

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİT VE ÇEVRESİNDEKİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS*
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI VE
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

ARZU SERTEL

KOCAELİ 2016

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

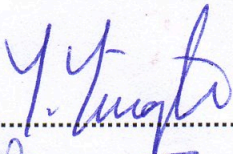
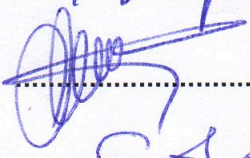

İZMİT VE ÇEVRESİNDEKİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN
BACILLUS TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
TANIMLANMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

ARZU SERTEL

Yrd.Doç.Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ
Danışman, Kocaeli Üniv.

Doç.Dr. Fikriye POLAT
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Yrd.Doç.Dr. Ayşe AVCI
Jüri Üyesi, Sakarya Üniv.


.....

.....

.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 27.12.2016

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bacillus cinsi bakteriler, Gram pozitif, çubuk şekilli, endospor oluşturan ve elverişsiz ortam koşullarına dirençli olan canlılardır. Besin gereksinimleri oldukça basit ve kolay üretilen bakterilerdir. Bazı suşları böcek larvalarına patojen etki gösterdiğinden zararlı canlılar ile mücadelede biyolojik kontrol ajanı olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca, yüksek miktarda enzim, antibiyotik ve toksin üretimini desteklediklerinden endüstriyel öneme sahiptirler. Bu çalışmada, İzmit ve çevresindeki topraklardan izole edilen *Bacillus* izolatlarının morfolojik, moleküler ve biyokimyasal karakterizasyonu ile literatüre yeni bulgular sunulmasından öte, biyoteknoloji alanında disiplinler arası çoklu iş birliklere ilham kaynağı olacağına inanılmaktadır.

“İzmit ve çevresindeki topraklardan izole edilen *Bacillus* türlerinin moleküler yöntemlerle tanımlanması ve biyokimyasal karakterizasyonu” adlı yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve görüşlerinden yararlandığım, danışmanım, Sayın Yrd. Doç. Dr. Yonca Yüzügüllü Karakuş’a, bu çalışmayı gerçekleştirirken laboratuvarında çalışmama müsaade eden Sayın Doç. Dr. Özlem Aksoy ve Yrd. Doç. Dr. Yonca Avcı Duman’a, çalışmamın filogenetik analiz kısmında sabırla ve titizlikle yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Fikriye Polat’a, desteklerini esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Semih Işık, Günce Göç, Sinem Balcı ve Melis Zengin’e ve Biyoloji Bölümündeki tüm arkadaşlarıma, *Bacillus* cinsine ait bakterilerin biyokimyasal tanımlama çalışmalarının yapılmasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan VITEK-MS (bioMérieux, Fransa) cihazının kullanılmasına izin veren Sayın Doç. Dr. Devrim Öztürk Dündar’a ve ekibine, tezimin değerlendirilmesi ve geliştirilmesinde yardımcı olan değerli jüri üyeleri hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

Tez çalışmamı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje Numarası: 2014/69) birimine de şükranlarımı sunarım.

Aralık - 2016

Arzu SERTEL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	3
1.1. <i>Bacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	3
1.2. <i>Bacillus</i> Cinsinde Endospor Oluşumu.....	4
1.3. <i>Bacillus</i> Kromozomal ve Plazmid DNA'ları.....	5
1.4. <i>Bacillus</i> 'ların Tanımlanmaları.....	7
1.4.1. Geleneksel tanımlama.....	7
1.4.2. Moleküler yöntemlerle tanımlama.....	8
1.4.2.1. 16S rRNA dizi analizi.....	8
1.4.2.2. Kısmi gyrA ve gyrB dizi analizleri.....	10
1.4.2.3. Cry gen varlığının tespiti.....	10
1.4.3. VITEK-MS (Kütle spektrometresi) ile tanımlama.....	11
1.5. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin Önemi ve Endüstrideki Yeri.....	11
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	14
2.1. Toprak Örneklerinin Alınması.....	14
2.2. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin İzolasyonu.....	14
2.3. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin Stok Kültürlerinin Hazırlanması.....	14
2.4. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin Koloni Morfolojilerinin Karşılaştırılması.....	15
2.5. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Moleküler Analizi.....	15
2.5.1. Primer tasarımı.....	15
2.5.2. Genomik DNA izolasyonu.....	16
2.5.3. Nükleik asit konsantrasyonunun belirlenmesi.....	16
2.5.4. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması.....	17
2.5.5. Kısmi gyrA gen bölgesinin çoğaltılması.....	18
2.5.6. Kısmi gyrB gen bölgesinin çoğaltılması.....	20
2.5.7. Restriksiyon enzimi ile kesim.....	20
2.5.8. Plazmid DNA izolasyonu.....	20
2.5.9. PZR ile cry gen belirlenmesi.....	21
2.5.10. Agaroz jel elektroforezi.....	22
2.5.11. DNA'nın jelden geri kazanımı.....	23
2.5.12. Sekans analizi.....	23
2.6. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	23
2.6.1. Gram boyama.....	23
2.6.2. IMViC testi.....	24
2.6.2.1. İndol testi.....	24
2.6.2.2. Metil kırmızısı (MR) testi.....	24
2.6.2.3. Voges - proskauer (VP) testi.....	25
2.6.2.4. Sitrat testi.....	25
2.6.3. Üç şekerli demir (TSI) agar testi.....	25
2.6.4. Jelatin ve nişasta hidroliz testi.....	26

2.6.5. Tirozin (Tyrosine) agar ve pH 5,6 agar besiyerlerinde büyütme.....	26
2.6.6. MYP (Mannitol egg yolk polymyxine) agar besiyerinde büyütme.....	26
2.6.7. Sıcaklığın ve pH'nın büyüme üzerine etkilerinin araştırılması	27
2.6.8. NaCl'nin büyüme üzerine etkisinin araştırılması.....	27
2.6.9. VITEK-MS (Kütle spektrometresi) ile tanımlama	27
2.7. Filogenetik Analiz	27
3. BULGULAR	28
3.1. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Koloni Morfolojilerinin Karşılaştırılması	28
3.2. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Moleküler Tanımlanması	30
3.2.1. İzolatlardan genomik DNA izolasyonu	30
3.2.2. İzolatlara ait 16S rRNA dizi analizleri	31
3.2.3. Y13 ve Y37 izolatlarının kısmi gyrA gen bölgelerinin dizi analizleri	37
3.2.4. Y1, Y5 ve Y6 izolatlarında kısmi gyrB gen bölgesinin dizi analizi ve Sau3AI ile kesimi.....	39
3.2.5. Y1 izolatında cry gen analizi	41
3.3. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Biyokimyasal Analizi.....	42
3.3.1. İzolatlarda gram boyama testi.....	42
3.3.2. İzolatlarda IMViC testi	43
3.3.3. İzolatlarda üç şekerli demir (TSI) agar testi.....	46
3.3.4. İzolatlarda jelatin ve nişasta hidroliz testi.....	46
3.3.5. Tirozin agar ve pH 5,6 agar besiyerlerinde büyüme yeteneklerinin analizi	48
3.3.6. MYP (Mannitol egg yolk polymyxine) agar besiyerinde büyüme potansiyelleri.....	48
3.3.7. Sıcaklık, pH ve NaCl'nin büyüme üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	49
3.3.8. VITEK-MS (Kütle spektrometresi) analizi.....	52
3.4. Filogenetik Analizlerin Karşılaştırılması	52
4. TARTIŞMA.....	58
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	64
EKLER	70
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	93
ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	<i>Bacillus</i> cinsinde spor oluşumu	5
Şekil 1.2.	VITEK-MS ile tanımlama basamakları	11
Şekil 2.1.	Saklama örnekleri.....	15
Şekil 3.1.	İzolatların Nutrient Agar üzerinde gelişen kolonilerinin görüntüleri.....	30
Şekil 3.2.	İzolatlara ait kromozomal DNA'ların 16S rRNA gen bölgelerinin PZR sonrası agaroz jel görüntüleri	33
Şekil 3.3.	Jelden ekstrakte edilmesi gereken izolatlara ait 16S rRNA PZR ürünlerinin (a) ve ekstrakte edilen hedef DNA'ların (b) agaroz jel görüntüleri	34
Şekil 3.4.	Y13 ve Y37 izolatlarına ait kısmi <i>gyrA</i> gen bölgelerinin PZR sonrası (a) ve jelden ekstrakte edilen Y37 izolatına ait hedef DNA'nın (b) agaroz jel görüntüleri.	38
Şekil 3.5.	Y1, Y5 ve Y6 izolatlarına ait kromozomal DNA'nın kısmi <i>gyrB</i> gen bölgesinin PZR sonrası agaroz jel görüntüsü	40
Şekil 3.6.	Y1, Y5 ve Y6 izolatlarına ait kısmi <i>gyrB</i> PZR ürünlerinin <i>Sau3AI</i> enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü	41
Şekil 3.7.	Y1 izolatına ait <i>cry</i> gen bölgesinin PZR sonrası agaroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 3.8.	İndol testi sonuçları.....	43
Şekil 3.9.	Metil Kırmızısı (Red) testi sonuçları	44
Şekil 3.10.	Voges-Proskauer testi sonuçları	44
Şekil 3.11.	Sitrat testi sonuçları	45
Şekil 3.12.	Üç şekerli demir agar test sonuçlarının görüntüleri	46
Şekil 3.13.	Jelatin hidroliz testi sonuçları	47
Şekil 3.14.	Nişasta hidrolizasyon testi sonuçları	47
Şekil 3.15.	Y35, Y38 ve Y47 izolatlarının Tirozin (a) ve pH 5,6 (b) agar besiyerlerindeki görüntüleri	48
Şekil 3.16.	Farklı <i>Bacillus</i> izolatlarına ait MYP Agar besiyerindeki morfolojileri	49
Şekil 3.17.	Y1 izolatının 16S rRNA (a) ve kısmi <i>gyrB</i> (b) gen bölgelerine ait filogenetik ağaçları	53
Şekil 3.18.	Y7 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait filogenetik ağacı	53
Şekil 3.19.	Y12 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait filogenetik ağacı	54
Şekil 3.20.	Y13 izolatının 16S rRNA (a) ve kısmi <i>gyrA</i> (b) gen bölgelerine ait filogenetik ağaçları	54
Şekil 3.21.	Y15 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait filogenetik ağacı	55
Şekil 3.22.	Y35 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait filogenetik ağacı	55
Şekil 3.23.	Y37 izolatının 16S rRNA (a) ve kısmi <i>gyrA</i> (b) gen bölgelerine ait filogenetik ağaçları	56
Şekil 3.24.	Y38 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait filogenetik ağacı	56
Şekil 3.25.	Y47 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait filogenetik ağacı	57

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1.	<i>Bacillus</i> izolatlarının filogenetik karakterizasyonunu gerçekleştirebilmek üzere Polimeraz Zincir Reaksiyon'unda kullanılan primerler	15
Tablo 2.2.	16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı I.....	17
Tablo 2.3.	16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı II.....	17
Tablo 2.4.	16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı III.....	18
Tablo 2.5.	16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı IV	18
Tablo 2.6.	16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR döngüsü.....	18
Tablo 2.7.	Kısmi <i>gyrA</i> gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı V	19
Tablo 2.8.	Kısmi <i>gyrA</i> gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı VI	19
Tablo 2.9.	Kısmi <i>gyrA</i> gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR döngüsü 1.....	19
Tablo 2.10.	Kısmi <i>gyrA</i> gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR döngüsü 2.....	20
Tablo 2.11.	Kısmi <i>gyrB</i> gen bölgeleri çoğaltılan izolatların restriksiyon enzimi - <i>Sau3AI</i> (NEB) ile kesimi için kullanılan reaksiyon karışımı.....	20
Tablo 2.12.	<i>cry</i> gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı.....	21
Tablo 2.13.	<i>cry</i> gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR döngüsü.....	22
Tablo 3.1.	İzolatların koloni morfolojilerinin karşılaştırılması.....	28
Tablo 3.2.	İzolatlara ait kromozomal DNA konsantrasyonları	31
Tablo 3.3.	İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin PZR sonrası genomik DNA konsantrasyonları	32
Tablo 3.4.	İzolatların 16S rRNA BLAST sonuçları	35
Tablo 3.5.	Y13 ve Y37 izolatlarına ait kısmi <i>gyrA</i> gen bölgelerinin PZR sonrası genomik DNA konsantrasyonları	38
Tablo 3.6.	Y13 ve Y37 izolatlarının kısmi <i>gyrA</i> BLAST sonuçları.....	39
Tablo 3.7.	Y1, Y5 ve Y6 izolatlarına ait kısmi <i>gyrB</i> gen bölgesinin PZR sonrası genomik DNA konsantrasyonları	39
Tablo 3.8.	Y1 izolatına ait kısmi <i>gyrB</i> BLAST sonuçları	40
Tablo 3.9.	Y1 izolatına ait plazmid DNA konsantrasyonu	41
Tablo 3.10.	İzolatların gram boyama sonuçları ve hücre şekillerinin karşılaştırılması	43
Tablo 3.11.	IMViC testlerinin sonuçları	45
Tablo 3.12.	Üç şekerli demir agar testi sonuçları	46
Tablo 3.13.	Farklı <i>Bacillus</i> izolatlarının MYP Agar besiyerindeki sonuçları	49
Tablo 3.14.	İzolatların farklı sıcaklık, pH ve NaCl tolerans sonuçları	51
Tablo 3.15.	İzolatlara ait VITEK-MS sonuçları.....	52
Tablo 5.1.	Bakteriyel izolatların tür tayini sonuçları	62
Tablo 5.2.	Tanımlanan izolatlara ait GenBank numaraları	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
=	: Eşittir
≤	: Daha küçük veya eşit
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
cm	: Santimetre
g	: Gram
l	: Litre
M	: Molar
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
ng/µl	: Nanogram/mikrolitre
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
T _m	: Erime sıcaklığı
U	: Unit/Enzim birimi
U/µl	: Unit/mikrolitre
α	: Alfa

Kısaltmalar

16S rRNA	: 16S Ribozomal RNA
bç	: Baz Çifti
cry	: Crystal (Kristal)
dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleozit Trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
gyrA/B	: Gyrase (Giraz)
H ₂ S	: Hidrojen Sülfür
HCl	: Hidroklorik Asit
Kbç	: Kilo Baz Çifti
KOH	: Potasyum Hidroksit
Mbç	: Mega Baz Çifti
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
MR	: Methyl Red (Metil Kırmızısı)
MS	: Mass Spectrometry (Kütle Spektrometresi)
MYP	: Mannitol Egg Yolk Polymyxine (Mannitol Yumurta Sarısı Polimiksin)
NA	: Nutrient Agar (Katı Besiyeri)
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NB	: Nutrient Broth (Sıvı Besiyeri)

OD	: Optical Density (Optik Yoğunluk)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PZR-RFLP	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Parça Uzunluk Polimorfizmi
RAPD-PZR	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PZR
Rcf	: Relative Centrifugal Force (Rölatif Santrifüj Gücü)
RNA	: Ribo Nükleik Asit
Rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sn.	: Saniye
subsp.	: Subspecies (Alt tür)
TAE	: Tris Asetat EDTA
TSI	: Triple Sugar Iron (Üç Şekerli Demir)
UV	: Ultra Viyole
var.	: Varyete
VP	: Voges-Proskauer

İZMİT VE ÇEVRESİNDEKİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Araştırmada, İzmit ve çevresindeki topraklardan alınan örnekler; pastörizasyon işleminden sonra seri seyreltmeler hazırlanarak, nutrient agar plaklara yayma ekim yapıldı. Morfolojik olarak birbirinden farklı olan koloniler tek tek seçilip, tekrar yayma ekimle saflaştırıldı ve numaralandırıldı. Buna göre 45 izolat belirlendi. Öncelikle izolatların koloni morfolojileri karşılaştırıldı ve benzer olanlar gruplandırıldı. Daha sonra, moleküler düzeyde tanımlanmaları amacıyla korunmuş bir gen bölgesi olan ve sınıflandırmada yaygın olarak kullanılan 16S rRNA (16S rDNA) gen dizi analizleri gerçekleştirildi. Yakın akraba olanları birbirinden ayırmak için ilave moleküler (kısmi gyrB gen bölgesinin Sau3AI enzimi ile muamele edilmesi, kısmi gyrA gen bölgesi dizi analizi, "cry" gen varlığı) ve biyokimyasal analizler yapıldı. Filogenetik analizler ise NJ (neighbour-joining) metodu ile gerçekleştirildi. Morfolojik, moleküler, biyokimyasal ve filogenetik analizlerin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; toplam 45 izolattan 20 tanesinin *Bacillus* cinsine ait olmadığı gözlenirken, geriye kalan 25 izolattan birbirine benzer olanlar aynı grup altında toplanarak her bir gruptan en az bir izolat seçildi ve 9'u (Y1; *B. cereus*, Y7; *B. pumilus*, Y12; *B. megaterium*, Y13 ve Y37; *B. methylotrophicus*, Y15; *B. subtilis*, Y35; *B. licheniformis*, Y38 ve Y47; *B. sonorensis*) tür düzeyinde tanımlandı. Sonuç olarak; endüstriyel öneme sahip *Bacillus* cinsi bakterilerden elde edilen bu türlerin, endüstriyel biyoteknoloji alanında başta özgün enzim ya da toksin üretimi, ilaç ham maddelerinin sentezi olmak üzere farklı çalışmaların yapılmasına olanak sağlayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: 16S rRNA, *Bacillus*, Biyokimyasal Test, GyrA, GyrB.

