S. Nagarajan, and V. Muralikrishnan, "Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis*," *J. Hazard. Mater.*, vol. 129, no. 1–3, pp. 216–222, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.jhazmat.2005.08.040.

[102] L. F. Posada-Uribe, M. Romero-Tabarez, and V. Villegas-Escobar, "Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 38, no. 10, pp. 1879–1888, 2015, doi: 10.1007/s00449-015-1428-1.

[103] M. Vehapi, A. T. Koçer, A. Yılmaz, and D. Özçimen, "Investigation of the antifungal effects of algal extracts on apple-infecting fungi," *Arch. Microbiol.*, vol. 202, no. 3, pp. 455–471, Apr. 2020, doi: 10.1007/s00203-019-01760-7.

[104] J. Jezewska-Frackowiak *et al.*, "Identification of bacterial species in probiotic consortiums in selected commercial cleaning preparations," *Acta*

Biochim. Pol., vol. 66, no. 2, pp. 215–222, 2019, doi: 10.18388/abp.2018_2782.

[105] W. Stone, J. Tolmay, K. Tucker, and G. M. Wolfaardt, "Disinfectant, soap or probiotic cleaning? Surface microbiome diversity and biofilm competitive exclusion," *Microorganisms*, vol. 8, no. 11, pp. 1–19, Nov. 2020, doi: 10.3390/microorganisms8111726.

[106] S. Messager, K. A. Hammer, C. F. Carson, and T. V. Riley, "Assessment of the antibacterial activity of tea tree oil using the European EN 1276 and EN 12054 standard suspension tests," *J. Hosp. Infect.*, vol. 59, no. 2, pp. 113–125, 2005, doi: 10.1016/j.jhin.2004.07.015.

[107] R. Pérez-Mohedano, N. Letzelter, and S. Bakalis, "Integrated model for the prediction of cleaning profiles inside an automatic dishwasher," *J. Food Eng.*, vol. 196, pp. 101–112, 2017, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.09.031.

[108] S. Hanoune, B. Djeghri-Hocine, Z. Kassas, Z. Derradji, A. Boudour, and M. Boukhemis, "Optimization of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 growth on whey and lupin based medium using response surface methodology," *Adv. J. Food Sci. Technol.*, vol. 9, no. 9, pp. 679–685, 2015, doi: 10.19026/ajfst.9.1759.

[109] L. Rowe and G. T. Howard, "Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the puriÿcation and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme," 2002. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/ibiod.

[110] A. C. Ritter, A. F. . Correa, F. F. Veras, and B. Adriano, "Characterization of *Bacillus subtilis* available as probiotics," *J. Microbiol. Res.*, vol. 8, no. 2, 2018.

[111] B. Hyronimus, C. Le Marrec, A. Hadj Sassi, and A. Deschamps, "Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 61, no. 2–3, pp. 193–197, 2000, doi: 10.1016/S0168-1605(00)00366-4.

[112] T. Ahmed *et al.*, "Identification of drug-resistant bacteria among export quality shrimp samples in Bangladesh," *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.*, vol. 15, no. 4, pp. 655–660, 2013, doi: 10.1093/ajcp/45.4_ts.493.

[113] Clsi, "M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition." [Online]. Available: www.clsi.org.

[114] V. La Fauci, "An innovative approach to hospital sanitization using probiotics: in vitro and field trials," *J. Microb. Biochem. Technol.*, vol. 07, no. 03, 2015, doi: 10.4172/1948-5948.1000198.

[115] M. D'accolti, I. Soffritti, M. Piffanelli, M. Bisi, S. Mazzacane, and E. Caselli, "Efficient removal of hospital pathogens from hard surfaces by a combined use of bacteriophages and probiotics: Potential as sanitizing agents," *Infect. Drug Resist.*, vol. 11, pp. 1015–1026, 2018, doi: 10.2147/IDR.S170071.

[116] F. J. Gatesoupe, "The use of probiotics in aquaculture," 1999. [Online]. Available: www.elsevier.nlrlocateraqua-online.

[117] A. Kumar, P. Saini, and J. N. Shrivastava, "Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*," *Indian J. Exp. Biol.*,

vol. 47, no. 1, 2009.

[118] S. Lertcanawanichakul, M., & Sawangnop, "A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species," *Walailak J. Sci. Technol.*, vol. 5, no. 2, pp. 161–171, 2008.

[119] F. N. Idris and M. M. Nadzir, "Antimicrobial activity of centella asiatica on *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis*," *Chem. Eng. Trans.*, vol. 56, no. May 2018, pp. 1381–1386, 2017, doi: 10.3303/CET1756231.

[120] H. Abriouel, C. M. A. P. Franz, N. Ben Omar, and A. Galvez, "Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 35, no. 1, pp. 201–232, 2011, doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x.

[121] J. R. Mateus, J. M. Marques, I. Dal'Rio, R. E. Vollú, M. R. R. Coelho, and L. Seldin, "Response of the microbial community associated with sweet potato (Ipomoea batatas) to *Bacillus safensis* and *Bacillus velezensis* strains," *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 112, no. 4, pp. 501–512, 2019, doi: 10.1007/s10482-018-1181-y.

[122] S. Rong, H. Xu, L. Li, R. Chen, X. Gao, and Z. Xu, "Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast," *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 162, no. November 2018, pp. 69–77, 2020, doi: 10.1016/j.pestbp.2019.09.003.

[123] A. Gajbhiye, A. R. Rai, S. U. Meshram, and A. B. Dongre, "Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 7, pp. 1187–1194, 2010, doi: 10.1007/s11274-009-0287-9.

[124] G. S. Chitarra, P. Breeuwer, M. J. R. Nout, A. C. Van Aelst, F. M. Rombouts, and T. Abee, "An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of Penicillium roqueforti conidiospores," 2002.