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF *BACILLUS* SPECIES ISOLATED FROM IZMIT AND SURROUNDING SOIL BY USING MOLECULAR METHODS

ABSTRACT

In the study, soil samples were collected from Izmit and the surrounding lands and spread onto nutrient agar plates after pasteurization process followed by serial dilutions. Colonies that are morphologically different from each other were selected one by one and purified by re-streaking, numbered. Accordingly, 45 isolates were documented. Colony morphologies of the isolates were compared and similar ones were grouped. After that 16S rRNA (16S rDNA) gene sequence analysis which is a conserved gene region and is widely used in classification, was performed in order to identify the molecular level of the isolates. To discriminate the members of closely related taxa, additional molecular (restriction digestion of *gyrB* gene with *Sau3AI* enzyme, partial *gyrA* gene sequence analysis and the analysis of *cry* gene) and biochemical analysis were carried out. Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining (NJ) method. When morphological, molecular, biochemical and phylogenetic analysis results were evaluated altogether, 20 of 45 isolates were found not to belong to the genus *Bacillus*, the remaining 25 isolates were grouped according to their similarities, one isolate from each group was selected as representative and 9 of 25 isolates (Y1; *B. cereus*, Y7; *B. pumilus*, Y12; *B. megaterium*; Y13 and Y37; *B. methylotrophicus*, Y15; *B. subtilis*, Y35; *B. licheniformis*, Y38 and Y47; *B. sonorensis*) were identified to the species level. As a result, the isolated and identified *Bacillus* species here are believed to promote many studies including novel enzyme or toxin production, synthesis of pharmaceutically important compounds in industrial biotechnology field.

Keywords: 16S rRNA, *Bacillus*, Biochemical Test, *GyrA*, *GyrB*.

GİRİŞ

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri sebebiyle dikkat çeken mikroorganizmalardır (Rosovitz ve diğ., 1998; Wipat ve Harwood, 1999; Öztürk, 2007). Ayrıca, sporlanma kabiliyetleri ve metabolizma faaliyetlerinin çeşitliliği geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır (Wipat ve Harwood, 1999; Öztürk, 2007). Spor oluşturma kabiliyetlerinden dolayı geniş yayılım gösterdiklerinden farklı habitatlardan izole edilebilirler. Yaygın buldukları temel alan toprak olmasına rağmen bitki rizosferi, su, çeşitli gıdalar veya bazı canlıların bağırsak sistemlerinde de bu cins bakterilere rastlanmıştır (Burke ve diğ., 1983; Chilcott ve Wigley, 1993; Young ve diğ., 1995).

Bacillus türleri endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, *B. licheniformis* ve *B. polymyxa* türleri sırasıyla basitrasın ve polimiksin antibiyotik üretiminde tercih edilmektedir. *B. subtilis*, *B. amiloliquefaciens* ve *B. stearothermophilus* (*Geobacillus stearothermophilus*), bakteriyel α -amilaz enzim üretiminde kullanılmakta olup amiloz ve amilodekstrini dekstrinlere parçalamaktadırlar (Kalkan ve Halkman, 2006a). *B. megaterium* ve *B. cereus* doğada parçalanabilen bir biyoplastik maddesi olan polihidroksibütirik asit (PHB) üretmektedirler (Kalaylı ve Beyatlı, 2003). *B. subtilis*, *B. mesentericus* ve *B. stearothermophilus* ise bakteriyel proteaz enzimi üretiminde kullanılmaktadır. Bu enzim et ve balık etlerinin tenderize edilmesinde (yumuşatılması), şarap ve bira endüstrisinde protein bulanıklığının alınmasında stabilize edici olarak kullanılmakta olduğu belirtilmiştir (Kalkan ve Halkman, 2006a).

Yüksek miktarlarda antibiyotik, enzim ve toksin üretimine olanak sağlamaları açısından endüstriyel öneme sahip olan *Bacillus* cinsi bakterilerin birçoğu ayrıca çeşitli böcek larvalarına patojenik etki göstermekte ve bu nedenle günümüzde biyolojik kontrol ajanı olarak da kullanılmaktadır. Bunun sebepleri arasında bu bakterilerin toprakta bol miktarda bulunmaları, çeşitli biyolojik aktif metabolitleri üretmeleri ve dirençli spor formlarını oluşturma yetenekleri gelmektedir. Bunların yanında böceklerle mücadelede kimyasal ajanların (insektisit) yetersiz kalmaları ve insan sağlığını tehdit eder duruma gelmesi bu tip biyolojik ajanlara ihtiyacı vurgulamaktadır (Rosovitz ve diğ., 1998).

Bacillus cinsi bakterilerin tanımlanmalarında klasik biyokimyasal ve fizyolojik yöntemler kullanılmasına rağmen bazı izolatların bu yöntemlerle kesin olarak tanımlanması yapılamamaktadır. Özellikle de *B. cereus* grubu bakterilerin (*B. thuringiensis*, *B. mycoides* ve *B. anthracis*) sınıflandırılmaları tartışmalıdır. Birçok araştırmacı birbirine yakın olan bu türlerin *B. cereus*'un üyesi olarak gruplandırılabilenliğini ileri sürmüşlerdir (Chang ve diğ., 2003).

Türler arasındaki farklılıklar ve benzerlikler; Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), 16S rRNA (16S ribozomal RNA) dizi analizi, DNA-DNA hibridizasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Parça Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PZR (RAPD-PZR), toplam hücre proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) gibi moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmeye çalışılmaktadır (Öztürk, 2007).

Bu çalışmada, topraktan izole edilen farklı *Bacillus* türlerinin moleküler yöntemlerle tanımlanmaları, morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyonlarının çalışılması hedeflendi. Bu amaçla, İzmit ve çevresindeki topraklardan (Kocaeli Üniversitesi Kampüsü, Yuvacık Baraj Yolu üzerindeki tarlalar ve dere kenarı, Kent Ormanı) izole edilen *Bacillus* cinsine ait bakterilerin tek koloniden çoğaltımları gerçekleştirilerek, koloni morfolojileri karşılaştırılıp, çalışma süresi boyunca saklanmaları için stok kültürleri hazırlandı. İzolatların genomik DNA'ları izole edilerek filogenetik karakterizasyonda kullanılmak üzere 16S rRNA dizilerinin PZR yöntemi ile elde edilmesi üzerine optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. 16S rRNA gen bölgesi ile tanımlanamayan izolatlar için ilave moleküler (kısmi *gyrB* gen bölgesinin Sau3AI enzimi ile muamele edilmesi, kısmi *gyrA* gen bölgesi dizi analizi, "cry" gen varlığı) analizler yapıldı. Bu sonuçları desteklemesi amacıyla biyokimyasal testler uygulandı. Ayrıca, izolatların biyokimyasal analizinde Üniversitemiz Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında bulunan VITEK-MS cihazı (bioMérieux, Fransa) kullanılarak hizmet alımı yapıldı. Son olarak; moleküler ve biyokimyasal tanımlaması yapılan izolatların filogenetik ilişkileri incelendi.

Teşhis ve sınıflandırılması yapılan, endüstride kullanım alanı oldukça geniş olan ve kolay üretilen *Bacillus* cinsi bakterilerden oluşan bir kültür koleksiyonu üniversitemizde yapılacak ilk çalışma olma özelliğini göstermesi sebebiyle hem özgündür hem de sadece literatüre yeni bulgular sunmasından öte, biyoteknoloji alanında disiplinler arası çoklu iş birliklere ilham kaynağı olacağına inanılmaktadır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. *Bacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Bakteriler temel olarak hücre şekillerine, yaşadıkları ortama, beslenme şekillerine ve gram boyama özelliklerine göre farklı sınıflandırmaya tabi tutulurlar. Endospor oluşturan *Bacillaceae* familyası gram negatif anaerob bakterilerden (*Desulfotomaculum* cinsi) gram pozitif aerob koklara (*Sporosarcina* cinsi) kadar değişebilen bir yelpaze içinde farklı özellikleri gösteren, çeşitli bakteri cinslerini içermektedir. Bu familyanın temel cinsleri ise *Bacillus* ve *Clostridium*'dur. (Alfredo ve diğ., 1999; Yedidağ, 2011).

Bacillus adı, 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından ilk defa kullanılmıştır (Lin, 1997). *Bacillus*, diğer *Bacillaceae* cinslerinden katalaz üretimi ve aerob endospor oluşturmaları ile ayrılmaktadır. Gram pozitif (bazı türleri değişken), çubuk şekilli, aerobik veya fakültatif anaerobik, endospor oluşturan bakterilerden oluşur (Ayhan, 2000). Vejetatif hücreler, tek başına veya zincir şeklinde bulunabilir. Yuvarlak veya köşeli şekilde biten hücrelerin büyüklükleri 0,5x1,2 µm'den 2,5x10 µm'ye değişmektedir (Sneath, 1986; Rosovitz ve diğ., 1998).

Bacillus cinsi bakterilerin hücrelerinde genelde sitoplazmik membran üzerinde bir veya birkaç anyonik polimer ve birkaç peptidoglikan tabaka ile örtülü hücre duvarı bulunmaktadır. Bazı *Bacillus* türleri hücre duvarının dışında jelatinöz, viskoz, elastik veya mukoid karakterde olan, hücre duvarından ayrı olarak kapsül içermektedirler. *Bacillus anthracis*'de bulunan kapsül virülans etkiye sebep olmaktadır (Sneath, 1986; Rosovitz ve diğ., 1998; Arda, 2000). *B. anthracis* türünün poly - D - glutamik asit'ten oluşan kapsülü, şarbonda virülansın başlıca belirleyici etkenidir. *B. cereus* ve *B. thuringiensis* gibi *B. anthracis*'e en yakın türler tarafından kapsül sentezlenmez ve bu tür ayrımında kullanılır (URL-1).

Ayrıca, bazı *Bacillus* cinsine ait türlerde hareketi sağlayan ince, uzun, dalgalı, fleksibilitesi fazla, sarmal yapıda flagellum organeli bulunmaktadır. *B. anthracis*'de flagellum bulunmazken, *B. cereus* ve *B. subtilis* türlerinde fazlaca flagellum bulunmaktadır (Sneath, 1986; Rosovitz ve diğ., 1998; Arda, 2000).

Bacillus cinsi bakterilerin asıl habitatları toprak olmasına rağmen sporları nedeniyle biyosferde birçok farklı çevreden izole edilebilirler. Toprak mikroflorasında yer alan *Bacillus* türleri besin maddeleri açısından zengin topraklarda bulunabildikleri gibi, besince fakir topraklardan da izole edilebilirler. Örneğin; *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. cereus* türleri karmaşık besin maddelerine ihtiyaç duymazken, *B. polymyxa* ve *B. azotofixans* türleri ise gelişmek için bitki rizosferine ihtiyaç duyarlar (Massle, 1985; Sneath, 1986)

Optimum büyüme sıcaklıkları 25°C ile 37°C arasında değişmesine rağmen termofilik ve psikrofilik türleri 75°C'den daha yüksek ve 3°C'den daha düşük sıcaklıklarda büyüebilme yeteneğine sahiptirler. Bazı türleri de pH'sı 2-10 arasında değişen asidik ve alkali ortamlarda gelişebilirler (Sneath, 1986).

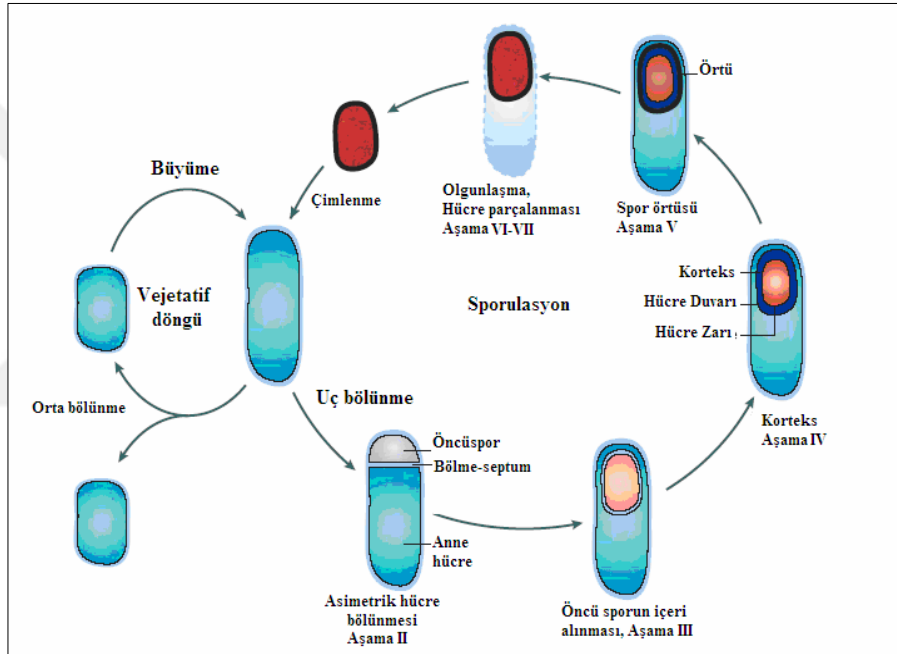
Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürer. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol, azot kaynağı olarak da amonyum içeren sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Kaynar ve Beyatlı, 2006).

Bacillus cinsi bakterilerin koloni morfolojileri çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Besiyeri çeşidi, koloninin yaşı gibi özelliklere göre, yarı şeffaf, opak, düzgün ya da pürüzlü koloniler görülebilir. Koloni renkleri ise, kreme yakın beyazdan sarıya doğru değişiklik gösterebilir. Çoğu *Bacillus* türü pigment oluşturmazken bazı türleri farklı besiyerlerinde sarı, yeşil, mavi-siyah vb. pigmentler üretebilirler (Rosovitz ve diğ., 1998; Ustaçelebi, 1999).

1.2. *Bacillus* Cinsinde Endospor Oluşumu

Bacillus cinsine ait türlerin en önemli özelliklerinden biri büyüme evresinin durgun fazında besin maddelerinin azalmasına bağlı olarak endospor oluşturmalarıdır. Endosporlar sıcaklık, kuraklık, basınç ve birçok kimyasal dezenfektana karşı oldukça dayanıklı yapılar olduklarından ancak 15-20 dakika 120°C sıcaklığa maruz bırakıldıklarında canlılıklarını kaybederler. Sporların içlerindeki sıvı miktarının az olması, dayanıklı olmalarındaki en önemli nedenlerden biridir. Endosporların hücredeki yeri ve şekli türler arasında farklılık gösterirken genellikle silindirik, elipsoidal, oval veya yuvarlak olup hücre içinde merkeze yakın veya uç kısımlarda bulunabilirler (Koneman, 2006).

Endospor oluşumu şu şekilde özetlenebilir. Çevresel stres koşullarında çekirdek ikiye bölünerek birbirinden zarsı bir bölme ile ayrılır. Bölmenin büyümesiyle öncü spor içeri alınarak çift tabakalı zar içerisinde kalır. İki zar arasında peptidoglikan yapıda korteks tabakası oluşur. Korteks tabakası kalınlaşır ve dipikolinik asit şelatlama özelliği ile Ca^{+2} iyonlarını tutar. Böylece spordaki su molekülleri dışarı atılarak içerindeki sıvı miktarı azaltılmış olur. Endosporlar karbohidrat, aminoasit ve su gibi uyarıcıların olduğu ortamlarda çimlenmeye başlar. Enzimlerin aktifleşmesiyle korteks tabakası sindirilir, Ca^{+2} iyonları ve dipikolinik asit serbest bırakılır. Ardından RNA sentezinin başlamasıyla yeni vejetatif hücre oluşur (Şekil 1.1) (Koneman, 2006; Demeli, 2012).



Şekil 1.1. *Bacillus* cinsinde spor oluşumu (Errington, 2003)

1.3. *Bacillus* Kromozomal ve Plazmid DNA'ları

Prokaryotlarda kromozomal DNA genellikle çift iplikli tek bir halkasal DNA molekülünden oluşmaktadır (URL-2).

Bacillus genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılan *B. subtilis* türü oldukça iyi tanımlanmış olup, genom büyüklüğünün 4,2 Mbç olduğu ve 4100 protein kodlayan gene sahip olduğu bildirilmiştir (Wipat ve Harwood, 1999).

Takeo ve diğ. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. cereus* NC7401'in kromozom büyüklüğünün yaklaşık olarak 5,2 Mbç, G+C oranının yaklaşık %35,6 olduğu ve 5 plazmid (270, 48, 5, 4, ve 3 kb büyüklüğünde) içerdiği rapor edilmiştir.

Li ve diğ. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada ise; *B. thuringiensis* HD521'in kromozom büyüklüğünün yaklaşık olarak 5,4 Mbç uzunluğunda, G+C oranının %35,28 olduğu ve 6 plazmid içerdiği rapor edilmiştir.

Plazmidler bütün bakteri hücrelerinde kromozomdan bağımsız olarak taşınan, bakterinin ortama uyumunda ve evrimde önemli bir yere sahip olan esas kalıtsal materyalin dışındaki DNA molekülleridir. Hemen hemen bilinen bütün plazmidler çift zincir DNA taşırlar. Plazmidlerin çoğu halkasal olmakla birlikte, çok sayıda doğrusal plazmid olduğu da bilinmektedir. Plazmidler, replikasyon orjinine sahiptir ve bağımsız olarak replike olabilirler. Plazmidlerin sayısı ve büyüklükleri türlere göre değişiklik gösterse de, hücre içindeki kopya sayıları düzenlenme mekanizmaları ile sıkı bir biçimde kontrol altında tutulmaktadır (Demeli, 2012).

Plazmidler taşıdıkları genlere ve bakterinin fenotipine yaptıkları katkıya göre adlandırılırlar (eşey plazmidi, direnç plazmidi). Plazmid DNA'ları üzerinde bakterinin yaşamsal işlevlerini yürütmesinden sorumlu genler bulunmaz. Bazı koşullar altında konakçıya gerekli ya da yararlı olan proteinleri kodlayan genleri taşırlar ve içinde buldukları hücreye ortamda üstün hale gelebileceği özellikleri kazandırılırlar. Örnek olarak; antibiyotik direnci, virülans özellik, organik bileşiklerin parçalanması gibi aktiviteler verilebilir (Albayrak, 2007). Bazı plazmidler ise, fenotipte gözlenmeyen özelliklere dair genlere sahiptir, bunlara kriptik plazmidler denir. Kendi kendine transfer olabilen veya konjugatif plazmidler, içerdikleri *tra* genleri sayesinde, diğer tür veya bakteriyel suşlara çıkardıkları kopyaları transfer edebilme yeteneğindedirler. Diğer bazı plazmidler ise, kendi transferleri için yetenekli olmasalar da, bazı bakteriyel hücrelerde bulunan konjugatif plazmidlerin fonksiyonlarından yararlanırlar (Woodford ve Johnson, 1998; Yılmaz, 2003; Öztürk, 2007).

Bazı *Bacillus* cinsine ait türlerin antibiyotiklere karşı direnç özelliği taşıyan plazmidler bulunduması, rekombinant DNA çalışmalarında "vektör" olarak kullanılabilmelerine ve birçok çalışma için aranan organizmalar olmalarına neden olmuştur (Tanaka ve diğ., 1977; Yoshimura ve diğ. 1983; Bodorova-Urgosikova ve diğ., 1992; Chang ve diğ., 2003).

Yapılan çalışmalarda genelde *Bacillus* cinsine ait türlerin içerdiği plazmidlerin kriptik plazmidler olduğu rapor edilmiş olmasına rağmen *B. thuringiensis*'in bir plazmidinin insektisidal kristal proteinin üretimiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Tanaka ve diğ., 1977; Yoshimura ve diğ., 1983).

B. thuringiensis'in toksin genleri ve *B. anthracis*'in antraks toksin genleri plazmidler üzerinde yer aldığı için *B. cereus* grubunun plazmidleri grup üyelerinin tanımlanmasında önemli bir faktördür (Tourasse ve diğ., 2006).

1.4. *Bacillus*'ların Tanımlanmaları

1.4.1. Geleneksel tanımlama

Bacillus sınıflandırmasının temeli Edinburgh'da çalışan Tom GIBSON ve Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illionis'den Ruth GORDON ve Nathan SMITH tarafından kurulmuştur. Smith ve arkadaşları 150'den fazla türü temsil eden 1134 suş belirlemiş ve bunları sadece 19 tür altında toplamışlardır. Daha sonra ortak monograf suş ve türlerin tanımlanması bütün metodolojilerin tamamlanmasıyla sağlanmış ve bu çalışma, basillerin tanımlanması ve izolasyonu için öncül referans olmuştur (Gordon ve diğ., 1973; Demeli, 2012).

Gibson ve Gordon aynı zamanda *Bacillus* cinsi bakterilerin morfolojik gruplandırmasında endosporun şeklini ve ana hücrenin pozisyonunu kullanmışlardır ve bu şekilde 3 grupta toplamışlardır. Birinci grupta kendi içinde A ve B alt grubu olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki grup şişkin olmayan sporangium içermekte ve Gram pozitif boyanmaktadır. Sporları elips veya silindirik şekilli, hücre içinde merkezi veya uç konumda bulunurlar. A ve B alt grupları arasındaki temel fark hücre büyüklükleridir. *B. megaterium* ve *B. cereus*, A alt grubunda bulunan bakterilere örnek olup bunlar 1 µm'den küçüktürler. B alt grubundakiler ise boyutları 1µm'den büyük olan *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus* ve *B. coagulans* türlerini içermektedir. Klinik olarak önemli *Bacillus* izolatlarının çoğu birinci grupta yer alır. İkinci grupta yer alan türler şişkin bir sporangiuma sahip olup sporları elips şeklinde merkezde veya uç kısımda bulunur. *B. circulans*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. popillae*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. alvei*, *B. stearothermophilus* ve *B. brevis* bu grupta bulunan başlıca türlerdir. Üçüncü grup Gram değişken ve heterojen *B. sphaericus* türlerince baskındır. Sporangiumları şişkindir ve küresel sporları uç kısımda ya da uca yakın yerde bulunur (Kalaylı ve Beyatlı, 2003; Öztürk, 2007).

İlk olarak bir izolat bu gruplardan birine ayrıldığında ikinci olarak fizyolojik ve biyokimyasal testler kullanılarak tür seviyesinde tanımlaması yapılmaya çalışılır.

Bakterilerin tanımlanmasında morfolojik özelliklerden olan gram reaksiyonu, koloni morfolojisi, endosporun şekli ve yeri, hareketlilik vb. özelliklerinden yararlanılır. Mikroorganizmaların fizyolojik ve metabolik özellikleri içerisinde mikroorganizma enzimleri, transport proteinlerinin yapı ve aktiviteleri ayrıca hücre çeperi yapısı, enerji kaynakları, fermantasyon ürünleri, oksijen istekleri, ikincil metabolitler, metabolik inhibitörler ve antibiyotik duyarlılık testleri de girer. Bunun yanında katalaz üretimi, indol, metil kırmızısı (red), VP ve sitrat testleri, özel besiyerlerinde büyüme, farklı sıcaklık, pH ve NaCl'de gelişme, glukoz ve laktoz kullanımı, H₂S oluşumu, jelatin ve nişasta hidrolizi ve kazein parçalanması ile türler tanımlanmaya çalışılır (Ustaçelebi, 1999).

1.4.2. Moleküler yöntemlerle tanımlama

Morfolojik ve biyokimyasal testlere ilave olarak türler arasındaki farklılığı belirlemek için çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Kromozomal DNA baz bileşimi (%mol G+C), DNA-DNA sıvı hibridizasyon yöntemleri, özel DNA problemleri, plazmid ve toplam hücre protein profillerinin belirlenmesi, polimeraz zincir reaksiyonu, 16S rRNA dizi analizi, Southern blotlama gibi moleküler yöntemler tanımlamanın kesin ve hızlı bir şekilde yapılmasını sağlamaktadır (Rosovitz ve diğ., 1998; Chang ve diğ., 2003).

1.4.2.1. 16S rRNA dizi analizi

Woese ve diğ. (1983) tarafından yapılan çalışma ile bakterilerin ve diğer yaşam formlarının filogenetik ilişkisinin, genetik kodun değişmeyen bir bölgesinin kıyaslanması ile saptanabilir olduğu ortaya koyulmuştur. Bakterilerdeki bu genetik alan için uygunluğu incelenmekte olan kısımlar 16S rRNA (ribozomun küçük alt birimine özgü RNA) ve 23S ve 5S rRNA (büyük alt birimler)'yi şifreleyen genlerden meydana gelmektedir.

Bakterilerin sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılan gen bölgesi 16S rRNA'dır. Bu gen bölgesi 16S rDNA'dan oluşur ve yaklaşık olarak 1550 bp uzunluğundadır. Hem değişebilen hem de korunmuş bölgelerden oluşur (Joung ve Cote, 2001).

16S rRNA dizilerinin kıyaslanması bakteriler, arkebakteriler ve ökaryotik organizmalar arasındaki filogenetik ve evrimsel yakınlığın belirlenmesi için kullanılan

güçlü bir araçtır. Bu diziler öncelikli olarak oligonükleotit kataloglama, klonların dizilenmesi, ters transkriptaz kullanılarak RNA'nın doğrudan dizilenmesi ve PZR ile çoğaltılmış materyalin dizilenmesini içeren yöntemlerle elde edilmiştir (Weisburg ve diğ., 1991; Öztürk, 2007).

B. thuringiensis ve *B. cereus* var. *mycooides*'in 16S rRNA dizi analizi sonucunda sadece birkaç nükleotit ile birbirlerinden ve *B. anthracis* ve *B. cereus*'dan farklı olduğu tespit edilmiştir. Gen bankasından *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. anthracis* türlerinin sınırlı sayıda gen dizilerine ulaşılmaktadır. Bu diziler farklı uzunlukta ve kalitede olmalarına rağmen tamamlayıcı bölgelerinde birbirlerinden birkaç nükleotitten fazla farkları yoktur. Bu nedenle *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. anthracis*'in 16S rRNA gen bölgelerinde görülen az düzeydeki farklılık bu üç türü tanımlamak ve farklılıklarını ortaya koymak için 16S rRNA gen bölgesi dizi analizinin bir araç olduğunu ortaya koymaktadır (Sacchi ve diğ., 2002).

Attallah ve diğ. (2014) tarafından yapılan çalışmada Mısır topraklarının farklı bölgelerinden izole edilen 16 *Bacillus* izolatından 3'ünün morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testler ve kısmi 16S rRNA gen bölgesi analizi ile *B. cereus* VKK-7'ye benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir.

Suudi Arabistan'ın Doğu Eyaletinde Berekaa (2014) tarafından yapılan bir çalışmada ekzopolisakkarit (EPS) üreticisi olan *Bacillus* QS5 izolatı 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile *B. licheniformis* olarak tanımlanmıştır. EPS, pek çok mikroorganizmanın büyümesi sırasında doğal olarak oluşturulan makromoleküldür (Berekaa, 2014). Yapılan çalışmalarda EPS'lerin bağışıklık sistemini geliştirici, kolesterolü düşürücü, antiülser ve antitümör etkisinin olduğu belirtilmiştir. EPS'ler gıda endüstrisinde jelleştirici, emülsifiye ve stabilize edici özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır. EPS'ler fermente ürünlerin stabilitesini, teknolojik ve tekstürel yapısını geliştirirken, bakterileri faj saldırılarına, toksik bileşiklere, ozmotik strese ve kurumaya karşı korumaktadır (Soyuçok ve diğ., 2016).

Starostin ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışmada, Rusya'nın çeşitli bölgelerindeki ekstrem habitatlardan izole edilen 24 izolatın, 16S rRNA gen bölgelerine ait dizi analizlerinin %98 benzerlik gösterdiği ve bu izolatların *B. pumilus* grubuna ait oldukları ve ayrımlarının yapılması için kütle spektrometresi yöntemi kullanıldığı rapor edilmiştir.

1.4.2.2. Kısmi gyrA ve gyrB dizi analizleri

16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile tanımlanamayan izolatlar için diğer korunmuş gen bölgelerine bakılır. Bunlara örnek olarak gyrA/B gen bölgeleri verilebilir. gyr A/B genleri; DNA replikasyonunda rol oynayan DNA Giraz (Tip II DNA topoizomeras) enziminin A/B alt ünitesini kodlar (Wang ve diğ., 2007).

GuoHui ve diğ. (2010) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus* sp. R31 izolatı fizyolojik, biyokimyasal testler ve 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi ile tanımlanamamış olup DNA Giraz enziminin A ve B alt ünitelerini kodlayan gyrA ve gyrB gen bölgeleri kullanılarak izolatın *B. subtilis* olarak tanımlandığı rapor edilmiştir.

Bacillus cinsi birbirine çok yakın türleri içeren gruplara sahiptir. Örneğin; *Bacillus cereus* grubunda (*B. cereus*, *B. anthracis* ve *B. thuringiensis*) yer alan türler genetik olarak çok benzer olmalarına rağmen farklı patojeniteye sahip olduklarından dolayı yine de ayrı türler olarak kabul edilir. Diğer bir örnek ise; *B. subtilis* grubu *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ve *B. sonorensis* türlerini içerir. Bu türlerin 16S rRNA gen bölgesine ait dizi analizleri %99 benzerlik gösterir. Bu nedenle bu türlerin ayrımı sadece bu bölgeye dayalı yapılamaz. Yeni tür, *B. safensis* gyrB gen dizisine göre *B. pumilus*'tan ayırt edilmiştir. *B. altitudinis*, *B. stratosphaericus* ve *B. aerophilus* türleri polifazik taksonomi yaklaşımı kullanılarak tanımlanmıştır. Bu türlerin 16S rRNA gen dizileri birbirine çok yakındır ve *B. pumilus* grubu formlara sahiplerdir (Starostin ve diğ., 2015).

1.4.2.3. Cry gen varlığının tespiti

B. cereus ve *B. thuringiensis*'in moleküler ayrımı "cry" genlerinin varlığının tespiti ile yapılabilir (Chen ve Tsen, 2002).

B. thuringiensis (Bt) türü sporulasyon periyodu esnasında kristal inklüzyonlar üretmesiyle karakterize edilir (Aronson ve diğ., 1986; Tatlıpınar, 2010). Bu kristal proteinler (Cry proteinleri) cry gen kodlayan plazmidler tarafından sentezlenir ve bakterinin oluşturduğu bu kristal inklüzyonlar yüksek insektisidal aktiviteye sahiptir (Gonzales ve Carlton, 1980; Tatlıpınar, 2010).

Bacillaceae familyası içerisinde Bt, bir memeli patojeni olan *B. anthracis* ve özellikle besin zehirlenmesine neden olan *B. cereus* ile genetik olarak yakınlık gösterir. Bu üç

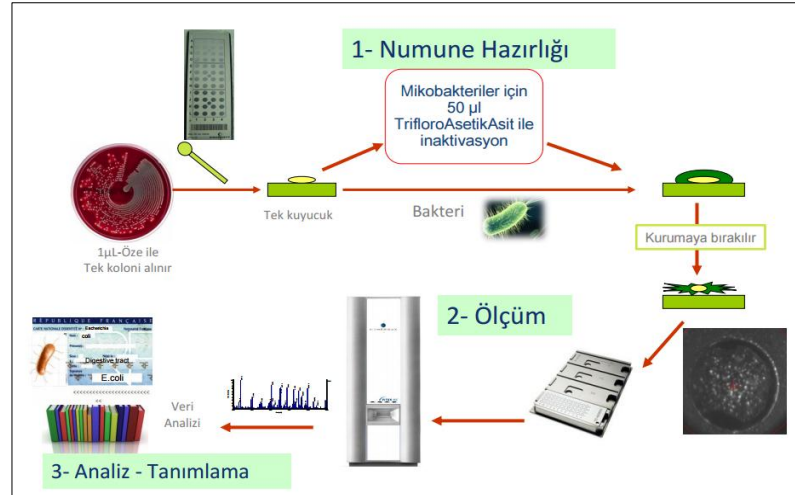
tür de topraktan izole edilebilirler (Tatlıpınar, 2010). Ancak Bt kristal oluşturma özelliği ile bu bakterilerden ayrılır (Helgason ve diğ., 2000; Tatlıpınar, 2010).

B. thuringiensis türleri cry gene sahip ve kristal protein üretebilirler, yani cry gen PZR ürünü pozitifken, *B. cereus* türlerinde cry gen PZR ürünü negatiftir (Chen ve Tsen, 2002).

1.4.3. VITEK-MS (Kütle spektrometresi) ile tanımlama

Mikroorganizmaların tanımlanmasında klasik metotlara göre daha hızlı ve basit bir yöntem olarak kütle spektrometresi kullanılmaktadır. Bu yöntem çalışılan numunenin protein spektrumunun cihazın veritabanında bulunan referans spektrumlar ile karşılaştırılması esasına dayanır (Starostin ve diğ., 2015).

Spektrumlar mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılmaktadır. İncelenmek istenen mikroorganizmaya ait koloni doğrudan hedef noktasının üzerine yayılır ve matriksle kaplanır. Meydana gelen kütle spektrumları, ilgili yazılımla incelendikten sonra kayıtlı profillerle karşılaştırılır (Şekil 1.2). Türlerin bu teknik ile tanımlanması, günümüz standart immünolojik ve biyokimyasal yöntemlerden daha güvenilir ve ucuz olmasından kaynaklanmaktadır (Seng ve diğ., 2009; Çetinkaya ve Ayhan, 2012).



Şekil 1.2. VITEK-MS ile tanımlama basamakları (URL-3)

1.5. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Önemi ve Endüstrideki Yeri

Bacillus cinsi bakteriler kolay üretilibilmeleri, endüstriyel öneme sahip olmaları (antibiyotik, enzim, toksin, biyoplastik gibi) ve patojeniteleri sebebiyle bakteriler

dünyasında dikkat çeken ve üzerinde geniş çalışmaların yapıldığı mikroorganizmalar grubuna girerler (Rosovitz ve diğ., 1998; Kaynar ve Beyatlı, 2006).