[125] V. Nithya and P. M. Halami, "Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources," *Ann. Microbiol.*, vol. 63, no. 1, pp. 129–137, 2013, doi: 10.1007/s13213-012-0453-4.

[126] I. V. Pinchuk *et al.*, "In vitro anti-Helicobacter pylori activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, no. 11, pp. 3156–3161, 2001, doi: 10.1128/AAC.45.11.3156-3161.2001.

[127] A. Algburi, S. A. Alazzawi, A. I. A. Al-Ezzy, R. Weeks, V. Chistyakov, and M. L. Chikindas, "Potential Probiotics *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 Co-Aggregate with Clinical Isolates of Proteus mirabilis and Prevent Biofilm Formation," *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 12, no. 4, pp. 1471–1483, 2020, doi: 10.1007/s12602-020-09631-0.

[128] Vijayalakshmi, K. Sushma, S. Abha, and P. Chander, "Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KC3 for amylolytic activity," *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma.*, vol. 2, no. 5, pp. 336–341, 2012, doi: 10.7763/ijbbb.2012.v2.128.

[129] M. S. Yeh, Y. H. Wei, and J. S. Chang, "Bioreactor design for enhanced

carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*," *Process Biochem.*, vol. 41, no. 8, pp. 1799–1805, 2006, doi: 10.1016/j.procbio.2006.03.027.

[130] Z. M. Chen *et al.*, "Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 85, no. 5, pp. 1353–1360, 2010, doi: 10.1007/s00253-009-2162-x.

[131] J. Li, J. J. Koh, S. Liu, R. Lakshminarayanan, C. S. Verma, and R. W. Beuerman, "Membrane active antimicrobial peptides: Translating mechanistic insights to design," *Front. Neurosci.*, vol. 11, no. FEB, pp. 1–18, 2017, doi: 10.3389/fnins.2017.00073.

[132] K. K. Brandt, M. Hesselsøe, P. Roslev, K. Henriksen, and J. Sørensen, "Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate on metabolic activity, growth rate, and microcolony formation of nitrosomonas and nitrosospira strains," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 6, pp. 2489–2498, 2001, doi: 10.1128/AEM.67.6.2489-2498.2001.

[133] M. K. GS Moon, WJ Kim, "Synergistic effects of Bacteriocin producing *Pediococcus acidilactici* K10 and organic acids on inhibiting *E. coli* Giseong te al," pp. 936–942, 2002.

[134] A. De Cesare *et al.*, "Impact of a probiotic-based cleaning product on the microbiological profile of broiler litters and chicken caeca microbiota," *Poult. Sci.*, vol. 98, no. 9, pp. 3602–3610, 2019, doi: 10.3382/ps/pez148.

[135] A. K. Patel, M. K. Deshattiwar, B. L. Chaudhari, and S. B. Chincholkar, "Production, purification and chemical characterization of the catecholate siderophore from potent probiotic strains of *Bacillus* spp.," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 1, pp. 368–373, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.008.

[136] A. L. Moyne, R. Shelby, T. E. Cleveland, and S. Tuzun, "Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 90, no. 4, pp. 622–629, 2001, doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01290.x.

[137] Ö. Baysal *et al.*, "A proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* species," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0053182.

[138] M. Leyva Salas, J. Mounier, F. Valence, M. Coton, A. Thierry, and E. Coton, "Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review," *Microorganisms*, vol. 5, no. 3, pp. 1–35, 2017, doi: 10.3390/microorganisms5030037.

[139] S. Todorova and L. Kozhuharova, "Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 7, pp. 1207–1216, 2010, doi: 10.1007/s11274-009-0290-1.

[140] F. Teng, C. Ouedraogo, and Y. C. Sie, "Strength improvement of a silty clay with microbiologically induced process and coir fiber," *J. Geoengin.*, vol. 15, no. 2, pp. 79–88, Jun. 2020, doi: 10.6310/jog.202006_15(2).2.

[141] P. Setlow, “Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know,” *J. Bacteriol.*, vol. 196, no. 7, pp. 1297–1305, 2014, doi: 10.1128/JB.01455-13.

[142] M. G. G. Guerrero, “Sporulation, structure assembly, and germination in the soil bacterium *Bacillus thuringiensis*: survival and success in the environment and the insect host, ” *Microbiol. Res.*, vol. 14, no. 2, pp. 466-491, 2023.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

[1] M. Vehapi and D. Özçimen, "Investigation of *B. subtilis* viability at different pH ranges for use in microbial cleaner formulation." EurasianBioChem 2020, Oral presentation. 2020

Makaleler

[1] M. Vehapi, B. İnan, S. Kayacan-Cakmakoglu, O. Sagdic, and D. Özçimen, "Optimization of Growth Conditions for the Production of *Bacillus subtilis* Using Central Composite Design and Its Antagonism Against Pathogenic Fungi," *Probiotics Antimicrob. Proteins*, no. 0123456789, 2022, doi: 10.1007/s12602-021-09904-2.

[2] M. Vehapi and D. Özçimen, "Antimicrobial and bacteriostatic activity of surfactants against *B. subtilis* for microbial cleaner formulation," *Arch. Microbiol.*, vol. 203, no. 6, pp. 3389–3397, 2021, doi: 10.1007/s00203-021-02328-0.

[3] M. Vehapi and D. Özçimen, "Investigation of *B. subtilis* viability at different pH ranges for use in microbial cleaner formulation." *Bull. Biotechnol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1-7, 2020.

Projeler

[1] Yıldız Teknik Üniversitesi ile Hayat Kimya San. A.Ş. İşbirliği Sanayi Doktora Projesi, Proje no: 118C075, Bursiyer.

Burslar

Tubitak 2244 Sanayi Doktora Bursu