Bulaşıcı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin üretiminde *Bacillus* cinsi bakterilerden yararlanılmaktadır. *B. polymyxa* polimiksin, *B. subtilis* subtilin, *B. licheniformis* basitrasin, *B. brevis* gramisidin antibiyotiklerinin üretiminde kullanılır. Bunların yanısıra siklik lipoproteinlerden olan iturin (*B. subtilis*) birçok mantar ve mayanın neden olduğu hastalıklarla mücadelede kullanılmaktadır. *B. cereus* tarafından üretilen antibiyotiklerin (zwittermisin A ve antibiyotik B) mantarların neden olduğu bazı bitki hastalıklarında etkili olduğu bilinmektedir (Rosovitz ve diğ., 1998).

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde tarım alanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olan zararlı böcekler ile mücadelede kullanılan kimyasal ilaçların ekosistemde meydana getirmiş olduğu zararlı etkiler nedeniyle alternatif yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerin en önemlisi de “biyolojik mücadele”dir. Biyolojik mücadelede bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar ve protozoa grubuna ait organizmalar biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında, özellikle *Bacillus* grubu bakteriler önemli bir yer tutarlar. Biyolojik mücadelede kullanılan mikroorganizmaların %90'nını *B. thuringiensis* oluşturmaktadır. *B. thuringiensis* delta endotoksin (insektisidal kristal protein) olarak isimlendirilen protein yapıda ve biyolojik olarak kolayca parçalanabilen ve böylece böceğin orta bağırsağında kısa bir yarılanma ömrü olan insektisidal toksinler üretirler (Chattopadhyay ve diğ., 2004; Öztürk, 2007).

B. thuringiensis ürünlerinin ziraatta kullanımının artmasına ek olarak, 1977'de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'in keşfi sivrisineklerin (*Culex* sp.) ve karasineklerin (*Anopheles* sp.) büyük ölçekli kontrolüyle sonuçlanmıştır. Mesela, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ürünleri Almanya'da sivrisineklerin, Çin'de malaria vektörünün kontrolünde kullanılmaktadır. Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü, karasineklerin (*Simulium damnosum*) kontrolünde 1982'den 1997'ye kadar 5 milyon litreden fazla *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ürünlerini kullanmıştır (Demeli, 2012).

B. subtilis, *B. amiloliquefaciens* ve *B. stearothermophilus* bakteriyel α -amilaz enzim üretiminde kullanılmakta olup, amiloz ve amilopektini dekstrinlere parçalar. *B. subtilis*, *B. mesentericus* ve *B. stearothermophilus* ise bakteriyel proteinaz enzimi üretiminde kullanılmaktadır. Bu enzim ise et ve balık etlerinin tenderize edilmesinde

(yumuşatılması), şarap ve bira endüstrisinde protein bulanıklığının alınmasında stabilize edici olarak kullanılmakta olup, miso ve soysos üretiminde başlangıç (ön) kültür olarak da yararlanılmaktadır (Kalkan ve Halkman, 2006a).

Bacillus cinsine ait türlerden elde edilen alkalın proteazlar, deterjan formülasyonlarındaki büyük uygulamalarıyla en çok kullanılan endüstriyel enzimlerdir (Haddar ve diğ., 2010). En çok çalışılan alkalın proteazlar ise, çeşitli *Bacillus* türleri tarafından üretilen “Subtilisin Carlsberg” ve “Subtilisin Novo”dur. *B. licheniformis* tarafından üretilen Subtilisin Carlsberg ve *B. amyloliquefaciens* tarafından üretilen Subtilisin Novo deterjan formülasyonlarında seçilen enzimlerdir (Keay ve diğ., 1972).

B. subtilis, *B. thermoleovorans*, *B. thermocatenulatus*, *B. coagulans* lipaz üreten bazı *Bacillus* türleridir. Lipaz enzimi genellikle süt ürünlerinde ve gıda endüstrisinde süt yağlarının hidrolizi için kullanılır. Lipaz, süt yağlarını parçalayıp yağ asitlerini serbest hale geçirerek pek çok süt ürününe tipik lezzet ve kokuyu kazandırmaktadır (Özdoğan, 2007).

B. megaterium ve *B. cereus* doğada parçalanabilen bir biyoplastik maddesi olan polihidroksibitürik asit (PHB) üretirler (Kalaylı ve Beyatlı, 2003).

Antraks (şarbon) entkeni olan *B. anthracis* ve besin zehirlenmelerine neden olan *B. cereus* hariç diğer türler primer insan patojeni değildirler. Ancak travma, yanık ve değişik şekilde immünitesi baskılanmış hastalarda potansiyel patojendirler. Birçok *Bacillus*'un hastalık patogenezinde rol oynayan antimikrobiyal özellikte madde, enzim, pigment ve bir kısmında toksin gibi hücre dışı madde salgıladıkları gösterilmiştir (Berkeley ve Logan, 1997).

2. MALZEME VE YÖNTEM

Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi ve besiyeri, tampon ve solüsyonların hazırlanması Ek-C'de yer almaktadır.

2.1. Toprak Örneklerinin Alınması

Bu çalışmada toprak örnekleri, toprağın üst yüzey materyalleri süpürüldükten sonra steril bir spatula ile yüzeyin yaklaşık 2-5 cm aşağısından 10 gram alınarak steril tüplere konuldu. Alınan örnekler kullanılana kadar +4°C'de saklandı (Kim ve diğ., 1998).

2.2. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin İzolasyonu

Bacillus cinsine ait bakteri türlerinin izolasyonu için Nutrient Agar (NA) (Merck) besiyeri kullanıldı. İzmit ve çevresindeki topraklardan (Kocaeli Üniversitesi Kampüsü, Yuvacık Baraj Yolu üzerindeki tarlalar ve dere kenarı, Kent Ormanı) alınan örneklerin 1 gramı, içinde 9 ml steril saf su bulunan deney tüplerine aktarılmış olup karıştırıcıda 5 dakika kuvvetli bir şekilde karıştırıldı. Örnekler 80°C'de 10 dakika tutularak vejetatif bakteri formlarının ölmesi ve ortamda bu bakterilerin sporlu formlarının kalması sağlandı. Örneklerden 10⁻¹'den 10⁻⁶'ya kadar seri seyreltmeler hazırlanarak, NA besiyerine 0,1 ml ekimler yapıp 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda morfolojik olarak birbirinden farklı olan koloniler seçildi (Kim ve diğ., 1998). Seçilen farklı koloniler NA besiyerine ekilerek saf kültürleri elde edildi. Saf kültürler daha sonra Gram boyama ile boyanarak boyama sonucunda morfolojik olarak Gram pozitif çubuk şekilli olan bakteriler deney materyali olarak seçildi. Her bir izolat Y1, Y2, Y3 şeklinde sırasıyla numaralandırıldı.

2.3. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Stok Kültürlerinin Hazırlanması

Deney materyali olarak seçilen her bir izolatın; 5 ml'lik Nutrient Broth (NB) (Biolife) besiyerinde 37°C'de 16-18 saat çalkalamalı inkübatörde (200 rpm) çoğaltıldıktan sonra her birinden (700 µl örnek + 200 µl %80 (v/v)'lik gliserol) üçer adet olacak şekilde sıvı azotla dondurulup, -80°C'de muhafaza edilmek üzere stok kültürleri hazırlandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Saklama örnekleri

2.4. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Koloni Morfolojilerinin Karşılaştırılması

Topraktan izole edilen 45 izolat; koloni morfolojilerinin karşılaştırılması amacıyla -80°C stoklarından alınıp 5 ml'lik NB besiyerinde 37°C'de 16-18 saat çalkalamalı inkübatörde (200 rpm) çoğaltıldıktan sonra seri seyreltmeler hazırlanarak, NA besiyerine yayma yöntemi ile ekilip 37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakıldı.

2.5. *Bacillus* İzolatlarının Moleküler Analizi

2.5.1. Primer tasarımı

Sentegen (Ankara) firmasından satın alınan oligonükleotitler, Tablo 2.1'de listelenmektedir. 18 ila 25 baz uzunluğunda tasarlanan primerler için erime sıcaklığı (T_m) 55°C-65°C olarak belirlendi.

Tablo 2.1. *Bacillus* izolatlarının filogenetik karakterizasyonunu gerçekleştirebilmek üzere Polimeraz Zincir Reaksiyon'unda kullanılan primerler

Primer Çifti	Çoğaltılan Gen Bölgesi	Nükleotit Dizisi
1.primer çifti (Tony ve diğ., 2009)	16S rRNA ileri 16S rRNA geri	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGGC-3'
2.primer çifti (Singh ve diğ., 2013)	16S rRNA ileri 16S rRNA geri	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3'
3.primer çifti (Zheng ve diğ., 2016)	16S rRNA ileri 16S rRNA geri	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'
4.primer çifti (Singh ve diğ., 2013)	gyrA ileri gyrA geri	5'-CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3' 5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3'
5.primer çifti (Manzano ve diğ., 2003)	gyrB ileri gyrB geri	5'-GTTTCTGGTGGTTTACATGG-3' 5'-CAACGTATGATTTAATTCCACC-3'
6.primer çifti (Chen ve Tsen, 2002)	K3-cry ileri K5-cry geri	5'-GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC-3' 5'-AGGACCAGGATTTACAGGAGG-3'

2.5.2. Genomik DNA izolasyonu

Bakterilerin kromozomal DNA'ları, Genomik DNA purifikasyon kiti (Peqlab, Almanya) kullanılarak firma tarafından önerilen basamaklar doğrultusunda izole edildi. Bu kapsamda; *Bacillus* izolatları öncelikle 3 ml'lik Luria-Bertani (LB) Broth (Ek-C) besiyerine (%1 (w/v) tripton, %0,5 (w/v) maya ekstraktı, %1 (w/v) NaCl) inoküle edilerek 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örnekler 4000 rcf'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atıldı. 100 µl "TE tamponu" eklenerek pellet çözdürülmüş olup sonra tüpe 100 µl lizozim enzimi ilave edilerek karıştırıldıktan sonra 30°C'de 20 dakika bekletildi. Tüp 4000 rcf'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. 400 µl "DNA lizis buffer T" ilave edilerek pellet çözdürüldü ve 20 µl "Proteinaz K" eklenerek pipetleme yapıldı. 15 µl RNase A eklenip tekrar pipetleme yapıldıktan sonra 10 saniye ters düz edildi. Daha sonra karışımı içeren tüp 70°C su banyosunda 30 dakika bekletilip ara sıra ters düz edildi. 200 µl "DNA bağlama tamponu" eklenip, pipetleme yapıldıktan sonra örnek 2 ml'lik temiz tüplere konulup son solüsyon firma tarafından sağlanan kolon içine eklendi. 10000 rcf'de 1 dakika santrifüj edilmesi sonucunda kromozomal DNA'nın kolona bağlanması sağlandı. Kolon daha sonra temiz bir tüpe aktarılıp 650 µl "DNA yıkama tamponu" eklenerek kolon yıkandıktan sonra 10000 rcf'de 1 dakika santrifüj edildi. Tekrar 650 µl "DNA yıkama tamponu" ile yıkanan kolon 10000 rcf'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra bu sefer 10000 rcf'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon daha sonra 1,5 ml'lik steril santrifüj tüplere aktarıldı ve oda sıcaklığındaki steril sudan 50 µl kolona eklendikten sonra önce 70°C'lik su banyosunda 5 dakika sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip 6000 rcf'de 1 dakika santrifüj edildi. Böylece DNA'nın kolondan ayrılması sağlandı. Bu şekilde elde edilen kromozomal DNA örnekleri -20°C'de saklandı.

2.5.3. Nükleik asit konsantrasyonunun belirlenmesi

İzole edilen genomik ve plazmid DNA örneklerinin konsantrasyonları Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Amerika) kiti kullanılarak belirlendi. Öncelikle "Qubit Reagent" ve "Qubit Buffer" dan oluşan çalışma solüsyonu ve sonrasında son hacimleri 200'er µl olacak şekilde standart 1 ve 2 (190'ar µl çalışma solüsyonu+10'ar µl standart 1/2) hazırlandı. DNA konsantrasyonları ölçülecek izolatlardan 2'şer µl alınarak son hacimleri 200 µl olacak şekilde çalışma solüsyonu ile tamamlandı. Standart solüsyonlar ve örnekler 2-3 saniye ters düz edilip, oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakıldı. Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen,

Amerika) cihazında önce standart solüsyonlar okutularak florometre kalibre edildi [Geniş aralıkta okuma için standart 1 = TE tamponunda 0 ng/µl DNA, standart 2 = TE tamponunda 100 ng/µl DNA] ve sonrasında sırasıyla örnekler okutulup DNA konsantrasyonları ölçüldü.

2.5.4. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması

İzole edilen kromozomal DNA'lar ve Tablo 2.1'de verilen ilk üç primer çifti, 16S rRNA genini taşıyan DNA bölgesinin amplifikasyonu için kullanıldı. Amplifikasyon çalışmalarının optimize edilmesinde Tablo 2.2-2.5'te yer alan dört farklı PZR karışımı hazırlanarak hedef gen bölgesinin çoğaltılması gerçekleştirildi.

Tablo 2.2. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı I

PZR Karışımı I	50 µl (Reaksiyon hacmi)	Son Konsantrasyon
10X Taq DNA polimeraz tamponu	5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	3	1,5 mM
dNTP karışımı (2 mM)	5	200 µM
İleri primer (10 µM)	1	0,2 µM
Geri primer (10 µM)	1	0,2 µM
Kromozomal DNA	8	0,192 - 24,16 ng
ddH ₂ O	26	-
Taq DNA polimeraz (1,25 U/µl, NEB)	1	0,025 U/µl

Tablo 2.3. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı II

PZR Karışımı II	50 µl (Reaksiyon hacmi)	Son Konsantrasyon
10X Taq DNA polimeraz tamponu	5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	3	1,5 mM
dNTP karışımı (2 mM)	5	200 µM
İleri primer (10 µM)	1	0,2 µM
Geri primer (10 µM)	1	0,2 µM
Kromozomal DNA	0,66	0,192 - 24,16 ng
ddH ₂ O	33,34	-
Taq DNA polimeraz (1,25 U/µl, NEB)	1	0,025 U/µl

Tablo 2.4. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı III

PZR Karışımı III	50 µl (Reaksiyon hacmi)	Son Konsantrasyon
10X KOD Hot Start DNA polimeraz tamponu	5	1X
MgSO ₄ (25 mM)	3	1,5 mM
dNTP karışımı (2 mM)	5	200 µM
İleri primer (10 µM)	1,5	0,3 µM
Geri primer (10 µM)	1,5	0,3 µM
Kromozomal DNA	1	0,192 - 24,16 ng
ddH ₂ O	32	-
KOD Hot Start DNA polimeraz (1 U/µl, Novagen)	1	0,02 U/µl

Tablo 2.5. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı IV (Duman ve diğ., 2016)

PZR Karışımı IV	50 µl (Reaksiyon hacmi)	Son Konsantrasyon
10X KOD Hot Start DNA polimeraz tamponu	5	1X
MgSO ₄ (25 mM)	3	1,5 mM
dNTP karışımı (2 mM)	5	200 µM
İleri primer (10 µM)	1,5	0,3 µM
Geri primer (10 µM)	1,5	0,3 µM
Kromozomal DNA	8	0,192 - 24,16 ng
ddH ₂ O	25	-
KOD Hot Start DNA polimeraz (1 U/µl, Novagen)	1	0,02 U/µl

Dört farklı reaksiyon karışımı için kullanılan PZR döngüsü Tablo 2.6'da verilen şekilde uygulandı.

Tablo 2.6. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR döngüsü (Duman ve diğ., 2016)

PZR Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	95	2 dk.	1
Denatürasyon	95	30 sn.	30
Bağlanma	52	30 sn.	
Uzama	72	90 sn.	
Son Uzama	72	10 dk.	1
Saklama	4	Süresiz	-

2.5.5. Kısmi gyrA gen bölgesinin çoğaltılması

İzole edilen kromozomal DNA'lar ve Tablo 2.1'de verilen 4. primer çifti, kısmi gyrA genini taşıyan DNA bölgesinin amplifikasyonu için kullanıldı. Amplifikasyon

çalışmalarının optimize edilmesinde Tablo 2.7 ve 2.8'de yer alan iki farklı PZR reaksiyon karışımı hazırlanarak gen bölgesinin çoğaltılması gerçekleştirildi.

Tablo 2.7. Kısmi gyrA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı V

PZR Karışımı V	50 µl (Reaksiyon hacmi)	Son Konsantrasyon
10X KOD Hot Start DNA polimeraz tamponu	5	1X
MgSO ₄ (25 mM)	3	1,5 mM
dNTP karışımı (2 mM)	5	200 µM
İleri primer (10 µM)	1,5	0,3 µM
Geri primer (10 µM)	1,5	0,3 µM
Kromozomal DNA	8	0,192 - 24,16 ng
ddH ₂ O	25	-
KOD Hot Start DNA polimeraz (1 U/µl, Novagen)	1	0,02 U/µl

Tablo 2.8. Kısmi gyrA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı VI

PZR Karışımı VI	50 µl (Reaksiyon hacmi)	Son Konsantrasyon
10X Taq DNA polimeraz tamponu	5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	3	1,5 mM
dNTP karışımı (2 mM)	5	200 µM
İleri primer (10 µM)	1,5	0,3 µM
Geri primer (10 µM)	1,5	0,3 µM
Kromozomal DNA	8	0,192 - 24,16 ng
ddH ₂ O	25	-
Taq DNA polimeraz (1,25 U/µl, NEB)	1	0,025 U/µl

Yukarıda içerikleri verilen reaksiyon karışımları için kullanılan PZR döngüleri Tablo 2.9 ve 2.10'da verilen şekilde uygulandı.

Tablo 2.9. Kısmi gyrA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR döngüsü 1

PZR Aşaması 1	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	95	2 dk.	1
Denatürasyon	95	30 sn.	30
Bağlanma	58	30 sn.	
Uzama	68	90 sn.	
Son Uzama	68	10 dk.	1
Saklama	4	Süresiz	-

Tablo 2.10. Kısmi *gyrA* gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR döngüsü 2

PZR Aşaması 2	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	95	2 dk.	1
Denatürasyon	95	30 sn.	30
Bağlanma	52	30 sn.	
Uzama	72	90 sn.	
Son Uzama	72	10 dk.	1
Saklama	4	Süresiz	-

2.5.6. Kısmi *gyrB* gen bölgesinin çoğaltılması

B. cereus grubuna ait izolatların ayırt edilmesi amacıyla kısmi *gyrB* gen bölgeleri çoğaltıldı. Bu amaçla izole edilen kromozomal DNA'lar ve Tablo 2.1'de verilen 5. primer çifti, kısmi *gyrB* genini taşıyan DNA bölgesinin amplifikasyonu için kullanıldı. Amplifikasyon çalışmalarında Tablo 2.7'de yer alan PZR karışımı V ve Tablo 2.9'da verilen döngü 1 kullanılarak gen bölgesinin çoğaltılması gerçekleştirildi.

2.5.7. Restriksiyon enzimi ile kesim

B. cereus grubuna ait izolatların ayırt edilmesi amacıyla kısmi *gyrB* gen bölgeleri çoğaltılan izolatların PZR ürünleri, Tablo 2.11'de yer alan reaksiyon karışımı kullanılarak restriksiyon enzimi - *Sau3AI* (NEB, İngiltere) ile 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı.

Tablo 2.11. Kısmi *gyrB* gen bölgeleri çoğaltılan izolatların restriksiyon enzimi - *Sau3AI* (NEB) ile kesimi için kullanılan reaksiyon karışımı

	Reaksiyon Hacmi (50 µl)	Son Konsantrasyon
10X NEBuffer	5	1X
DNA PZR ürünü	7	
ddH ₂ O	37	
<i>Sau3AI</i> (200U, NEB)	1	4U

2.5.8. Plazmid DNA izolasyonu

Plazmid DNA'sı izole edilmek istenen izolat; Luria-Bertani (LB) Broth (Ek-C) besiyerinde 37°C'de çalkalamalı inkübatörde (200 rpm) 18 saat büyütüldü. Plazmid DNA'yı izole etmede Alkalın-SDS Plazmid Miniprep yöntemine dayanan QIAprep DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak firma tarafından önerilen basamaklar izlendi. Bu kapsamda; bir gece 37°C'de inkübe edilen 10 ml (LB) taze kültür 13000 rpm'de 10 dk. santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. 250 µl "Buffer P1"

eklenerek pellet çözdürüldü ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Daha sonra 250 µl “Buffer P2” eklendi ve örnek berraklaşınca kadar 4-6 kere ters düz edilerek karıştırıldı. Sonrasında 350 µl “Buffer N3” eklendi ve 4-6 kere ters düz edilerek karıştırıldı. 13000 rpm’de 10 dk. mikrosantrifüj yapıldıktan sonra süpernatant elüsyon kolonuna aktarıldı ve 1 dk. santrifüj yapıldı. Bu sırada kolondan geçen süzüntü atıldı. Kolon daha sonra, 0,5 ml “Buffer PB” eklenerek yıkandı ve 1 dk. santrifüj yapıldı. Kolondan geçen süzüntü atıldıktan sonra 0,75 ml “Buffer PE” eklenerek kolon yıkandı ve 1 dk. santrifüj yapıldı. Kolondan geçen süzüntü tekrar atıldı. Kolon daha sonra 1,5 ml’lik temiz eppendorf tüpe yerleştirildi ve kolona 50 µl ddH₂O (önceden 70°C’de su banyosunda inkübe edilmiş) eklendi; 1 dk. beklemenin ardından 1 dk. santrifüj yapılarak plazmid süzüntüde elde edildi. Bu şekilde elde edilen plazmid -20°C’de saklandı (Zengin, 2016).

2.5.9. PZR ile cry gen belirlenmesi

B. cereus ve *B. thuringiensis* türlerinin ayrımı için yaklaşık 1600-1700 bç’lik (Kuo ve Chak, 1996) cry geninin varlığına bakıldı. Bu amaçla Bölüm 2.5.8’de anlatıldığı gibi izole edilen plazmid DNA ve Tablo 2.1’de verilen 6. primer çifti, cry genini taşıyan DNA bölgesinin amplifikasyonu için kullanıldı. Amplifikasyon çalışmalarında Tablo 2.12’de yer alan PZR karışımı ve Tablo 2.13’te yer alan PZR döngüsü kullanılarak gen bölgesinin çoğaltılması gerçekleştirildi.

Tablo 2.12. cry gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı

PZR Karışımı	50 µl (Reaksiyon hacmi)	Son Konsantrasyon
10X KOD Hot Start DNA polimeraz tamponu	5	1X
MgSO ₄ (25 mM)	3	1,5 mM
dNTP karışımı (2 mM)	5	200 µM
İleri primer (10 µM)	2,5	0,5 µM
Geri primer (10 µM)	2,5	0,5 µM
Plazmid DNA	8	1,59 ng
ddH ₂ O	23	-
KOD Hot Start DNA polimeraz (1 U/µl, Novagen)	1	0,02 U/µl

Tablo 2.13. cry gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PZR döngüsü

PZR Aşaması 2	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	95	2 dk.	1
Denatürasyon	94	20 sn.	35
Bağlanma	56	30 sn.	
Uzama	72	30 sn.	
Son Uzama	72	5 dk.	1
Saklama	4	Süresiz	-

2.5.10. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel hazırlanması:

Kısmi 16S rRNA, gyrA, gyrB ve cry gen bölgeleri çoğaltılmış izolatların PZR ürünlerinin yürütülmesinde 1X Tris-Asetat-EDTA (TAE) içinde kaynatılarak çözüldükten sonra SYBR Safe (Invitrogen, Amerika) ilave edilerek hazırlanan %1-2,5 (w/v)'luk agaroz jel (%1; 16S rRNA, kısmi gyrA, ve cry çoğaltılması, %2,5; kısmi gyrB çoğaltılması) kullanıldı. Agaroz, mikrodalga fırında kaynatılarak solüsyon berraklaşınca kadar çözdürüldü. SYBR Safe (Invitrogen, Amerika) son konsantrasyonu 1 g/ml olacak şekilde eklendi ve çalkalayarak tüm çözeltiye dağılması sağlandı. Solüsyonun biraz soğuması beklendikten sonra agaroz tabağına yavaşça döküldü ve polimerizasyon için beklemeye bırakıldı (Zengin, 2016).

Örneklerin jele yüklenmesi:

Jel 1X TAE tamponu içeren tanka yerleştirildikten sonra 16S rRNA, kısmi gyrA, kısmi gyrB ve cry gen bölgeleri çoğaltılmış izolatların PZR ürünleri yükleme tamponu (6X; NEB, İngiltere) ile 5:1 (kısmi gyrB PZR ürünlerinin restriksiyon enzimi ile inkübasyonu sonrası jele yüklenme oranı ise 7,5:0,5) oranında karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Başka bir kuyucuğa 6 µl markör (marker) (NEB, İngiltere) yüklendi ve elektroforez 100 V'da 60 dakika yürütüldü (Yuzugullu ve diğ., 2013). Yürütme işleminin sonunda DNA'ların görüntülenmesi DNA görüntüleme cihazında (UVP-GelDoc-It 310, İngiltere) UV ışık altında yapıldı. Jellerin fotoğrafları dijital olarak bilgisayar ortamında çekildi (Zengin, 2016).

2.5.11. DNA'nın jelden geri kazanımı

Bölüm 2.5.4 ve 2.5.5'de gerçekleştirilen PZR ürünlerinin jelden saflaştırılması QIAquick Gel Extraction Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak firma tarafından önerilen basamaklar doğrultusunda gerçekleştirildi. Buna göre, 1,5 ml'lik eppendorf tüp içindeki PZR ürününü içeren jel örneği üzerine hacminin 3 katı kadar "QG buffer" eklendi ve jel tamamen eriyinceye kadar 50°C'de 10 dakika bekletildi. Tüpe daha sonra jel miktarı kadar izopropanol (μ l) ilave edilerek pipetleme yapıldı ve karışım kolona eklenerek 13000 rpm'de 1 dakika santrifüje maruz bırakıldı. Çöktürme işlemi sonrasında kolon altında kalan sıvı atılmış olup kolonun ortasına 500 μ l "QG buffer" eklendi. Kolon 1 dakika santrifüjlendikten sonra ise alttaki sıvı tekrar atıldı ve üzerine 750 μ l "PE buffer" eklendi. Sonrasında karışımı içeren tüp 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Altta kalan sıvı tekrar atılarak 1 dakika santrifüj edildi. Son olarak kolon, kapaklı temiz bir eppendorf tüp üzerine konulduktan sonra; kolonun tam ortasına gelecek şekilde 30 μ l ddH₂O eklenip 4 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve bunu takiben 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Böylece DNA'nın kolondan ayrılması sağlandı.

2.5.12. Sekans analizi

Tablo 2.1'de verilen primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR işlemi ile 16S rRNA, kısmi gyrA ve kısmi gyrB gen bölgelerini taşıyan DNA bölgelerinin amplifikasyonu sonrası elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve net bant gözlenen örnekler MedSanTek (İstanbul) firmasına sekans analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla gönderildi.

2.6. *Bacillus* İzolatlarının Biyokimyasal Karakterizasyonu

2.6.1. Gram boyama

Gram boyama bakterilerin tanımlanma ve sınıflandırılması için kullanılan en önemli boyama yöntemidir. Bu bir farklılaştırıcı boyama olup bakterileri Gram pozitif ve Gram negatif olarak ikiye ayırır. Gram negatif boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka, gram pozitif boyanan bakterilere göre çok daha incedir. Gram boyama için; 18-24 saatlik kültürden preparat hazırlandı ve kristal viyole ile kaplanıp, 1 dakika bekletildi. Preparat bol damıtık suyla yıkandıktan sonra üzeri lugol ile kaplanıp, 1 dakika bekletildi (iyot mordant olarak görev alır). Lugol akıtılarak damıtık suyla yıkandıktan sonra preparat üzerine %96 (v/v)'lık etil alkol

yayılarak 10-15 saniye beklenip, hemen damıtık suyla yıkandı. Preparat karşıt boya safranin ile kaplanıp, 10-30 saniye beklenildikten sonra bol damıtık suyla yıkanarak havada kurutuldu. Mikroskopta immersiyon merceğinde incelenerek, mor renkle boyanan bakteriler Gram pozitif, pembe renge boyanan bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirildi (Temiz, 2008).

2.6.2. IMViC testi

IMViC; İndol - Metil Kırmızısı - Voges Proskauer - Sitrat testlerinin kısaltmasıdır. *Bacillus* cinsine ait izolatlar arasından seçilenler petriyelerindeki tek koloniden alınıp, 5-7 ml'lik testlere özgü besiyerlerine inoküle edildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

2.6.2.1. İndol testi

İndol testi; bakterilerin, bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanıldı. İndol, bakterilerde bulunan triptofanaz enzimiyle bir aminoasit olan triptofanı parçalaması ve hidrolize etmesi sonucu oluşan azotlu bir bileşiktir ve aldehitlerle reaksiyona girdiğinde, kırmızı renkli bir ürün oluşturur.

İçerisinde 5 ml Pepton Water (Merck) besiyeri bulunan tüpler içerisine izolatlardan ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyon sonunda gelişen kültürlerin üzerine 0,5 ml Kovaks ayırıcı damlatılıp, tüpler çalkalandı. Üst kısımda kiraz kırmızısı renkte bir tabaka oluşumu var ise test pozitif olarak değerlendirilirken, renk değişiminin olmaması ile test negatif olarak değerlendirildi (Temiz, 2008).

2.6.2.2. Metil kırmızısı (MR) testi

Bazı bakteriler, ortamda bulunan glukozu kullanarak çeşitli organik asitleri oluştururlar. Metil kırmızısı testi, bakterilerin glukoz bulunan besiyerlerinde, glukozdan organik asit oluşturup oluşturmadığını belirleyebilmek amacıyla uygulandı. Organik asitler ortamın pH'sını düşürmektedir. pH'daki bu düşüşü belirlemek için, kültüre metil kırmızısı indikatörü eklenmektedir. Metil kırmızısı indikatörü pH 6,2'de sarı, pH 4,2 ve altında ise kırmızı renk gösterir (Temiz, 2008).

İçerisinde 5 ml MR-VP (Methyl Red-Voges Proskauer) Broth besiyeri bulunan tüpler içerisine izolatlardan ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyon sonunda gelişen kültürlerin üzerine 5 damla metil kırmızısı ayırıcı damlatıldı. Tüpler çalkalandıktan

sonra kültür renginin kırmızı-pembeye dönmesi testin pozitif, sarı kalması ise negatif olduğunu göstermektedir (Temiz, 2008).

2.6.2.3. Voges - proskauer (VP) testi

Bazı bakteriler, glukoz bulunan ortamda glukozu kullanarak asetoin, 2,3-bütillen glikol gibi çeşitli nötral ürünler oluştururlar. Bunlardan asetoin, ortama alkali bir madde eklendiğinde okside olarak diasetile dönüşür. Bu madde ise, peptondaki kreatin, arjinin veya kreatinin ile birleşerek pembe-kırmızı bir renk oluşumuna neden olur (Temiz, 2008).

İçerisinde 5 ml MR-VP Broth (Merck) besiyeri bulunan tüpler içerisine ekim yapılarak, 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda kültürün üzerine 1 ml %40 (w/v)'lık potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi eklendi ve daha sonra 3 ml %5 (w/v)'lik α -naftol çözeltisi ilave edildi. Tüpler çalkalanarak 5 dakika beklendi ve pembe-kırmızı renk oluşumu var ise test pozitif kabul edildi. Negatif tüplerde ise renk değişimi gözlenmedi (Temiz, 2008).

2.6.2.4. Sitrat testi

Sitrat testi; bakterilerin besiyerlerine katılan sitratı karbon kaynağı ve amonyum tuzlarını da azot kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamada kullanıldı (Tetik, 2007). Saf kültürlerden, tüp içerisinde yatık olarak hazırlanmış Simmon's Sitrat Agar'a (Merck) ekim yapıldı ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda mavi renk oluşumu pozitif olarak kabul edilirken, renk değişimi olmaması ya da üreme olmayışı negatif olarak değerlendirildi (Tetik, 2007).

2.6.3. Üç şekerli demir (TSI) agar testi

Bacillus cinsine ait izolatlar arasından seçilenler petrilerindeki tek koloniden steril iğne öze ile alınıp, 7 ml TSI (Triple Sugar Iron Agar) agar (Merck) besiyeri içeren tüpün tabanına 3-5 mm kalana dek agarın dip kısmına batırıldı, ardından öze geri çekilip yatık kısım yüzeyine zikzak çizerek ekim yapıldı. Tüpler aerobik ortamda, 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpün yatık ve dip kısımlarındaki reaksiyonlar; renk değişikliği ve H₂S oluşumu yönünden incelendi. Dip kısmın sarı renk alması glukoz kullanımını, siyah renk oluşması hidrojen sülfür oluşumunu, yüzeyin kırmızı renkte olması laktoz ve sükrozun kullanılmadığını göstermektedir (URL-4).

2.6.4. Jelatin ve nişasta hidroliz testi

Jelatin hidroliz testi; mikroorganizmaların, jelatini hidrolize eden jelatinaz enzim sentez yeteneğini ölçmek için kullanıldı. Jelatin, jelatinaz tarafından hidrolize edildiğinde, jelatini oluşturan aminoasitlere kadar parçalanır ve jelleşme yeteneğini kaybeder. *Bacillus* cinsine ait izolatlar arasından seçilenler petriyelerindeki tek koloniden steril iğne öze ile alınıp, dik olarak 5 ml Gelatin Broth (Ek-C) besiyerine ekildi ve 37°C'de 15 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi içerisinde her gün tüpler buzdolabında 1 saat bekletilmiş olup süre sonunda sivilaşmanın olup olmadığı kontrol edildi. Jelatinin hidrolize edildiği durumlarda, buzdolabından çıkarılınca, jelatinli ortamın sıvı halinde ve katılaşmadığı görülür (pozitif jelatin hidrolizasyonu). Negatif durumlarda ise tüpteki sıvı jelatinli besiyeri katılaşır (URL-5).

Nişasta hidroliz testi ise; bir homopolisakkarit olan nişastanın, bazı mikroorganizmalarca sentezlenen ekstrasellüler amilaz enzimi tarafından hidrolizasyonunu ortaya koymak amacı ile yapıldı. Bu amaçla; *Bacillus* cinsine ait izolatlar arasından seçilenlerin tek kolonilerinden direkt Nişasta Agar'a (Ek-C) çizgi ekimleri yapıldı ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda agarların üzeri lugol solüsyonu ile kaplandı ve koloni etrafında renksiz bir halka oluşumu var ise bu testin pozitif olduğunu gösterir (URL-6).

2.6.5. Tirozin (Tyrosine) agar ve pH 5,6 agar besiyerlerinde büyütme

B. sonorensis ve *B. licheniformis* türlerinin ayrımı için petriyelerindeki tek koloniden alınan inokulum, 6 ml'lik NB besiyerinde 30°C'de 18 saat çalkalamalı inkübatörde (200 rpm) çoğaltıldıktan sonra her bir izolat örneğinden seri seyreltmeler hazırlanarak Tirozin ve pH 5,6 agarlı besiyerlerine (Ek-C) ekimleri yapıldı ve 30°C'de 15 gün inkübasyona bırakıldı.

2.6.6. MYP (Mannitol egg yolk polymyxine) agar besiyerinde büyütme

Özellikle *B. cereus*'un ayırt edilmesi amacıyla izolatların tek kolonilerinin gözlendiği petriden alınan inokulum, 5 ml'lik NB besiyerinde 37°C'de 18 saat çalkalamalı inkübatörde (200 rpm) çoğaltıldıktan sonra her bir izolat örneğinden 10^{-3} 'den 10^6 'ya kadar seri seyreltmeler hazırlanarak MYP Agar (Merck) besiyerine yayma ekim yöntemi ile ekildi ve 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

2.6.7. Sıcaklığın ve pH'nın büyüme üzerine etkilerinin araştırılması

Bacillus cinsine ait izolatlar arasından seçilenler, petrilerindeki tek koloniden alınıp, 5 ml'lik NB besiyerlerine inoküle edildi ve 30-55°C sıcaklık aralığında 24 saat inkübasyon sonunda hücrelerin optik yoğunlukları (OD) spektrofotometrede 600nm'de ölçülüp, büyümenin olup olmadığı (+) veya (-) şeklinde ifade edildi.

pH'nın büyümeye olan etkisini araştırmak üzere pH 5-12 aralığında NB besiyerleri hazırlanarak bu besiyerlerine *Bacillus* türleri inoküle edildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücrelerin optik yoğunlukları (OD) spektrofotometrede 600nm'de ölçülüp, büyümenin olup olmadığı (+) veya (-) şeklinde ifade edildi.

2.6.8. NaCl'nin büyüme üzerine etkisinin araştırılması

Bacillus cinsine ait izolatlar arasından seçilenler, petrilerindeki tek koloniden alınıp, %3-14 (w/v) NaCl içeren 5 ml'lik NB besiyerlerine inoküle edildi ve 24 saat inkübasyon sonunda hücrelerin optik yoğunlukları (OD) spektrofotometrede 600nm'de ölçülüp, büyümenin olup olmadığı (+) veya (-) şeklinde ifade edildi.

2.6.9. VITEK-MS (Kütle spektrometresi) ile tanımlama

İzolatların, Üniversitemiz Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında bulunan VITEK-MS cihazı (bioMérieux, Fransa) kullanılarak tanımlanmaları amacıyla -80°C'deki stoklarından canlandırmaları yapıldı ve daha sonra bu izolatların dilüsyonları hazırlanarak, NA besiyerine yayma yöntemi ile ekilip 37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakıldı. Petri üzerinde gözlenen koloniler, biyokimyasal analizleri için hizmet alımı şeklinde Üniversitemiz Merkez Laboratuvarına gönderildi.

2.7. Filogenetik Analiz

Moleküler ve biyokimyasal tanımlaması yapılan izolatların filogenetik ağaçları, MEGA6 (Tamura ve diğ., 2013) filogenetik programı kullanılarak neighbor-joining (NJ) metodu ile oluşturuldu.

3. BULGULAR

Bu çalışmada; *Bacillus* cinsi bakterilerin stok kültürleri hazırlanırken Y10, Y20, Y30, Y34, Y36 ve Y40 numaralı izolatların saf kültürleri yenilenemediği için listeden çıkarıldılar.

3.1. *Bacillus* İzolatlarının Koloni Morfolojilerinin Karşılaştırılması

İzolatların koloni morfoloji karşılaştırma sonuçları Tablo 3.1'de, kolonilerinin görüntüleri ise Şekil 3.1'de yer almaktadır.

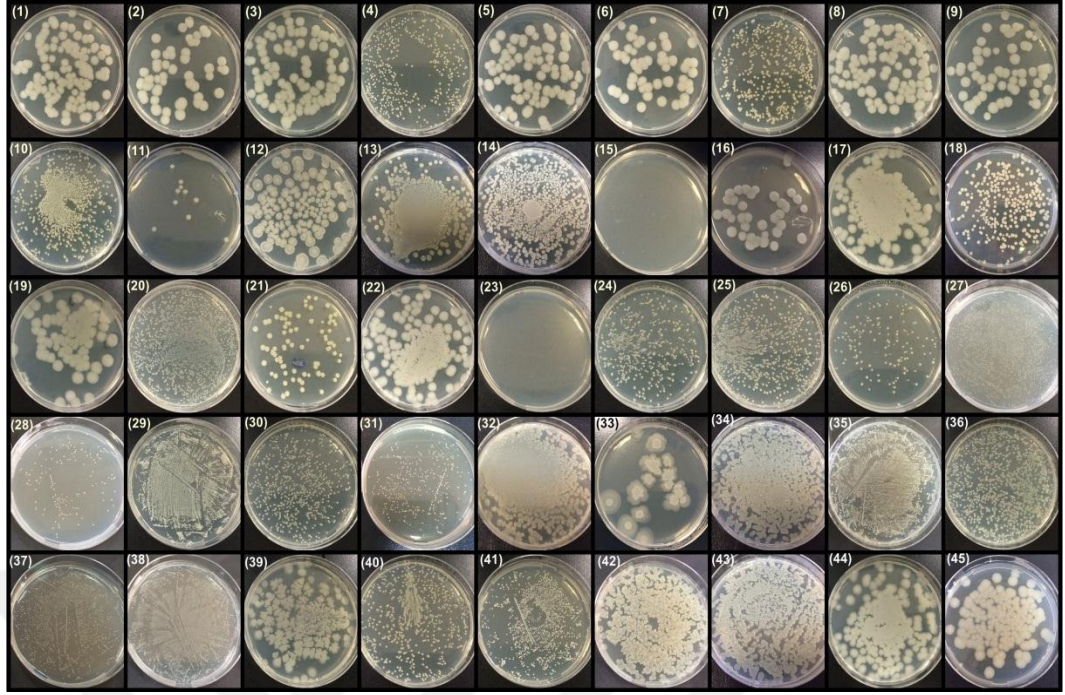
Tablo 3.1. İzolatların koloni morfolojilerinin karşılaştırılması

İzolat Numarası	Koloni Formu	Kenar	Yükseklik	Pigmentasyon	Doku	Optik Yapısı	Koloni Çapı (cm)
1	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,6
2	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,6
3	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,6
4	Yuvarlak	Düz	Konveks	Krem	Yağsı	Yarı-saydam	0,2
5	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,7
6	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,7
7	Yuvarlak	Düz	Kabartı şeklinde	Sarımsı	Yağsı	Opak	0,4
8	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,6
9	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,7
11	Yuvarlak	Düz	Kabartı şeklinde	Sarımsı	Yağsı	Opak	0,3
12	Yuvarlak	Düz	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,4
13	Yuvarlak	Dalgalı	Kabartı şeklinde	Krem	Yapışkan	Yarı-saydam	0,9
14	Yuvarlak	Düz	Kabartı şeklinde	Krem	Yapışkan	Opak	0,3
15	Düzensiz	Dalgalı	Kraterimsi	Krem	Yapışkan	Opak	0,4
16	İrili ufaklı noktalar	Düz	Konveks	Krem	Yağsı	Yarı-Saydam	≤0,1
17	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,6
18-1	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,7
18-2	Yuvarlak	Düz	Kabartı şeklinde	Sarımsı	Yağsı	Opak	0,3
19	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,7
21	Yuvarlak	Düz	Kabartı şeklinde	Açık krem	Yağsı	Saydam	0,2
22	Yuvarlak	Düz	Kabartı şeklinde	Sarımsı	Yağsı	Yarı-saydam	0,4

Tablo 3.1. (Devam) İzolatların koloni morfolojilerinin karşılaştırılması

İzolat Numarası	Koloni Formu	Kenar	Yükseklik	Pigmentasyon	Doku	Optik Yapısı	Koloni Çapı (cm)
23	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,6
24	İrili ufaklı noktalar	Düz	Konveks	-	Yağsı	Saydam	≤0,1
25	Yuvarlak	Düz	Konveks	Krem	Yağsı	Yarı-saydam	0,2
26	Yuvarlak	Düz	Konveks	Krem	Yağsı	Yarı-saydam	0,2
27	Yuvarlak	Düz	Konveks	Krem	Yağsı	Yarı-saydam	0,2
28	Yuvarlak	Düz	Konveks	Beyazımsı	Yağsı	Saydam	≤0,1
29	Yuvarlak	Düz	Konveks	Açık krem	Yağsı	Opak	0,1
31	Yuvarlak	Düz	Konveks	Krem	Yağsı	Yarı-saydam	0,1
32	Yuvarlak	Düz	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Yarı-saydam	0,2
33	Yuvarlak	Düz	Konveks	Açık krem	Yağsı	Opak	0,1
35	Düzensiz	Dalgalı	Düz	Krem	Yapışkan	Yarı-saydam	0,4
37	Yuvarlak	Dalgalı	Kabartı şeklinde	Krem	Yapışkan	Yarı-saydam	0,9
38	Düzensiz	Dalgalı	Kabartı şeklinde	Krem	Yapışkan	Yarı-saydam	0,8
39	Yuvarlak	Düz	Konveks	Krem	Yağsı	Yarı-saydam	0,2
41	Yuvarlak	Düz	Konveks	Krem	Yağsı	Saydam	0,1
42	Yuvarlak	Düz	Konveks	Krem	Yağsı	Yarı-saydam	≤0,1
43	Yuvarlak	Düz	Konveks	Krem	Yağsı	Yarı-saydam	≤0,1
44	Yuvarlak	Dalgalı	Kabartı şeklinde	Krem	Yapışkan	Opak	1
45	Yuvarlak	Düz	Konveks	Krem	Yağsı	Opak	0,2
46	Yuvarlak	Düz	Konveks	Krem	Yağsı	Opak	0,1
47	Düzensiz	Dalgalı	Kabartı şeklinde	Krem	Yapışkan	Yarı-saydam	0,6
48	Düzensiz	Dalgalı	Kabartı şeklinde	Krem	Yapışkan	Yarı-saydam	0,7
49	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,8
50	Yuvarlak	Düzensizce çentilmiş	Kabartı şeklinde	Krem	Yağsı	Opak	0,7

Tablo 3.1’de verilen sonuçlara göre; bazı izolatların koloni örnekleri benzer morfoloji göstermektedir. Örneğin, Y1, Y2, Y3, Y5, Y6, Y8, Y9, Y17, Y18-1, Y19, Y23, Y49, Y50 numaralı izolatlar ait koloniler aynı özellikleri taşımaktadır. Ayrıca aynı çizelgede verilen bilgiler ışığında Y7, Y11, Y14, Y18-2 ve Y22 numaralı örnekler ile Y13, Y37 (Duman ve diğ., 2016), Y44; Y4, Y25, Y26, Y27, Y31, Y39, Y42 ve Y43; Y29 ve Y33; Y45 ve Y46; Y38, Y47 ve Y48 numaralı örneklerin kendi aralarında benzer morfolojiye sahip oldukları gözlemlendi. Koloni morfolojileri benzer veya farklı olan tüm izolatların NA üzerindeki görüntüleri Şekil 3.1’de verildi.



Şekil 3.1. İzolatların Nutrient Agar üzerinde gelişen kolonilerinin görüntüleri (1) Y1, (2) Y2, (3) Y3, (4) Y4, (5) Y5, (6) Y6, (7) Y7, (8) Y8, (9) Y9, (10) Y11, (11) Y12, (12) Y13, (13) Y14, (14) Y15, (15) Y16, (16) Y17, (17) Y18-1, (18) Y18-2, (19) Y19, (20) Y21, (21) Y22, (22) Y23, (23) Y24, (24) Y25, (25) Y26, (26) Y27, (27) Y28, (28) Y29, (29) Y31, (30) Y32, (31) Y33, (32) Y35, (33) Y37, (34) Y38, (35) Y39, (36) Y41, (37) Y42, (38) Y43, (39) Y44 (40) Y45, (41) Y46, (42) Y47, (43) Y48, (44) Y49, (45) Y50

3.2. *Bacillus* İzolatlarının Moleküler Tanımlanması

3.2.1. İzolatlardan genomik DNA izolasyonu

Bölüm 2.5.2'de açıklanan şekilde izole edilen genomik DNA örneklerinin konsantrasyonları Bölüm 2.5.3'te açıklanan şekilde Qubit 2.0 Fluorometer cihazında (Invitrogen, Amerika) ölçüldü (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. İzolatlara ait kromozomal DNA konsantrasyonları

İzolat Numarası	Genomik DNA Konsantrasyonu (ng/μl)	İzolat Numarası	Genomik DNA Konsantrasyonu (ng/μl)
Y1	2,26	Y25	54,2
Y2	6,24	Y26	122
Y3	5,21	Y27	111
Y4	68,9	Y28	7,91
Y5	17,7	Y29	12,5
Y6	7,17	Y31	31,5
Y7	19,5	Y32	45
Y8	6,07	Y33	2,15
Y9	4,21	Y35	42,1
Y11	15	Y37	90,4
Y12	69	Y38	104
Y13	83	Y39	2,72
Y14	62,8	Y41	191
Y15	162	Y42	14,6
Y16	19,2	Y43	1,20
Y17	4,22	Y44	36
Y18-1	53,6	Y45	36,2
Y18-2	5,82	Y46	9,63
Y19	5,07	Y47	232
Y21	113	Y48	252
Y22	21,8	Y49	6,52
Y23	10,1	Y50	3,77
Y24	5,42		

3.2.2. İzolatlara ait 16S rRNA dizi analizleri

Bakterilerin sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılan gen bölgesi 16S rRNA'dır. Bu bölge yaklaşık 1550 bp uzunluğunda olup korunmuş ve değişebilen bölgelerden oluşmaktadır. Toprakta izole edilen 45 izolatın tanımlanmasında ilk olarak 16S rRNA gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılarak nükleik asit dizilerinin ortaya çıkarılması üzerine gidildi. Bu amaçla, tüm izolatlar için Tablo 2.1'de belirtilen üç farklı primer çifti ile hazırlanan dört farklı PZR karışımı kullanılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, Y8, Y11, Y12, Y13, Y14, Y15, Y17, Y18-1, Y18-2, Y19, Y22, Y23, Y24, Y26, Y27, Y29, Y32, Y37 (Duman ve diğ., 2016), Y39, Y42, Y44, Y46, Y47 ve Y48 şeklinde numaralandırılan izolatlar için optimize edilen polimeraz zincir reaksiyonu; Tablo 2.1'de belirtilen 2. primer çifti ve Tablo 2.5'te yer alan PZR karışımı IV kullanılarak gerçekleştirildi. Diğer yandan Y9, Y16, Y25, Y28, Y31, Y33, Y35, Y38, Y41, Y43 ve Y45 izolatlarından elde edilen kromozomal DNA'ların da 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu için primerler (burada 1. primer çifti kullanıldı) hariç; Y21, Y49 ve Y50 izolatları için ise KOD Hot Start DNA polimeraz (Novagen, Almanya) enzimi hariç (burada Taq DNA polimeraz (NEB, İngiltere) enzimi

kullanıldı) aynı reaksiyon koşulları kullanıldı. Tümü için Tablo 2.6'da yer alan PZR döngüsü kullanıldı.

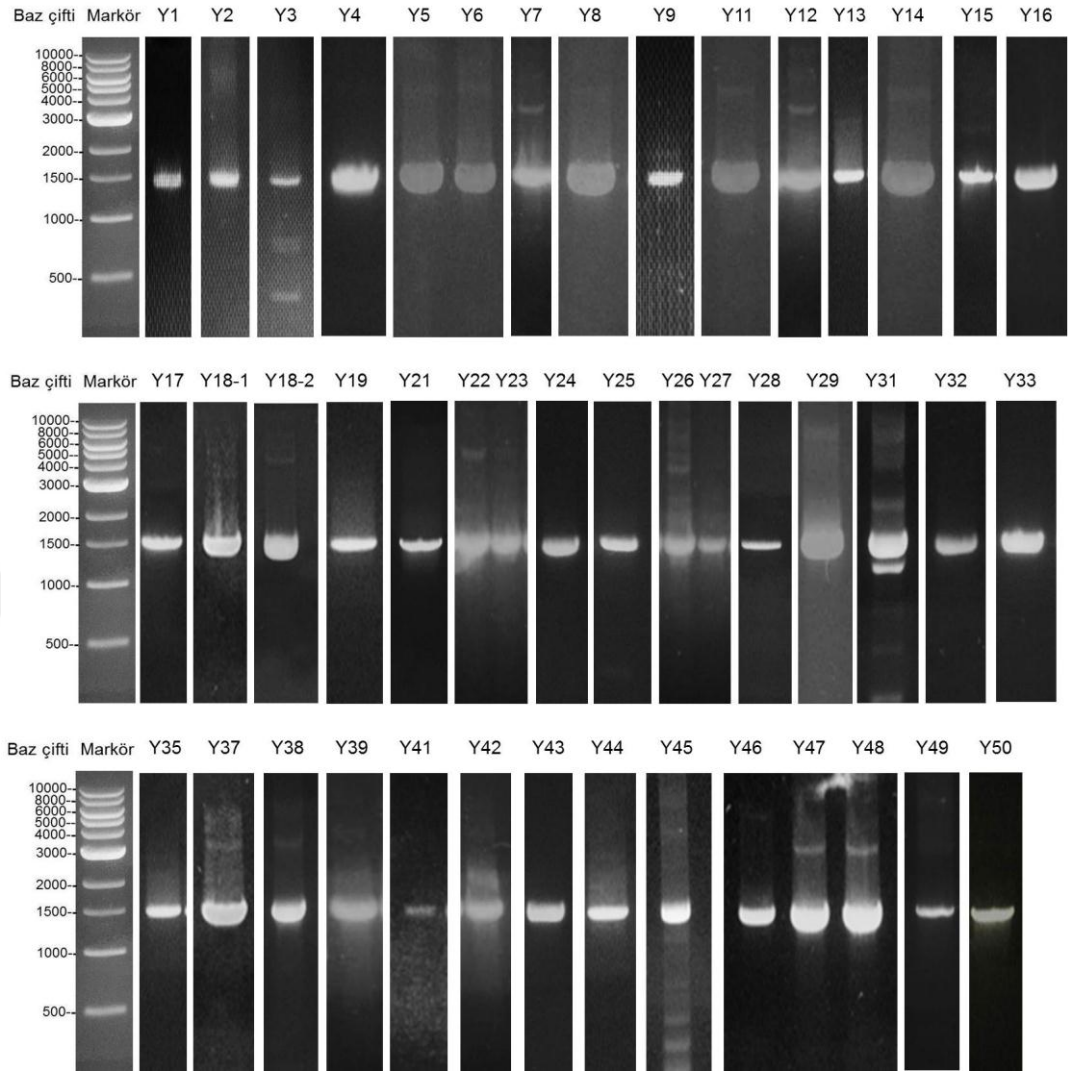
PZR sonucu elde edilen DNA konsantrasyonları Bölüm 2.5.3'te açıklanan şekilde Qubit 2.0 Fluorometer cihazında (Invitrogen, Amerika) ölçüldü (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin PZR sonrası genomik DNA konsantrasyonları

İzolat Numarası	PZR Sonrası DNA Konsantrasyonu (ng/μl)	İzolat Numarası	PZR Sonrası DNA Konsantrasyonu (ng/μl)
Y1	64,5	Y25	114
Y2	106	Y26	205
Y3	86,8	Y27	63,5
Y4	141	Y28	44,6
Y5	187	Y29	178
Y6	172	Y31	249
Y7	255	Y32	60,3
Y8	41,2	Y33	196
Y9	58,9	Y35	80,3
Y11	187	Y37	111
Y12	294	Y38	222
Y13	135	Y39	249
Y14	200	Y41	27,5
Y15	124	Y42	217
Y16	89,5	Y43	85
Y17	98,3	Y44	108
Y18-1	267	Y45	134
Y18-2	76,4	Y46	145
Y19	85,1	Y47	262
Y21	63,4	Y48	900
Y22	292	Y49	87,3
Y23	158	Y50	75
Y24	89,1		

PZR sonrası DNA konsantrasyonları 27,5 ila 900 ng/μl aralığında çıkmış olup, Y41 izolatının en düşük, Y48 izolatının ise en yüksek DNA konsantrasyonuna sahip olduğu gözlemlendi (Tablo 3.3).

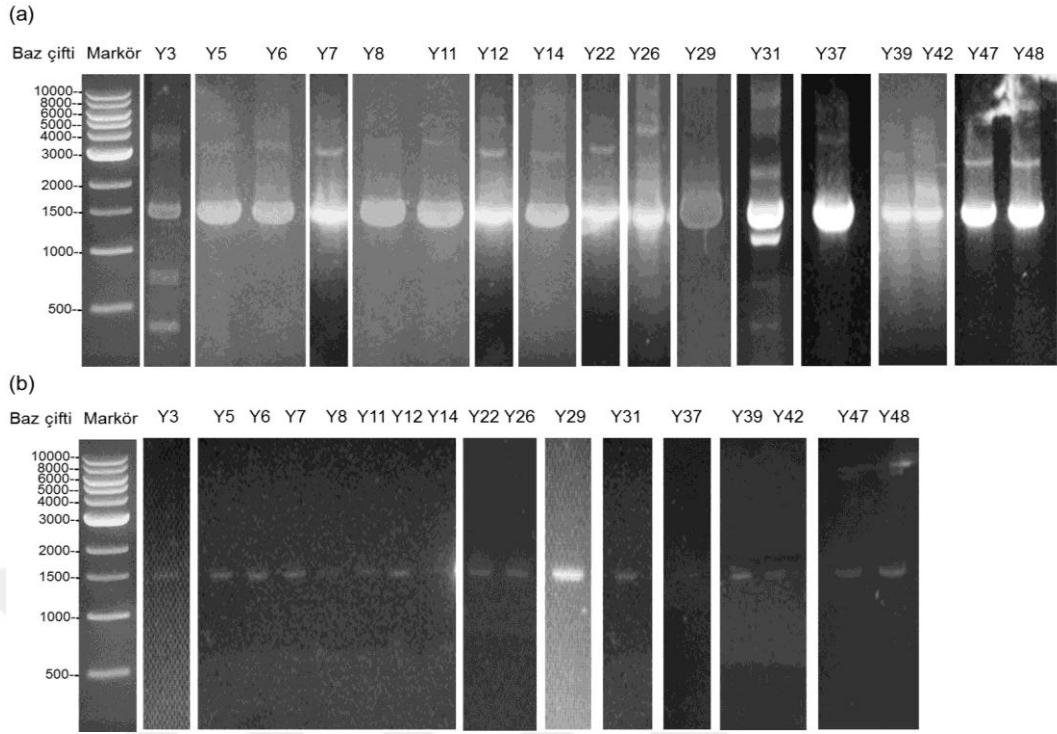
16S rRNA gen bölgesi çoğaltılan izolatların PZR ürünleri %1 (w/v)'lik agaroz jelde (Şekil 3.2) yürütüldü.



Şekil 3.2. İzolatlara ait kromozomal DNA'ların 16S rRNA gen bölgelerinin PZR sonrası agaroz jel görüntüleri

Y1, Y2, Y4, Y9, Y13, Y15, Y16, Y17, Y18-1, Y18-2, Y19, Y21, Y23, Y24, Y25, Y27, Y28, Y32, Y33, Y35, Y38, Y41, Y43, Y44, Y46, Y49 ve Y50 numaralı izolatlarda yaklaşık 1500 bç uzunluğunda tek bant gözlenirken, Y3, Y5, Y6, Y7, Y8, Y11, Y12, Y14, Y22, Y26, Y29, Y31, Y37, Y39, Y42, Y47 ve Y48 numaralı izolatlarda ise yaklaşık 1500 bç uzunluğundaki bandın yanında ekstra bantlar gözlemlendi (Şekil 3.2).

Şekil 3.3a'da, PZR sonrası hedef DNA'nın yanında ekstra bantların da gözlemlendiği izolatlara ait jel görüntüleri gösterildi. Bu tür örneklerden hedef DNA'ların saflaştırılmasında Bölüm 2.5.11'de ayrıntılı olarak ifade edilen yöntem kullanılmış olup daha sonra jel ekstraksiyonun başarılı olup olmadığı %1 (w/v)'lik agaroz jelde [5,5 µl örnek / 0,5 µl yükleme tamponu (6X; NEB, İngiltere)] test edildi. Agaroz jel elektroforezi sonrası elde edilen bantların görüntüsü ise Şekil 3.3b'de sunuldu.



Şekil 3.3. Jelden ekstrakte edilmesi gereken izolatlara ait 16S rRNA PZR ürünlerinin (a) ve ekstrakte edilen hedef DNA'ların (b) agaroz jel görüntüleri

PZR sonrası hedef DNA'nın yanında ekstra bantların da gözleendiği 17 farklı örneğe ait hedef DNA'ların jelden geri kazanımları Şekil 3.3b'de görüldüğü gibi başarı ile sonuçlandı (Tümünde yaklaşık 1500 bç uzunluğunda tek bir bant gözlenebildi).

Sekans analizi yapıldıktan sonra elde edilen diziler Gen Bankasında kayıtlı bulunan türlere ait 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılarak izolatların dizi eşleştirmeleri yapıldı (BLAST analizi). Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilerek sonuçlara Tablo 3.4'te yer verildi. Bu izolatların daha geniş listede BLAST analiz sonuçları Ek-B'de yer almaktadır.

Tablo 3.4. İzolatların 16S rRNA BLAST sonuçları

İzolat Numarası	Benzer Olduğu Bakteriler	Benzerlik (%)	İzolat Numarası	Benzer Olduğu Bakteriler	Benzerlik (%)
Y1 (16S rRNA-990bç)	<i>B. cereus</i> ATCC 14579 <i>B. cereus</i> JCM 2152 <i>B. cereus</i> CCM 2010	99 99 99	Y13 (16S rRNA-1037bç)	<i>B. methylotrophicus</i> CBMB205 <i>B. amyloliquefaciens</i> MPA 1034 <i>B. amyloliquefaciens</i> NBRC 15535	100 99 99
Y2 (16S rRNA-1227 bç)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 23055 <i>A. calcoaceticus</i> JCM 6842 <i>A. calcoaceticus</i> CIP 81.8	78 78 78	Y14 (16S rRNA-690 bç)	<i>B. pumilus</i> SAFR-032 <i>B. safensis</i> NBRC 100820 <i>B. pumilus</i> NBRC 12092	100 100 100
Y3 (16S rRNA-1211 bç)	<i>Bacillus sp.</i> DBT2TS4 <i>Bacillus sp.</i> SQ-1 <i>B. cereus</i> TS242	78 80 80	Y15	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633 <i>B. subtilis</i> JCM 1465 <i>B. subtilis</i> NBRC 13719	100 100 100
Y4 (16S rRNA-730 bç)	<i>Acinetobacter pittii</i> ATCC 19004 <i>A. pittii</i> LMG 1035 <i>A. pittii</i> CIP 70.29	100 100 100	Y16 (16S rRNA-710 bç)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305 <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> GTC 843 <i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	100 99 99
Y5 (16S rRNA-1007 bç)	<i>B. toyonensis</i> BCT-7112 <i>B. thuringiensis</i> Bk407 <i>B. cereus</i> ATCC 14579	100 100 100	Y17 (16S rRNA-950 bç)	<i>B. cereus</i> ATCC 14579 <i>B. cereus</i> JCM 2152 <i>B. cereus</i> CCM 2010	100 100 100
Y6 (16S rRNA-1229 bç)	<i>B. toyonensis</i> BCT-7112 <i>B. thuringiensis</i> ATCC 10792 <i>B. cereus</i> ATCC 14579	99 99 99	Y18-1 (16S rRNA-690 bç)	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> GTC1228 <i>S. hominis</i> DM 122 <i>S. haemolyticus</i> JCSC1435	99 99 99
Y7 (16S rRNA-1244 bç)	<i>B. pumilus</i> SAFR-032 <i>B. pumilus</i> NBRC 12092 <i>B. pumilus</i> ATCC 7061	100 100 100	Y18-2 (16S rRNA-740 bç)	<i>B. pumilus</i> SAFR-032 <i>B. safensis</i> NBRC 100820 <i>B. pumilus</i> NBRC 12092	100 100 100
Y8 (16S rRNA-1285 bç)	<i>B. cereus</i> ATCC 14579 <i>B. cereus</i> JCM 2152 <i>B. cereus</i> CCM 2010	100 100 100	Y19 (16S rRNA- 720 bç)	<i>B. amyloliquefaciens</i> MPA 1034 <i>B. methylotrophicus</i> CBMB205 <i>B. amyloliquefaciens</i> NBRC 15535	99 99 99
Y9 (16S rRNA-990 bç)	<i>B. cereus</i> ATCC 14579 <i>B. cereus</i> JCM 2152 <i>B. cereus</i> CCM 2010	99 99 99	Y21 (16S rRNA-1171 bç)	<i>Buchnera aphidicola</i> str. Sq <i>Buchnera aphidicola</i> str. APS	74 73
Y11 (16S rRNA-1282 bç)	<i>B. pumilus</i> SAFR-032 <i>B. pumilus</i> NBRC 12092 <i>B. pumilus</i> ATCC 7061	100 100 100	Y22 (16S rRNA-690 bç)	<i>B. pumilus</i> SAFR-032 <i>B. safensis</i> NBRC 100820 <i>B. pumilus</i> NBRC 12092	100 100 100
Y12 (16S rRNA-1246 bç)	<i>B. megaterium</i> ATCC 14581 <i>B. megaterium</i> NBRC 15308 <i>B. megaterium</i> IAM 13418	100 100 99	Y23 (16S rRNA-640 bç)	<i>B. anthracis</i> str. Ames <i>B. cereus</i> ATCC 14579 <i>B. cereus</i> JCM 2152	100 100 100

Tablo 3.4. (Devam) İzolatların 16S rRNA BLAST sonuçları

Izolat Numarası	Benzer Olduğu Bakteriler	Benzerlik (%)	Izolat Numarası	Benzer Olduğu Bakteriler	Benzerlik (%)
Y24 (16S rRNA-690 bç)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911 <i>S. epidermidis</i> Füssel <i>S. epidermidis</i> RP62A	100 100 99	Y39 (16S rRNA-740 bç)	<i>Staphylococcus hominis</i> DM 122 <i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> GTC1228 <i>S. haemolyticus</i> JCSC1435	99 99 99
Y25 (16S rRNA-680 bç)	<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580 <i>B. licheniformis</i> DSM 13 <i>B. licheniformis</i> BCRC 11702	99 99 99	Y41 (16S rRNA-1020 bç)	<i>Acinetobacter pittii</i> ATCC 19004 <i>A. pittii</i> LMG 1035 <i>A. calcoaceticus</i> NCCB 22016	99 99 99
Y26 (16S rRNA-670 bç)	<i>Staphylococcus pasteurii</i> <i>S. warneri</i> SG1 <i>S. warneri</i> AW 25	100 99 99	Y42 (16S rRNA-640 bç)	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> GTC1228 <i>S. hominis</i> DM 122 <i>S. haemolyticus</i> JCSC1435	100 99 99
Y27 (16S rRNA-660 bç)	<i>Acinetobacter radioresistens</i> NBRC 102413 <i>A. radioresistens</i> FO-1 <i>A. venetianus</i> ATCC 31012	99 99 99	Y43 (16S rRNA-655 bç)	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i> CK27 <i>S. cohnii</i> GH137 <i>S. nepalensis</i> CW1	100 99 99
Y28 (16S rRNA-670 bç)	<i>Acinetobacter radioresistens</i> FO-1 <i>A. radioresistens</i> NBRC 102413 <i>A. venetianus</i> ATCC 31012	90 90 89	Y44 (16S rRNA-750 bç)	<i>B. amyloliquefaciens</i> MPA 1034 <i>B. methylotrophicus</i> CBMB205 <i>B. amyloliquefaciens</i> NBRC 15535	99 99 99
Y29 (16S rRNA-1150 bç)	<i>Staphylococcus warneri</i> SG1 <i>S. warneri</i> AW 25 <i>S. pasteurii</i>	85 85 85	Y45 (16S rRNA-800 bç)	<i>Acinetobacter pittii</i> ATCC 19004 <i>A. pittii</i> LMG 1035 <i>A. pittii</i> CIP 70.29	100 100 100
Y31 (16S rRNA-1219 bç)	<i>Bacillus litoralis</i> SW-211 <i>Bacillus aerius</i> 24K <i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a	73 73 73	Y46 (16S rRNA-750 bç)	<i>B. anthracis</i> str. Ames <i>B. cereus</i> ATCC 14579 <i>B. cereus</i> JCM 2152	100 100 100
Y32 (16S rRNA-680 bç)	<i>Acinetobacter radioresistens</i> NBRC 102413 <i>A. radioresistens</i> FO-1 <i>A. venetianus</i> ATCC 31012	99 99 98	Y47 (16S rRNA-1062 bç)	<i>B. sonorensis</i> NRRL B-23154 <i>B. sonorensis</i> NBRC 101234 <i>B. licheniformis</i> DSM 13	100 99 99
Y33 (16S rRNA-890 bç)	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> GTC1228 <i>S. hominis</i> DM 122 <i>S. haemolyticus</i> JCSC1435	99 99 99	Y48 (16S rRNA-690 bç)	<i>B. sonorensis</i> NRRL B-23154 <i>B. sonorensis</i> NBRC 101234 <i>B. licheniformis</i> DSM 13	100 99 99
Y35 (16S rRNA-1031 bç)	<i>B. licheniformis</i> DSM 13 <i>B. licheniformis</i> BCRC 11702 <i>B. licheniformis</i> ATCC 14580	99 99 99	Y49 (16S rRNA-580 bç)	<i>B. atrophaeus</i> 1942 <i>B. amyloliquefaciens</i> MPA 1034 <i>B. siamensis</i> PD-A10	90 90 90
Y37 (16S rRNA-1312 bç)	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 <i>B. amyloliquefaciens</i> MPA 1034 <i>B. methylotrophicus</i> CBMB205	99 99 99	Y50 (16S rRNA-750 bç)	<i>B. toyonensis</i> BCT-7112 <i>B. thuringiensis</i> ATCC 10792 <i>B. cereus</i> ATCC 14579	100 100 99
Y38 (16S rRNA-1057 bç)	<i>B. sonorensis</i> NRRL B-23154 <i>B. sonorensis</i> NBRC 101234 <i>B. licheniformis</i> DSM 13	99 99 99			

BLAST analiz sonuçları incelendiğinde;

- ✓ Y2, Y4, Y16, Y18-1, Y21, Y24, Y26, Y27, Y28, Y29, Y32, Y33, Y39, Y41, Y42, Y43 ve Y45 izolatlarının *Bacillus* cinsine ait olmadıkları (Ek-B),
- ✓ Diğer izolatların ise farklı *Bacillus* türlerine ait oldukları (Ek B),
- ✓ Y1, Y3, Y5, Y6, Y8, Y9, Y17 ve Y50 izolatlarının BLAST analiz sonuçlarının benzerlik gösterdiği (Ek-B),
- ✓ Y7, Y11, Y14, Y18-2 ve Y22 izolatlarının BLAST analiz sonuçlarının benzerlik gösterdiği (Ek-B),
- ✓ Y13, Y19, Y37 ve Y44 izolatlarının BLAST analiz sonuçlarının benzerlik gösterdiği (Ek-B),
- ✓ Y23 ve Y46 izolatlarının BLAST analiz sonuçlarının benzerlik gösterdiği (Ek-B),
- ✓ Y25 ve Y35 izolatlarının BLAST analiz sonuçlarının benzerlik gösterdiği (Ek-B),
- ✓ Y38, Y47 ve Y48 izolatlarının BLAST analiz sonuçlarının benzerlik gösterdiği (Ek-B) gözlemlendi.

3.2.3. Y13 ve Y37 izolatlarının kısmi gyrA gen bölgelerinin dizi analizleri

Y13 ve Y37 izolatlarının tanımlanmalarında 16S rRNA gen dizisi yeterli olmadığından bu izolatların bir diğer korunmuş gen bölgesi olan kısmi gyrA gen bölgeleri çoğaltıldı. Kısmi gyrA geni üzerinde elde edilen bulgular 16S rRNA BLAST analizinden elde edilen sonuçları kanıtlamak ve teyit etmek amacıyla kullanılması açısından önem teşkil etmektedir.

Y37 izolatı için Tablo 2.1'de verilen 4. primer çifti, Tablo 2.7'de yer alan PZR reaksiyon karışımı V ve Tablo 2.9'da verilen döngü 1 kullanılarak, Y13 izolatı için ise aynı primer çifti ile Tablo 2.8'de yer alan PZR karışımı VI (Kromozomal DNA 6 µl eklenerek) ve Tablo 2.10'da verilen PZR döngüsü 2 kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirildi.

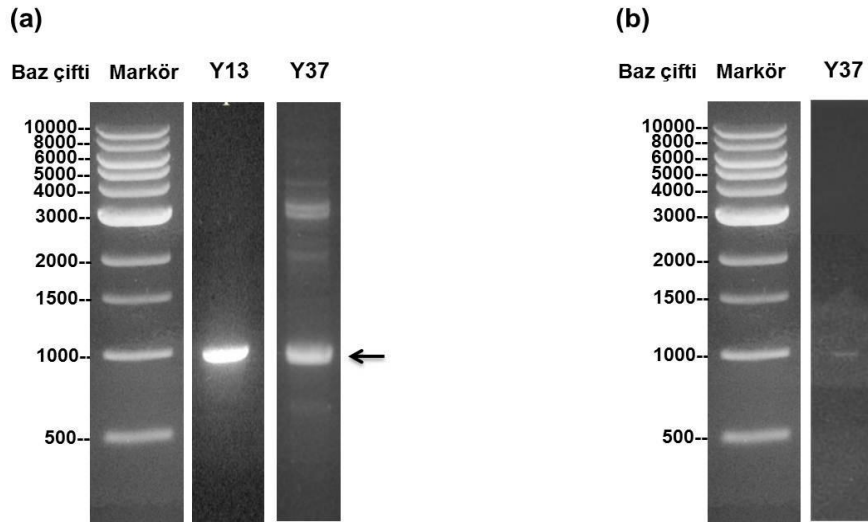
Y13 ve Y37 izolatlarına ait kısmi gyrA gen bölgelerinin PZR sonrası genomik DNA konsantrasyonları Tablo 3.5'te yer almaktadır.

Tablo 3.5. Y13 ve Y37 izolatlarına ait kısmi gyrA gen bölgelerinin PZR sonrası genomik DNA konsantrasyonları

İzolat Numarası	PZR Sonrası DNA Konsantrasyonu (ng/μl)
Y13	90,5
Y37	53,7

Y13 ve Y37 izolatlarına ait kısmi gyrA gen bölgelerinin PZR sonrası genomik DNA konsantrasyonlarına bakıldığında (Tablo 3.5) Y13'ün DNA konsantrasyonunun Y37'ninkinden daha yüksek olduğu görüldü.

Kısmi gyrA gen bölgeleri çoğaltılan izolatların (Y13 ve Y37) PZR ürünleri %1 (w/v)'lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.4a). PZR sonrası hedef DNA'nın yanında ekstra bantların da gözlemlendiği Y37 izolatından hedef DNA'nın saflaştırılmasında Bölüm 2.5.11'de ayrıntılı olarak ifade edilen yöntem kullanılmış olup daha sonra jel ekstraksiyonun başarılı olup olmadığı %1 (w/v)'lik agaroz jelde test edildi (Şekil 3.4b).



Şekil 3.4. Y13 ve Y37 izolatlarına ait kısmi gyrA gen bölgelerinin PZR sonrası (a) ve jelden ekstrakte edilen Y37 izolatına ait hedef DNA'nın (b) agaroz jel görüntüleri. Hedef DNA'ya ait bant, ok ile gösterildi

Y13 izolatında kısmi gyrA gen bölgesinin varlığını gösteren yaklaşık 1000 bp uzunluğunda tek bir bant gözlenirken, Y37 izolatında hedef DNA'nın yanında ekstra bantlar tespit edildi (Şekil 3.4a). Hedef DNA'nın (yaklaşık 1000 bp) jelden geri kazanımı Şekil 3.4b'de görüldüğü gibi başarı ile sonuçlandı.

Y13 ve Y37 izolatlarına ait kısmi *gyrA* gen bölgelerinin sekans analizi yapıldıktan sonra elde edilen dizileri Gen Bankasında kayıtlı bulunan *Bacillus* türlerine ait kısmi *gyrA* gen dizileri ile karşılaştırılarak izolatların dizi eşleştirmeleri yapıldı (BLAST analizi). Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilerek sonuçlara Tablo 3.6'da yer verildi. Bu izolatların daha geniş listede BLAST analiz sonuçları Ek-B'de yer almaktadır.

Tablo 3.6. Y13 ve Y37 izolatlarının kısmi *gyrA* BLAST sonuçları

İzolat Numarası	Benzer Olduğu Bakteriler	Benzerlik(%)
Y13 (<i>gyrA</i> -852 bç)	<i>B. methylotrophicus</i> YJ11-1-4	99
	<i>B. amyloliquefaciens</i> SQR9	99
	<i>B. subtilis</i> ATCC 19217	99
Y37 (<i>gyrA</i> -914 bç)	<i>B. methylotrophicus</i> YJ11-1-4	99
	<i>B. amyloliquefaciens</i> SQR9	99
	<i>B. subtilis</i> ATCC 19217	99

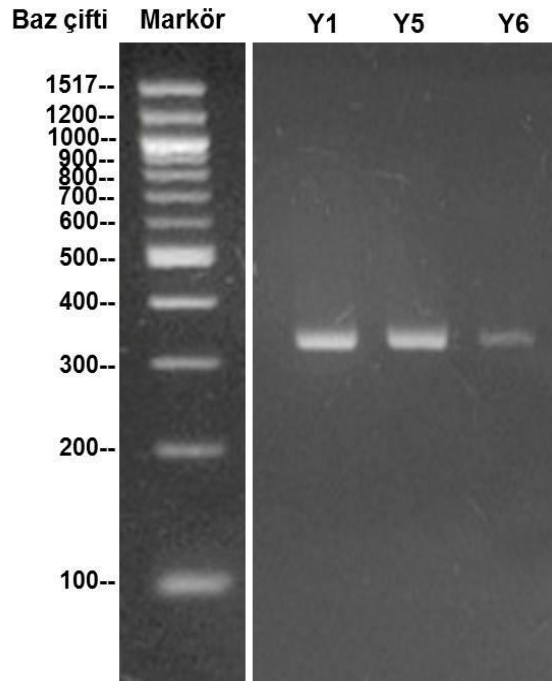
3.2.4. Y1, Y5 ve Y6 izolatlarında kısmi *gyrB* gen bölgesinin dizi analizi ve Sau3AI ile kesimi

16S rRNA sonucuna göre *B. cereus* grubu içinde tanımlanan Y1, Y5 ve Y6'nın bu grupta yer alan türler (*B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. mycoides*) için moleküler ayrımlarının yapılması amacıyla kısmi *gyrB* gen bölgelerinin çoğaltılmasına gidildi. Bu bölge yaklaşık 352 bç uzunluğundadır (Manzano ve diğ., 2003). Amaca uygun olarak Y1, Y5 ve Y6'ya ait kromozomal DNA'lar, Tablo 2.1'de verilen 5. primer çifti, Tablo 2.7'de yer alan PZR karışımı V ve Tablo 2.9'da verilen PZR döngüsü 1 kullanılarak kısmi *gyrB* gen bölgeleri çoğaltıldı.

PZR sonucu elde edilen DNA konsantrasyonları Bölüm 2.5.3'te açıklanan şekilde Qubit 2.0 Fluorometer cihazında (Invitrogen, Amerika) ölçüldü (Tablo 3.7) ve örneklerle ait yaklaşık 352 bç uzunluğunda bantlar %2,5 (w/v)'luk agaroz jelde görüntülendi (Şekil 3.5).

Tablo 3.7. Y1, Y5 ve Y6 izolatlarına ait kısmi *gyrB* gen bölgesinin PZR sonrası genomik DNA konsantrasyonları

İzolat Numarası	PZR Sonrası DNA Konsantrasyonu (ng/μl)
Y1	30
Y5	26,1
Y6	7,01



Şekil 3.5. Y1, Y5 ve Y6 izolatlarına ait kromozomal DNA'nın kısmi gyrB gen bölgesinin PZR sonrası agaroz jel görüntüsü

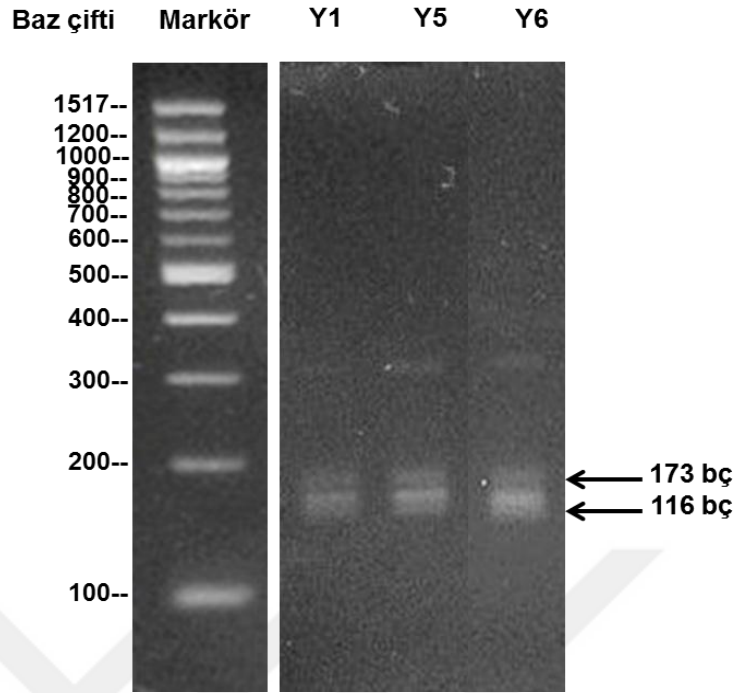
Şekil 3.5'te görüldüğü gibi Y1, Y5 ve Y6'da yaklaşık 352 bç uzunluğunda ürün gözükmemekte; bu da kısmi gyrB geninin çoğaltıldığına işaret etmektedir. En düşük ürün miktarı Y6 izolatında gözlemlendi (Tablo 3.7).

Y1 izolatına ait kısmi gyrB gen bölgesinin sekans analizi yapıldıktan sonra elde edilen dizisi Gen Bankasında kayıtlı bulunan *Bacillus* türlerine ait kısmi gyrB gen dizileri ile karşılaştırılarak izolatın dizi eşleştirmeleri yapıldı (BLAST analizi). Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilerek sonuçlara Tablo 3.8'de yer verildi. Bu izolatın daha geniş listede BLAST analiz sonucu ise Ek-B'de yer almaktadır.

Tablo 3.8. Y1 izolatına ait kısmi gyrB BLAST sonuçları

İzolat Numarası	Benzer Olduğu Bakteriler	Benzerlik(%)
Y1 (gyrB-288bç)	<i>B. cereus</i> FORC 005	100
	<i>B. cereus</i> m1550	100
	<i>B. thuringiensis</i> YC-10	99

Daha sonra bu gyrB örnekleri, Sau3AI enzimi ile Tablo 2.11'de yer alan reaksiyon karışımı içinde 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası örnekler %2,5 (w/v)'luk agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Y1, Y5 ve Y6 izolatlarına ait kısmi gyrB PZR ürünlerinin Sau3AI enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü. Oklar; Sau3AI enzimi ile kesim sonrası DNA bantlarını göstermektedir

Şekil 3.6'da görüldüğü gibi Y1, Y5 ve Y6 izolatlarına ait kısmi gyrB geninin Sau3AI enzimi ile kesimi sonrası iki adet bant gözlemlendi.

3.2.5. Y1 izolatında cry gen analizi

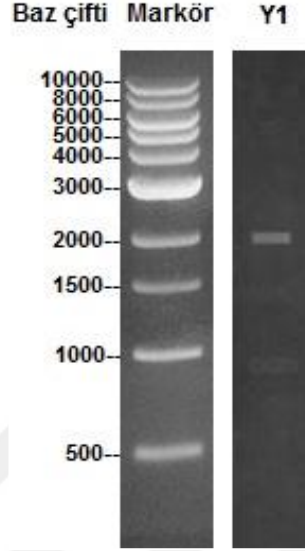
B. cereus grubu içinde tanımlanan Y1 izolatının *B. cereus* ya da *B. thuringiensis* olup olmadığının tespiti amacıyla "cry" geninin varlığına bakıldı. Bu gen plazmid üzerinde bulunduğundan öncelikle Y1'e ait plazmid DNA, Bölüm 2.5.8'de açıklanan şekilde izole edilip, DNA konsantrasyonu Bölüm 2.5.3'te açıklanan şekilde Qubit 2.0 Fluorometer cihazında (Invitrogen, Amerika) ölçüldü (Tablo 3.9). Elde edilen plazmid DNA konsantrasyonu, bir sonraki adım olan cry geninin çoğaltılması için yeterlidir.

Tablo 3.9. Y1 izolatına ait plazmid DNA konsantrasyonu

İzolat Numarası	Plazmid DNA Konsantrasyonu (ng/µl)
Y1	9,96

Y1 izolatının plazmid DNA'sı ve Tablo 2.1'de verilen 6. primer çifti, cry genini taşıyan DNA bölgesinin amplifikasyonu için kullanıldı. Amplifikasyon çalışması Bölüm

2.5.8'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. PZR ürünü daha sonra %1 (w/v)'lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Y1 izolatına ait cry gen bölgesinin PZR sonrası agaroz jel görüntüsü

Şekil 3.7'de görüldüğü gibi Y1 izolatında cry gen varlığını gösteren yaklaşık 1600-1700 bp uzunluğunda bant gözlenmediği tespit edildi.

3.3. *Bacillus* İzolatlarının Biyokimyasal Analizi

İzole edilen 45 izolattan hem morfolojik özelliklerine hem de korunmuş gen bölgelerine göre benzer olanlar aynı grup altında toplandı ve benzer olan gruplardan en az bir izolat seçilerek biyokimyasal testler uygulandı.

3.3.1. İzolatlarda gram boyama testi

İzolatların gram boyama sonuçları Tablo 3.10'da detaylı olarak yer almaktadır. Yapılan gram boyamalarda Y4, Y16, Y25, Y27, Y29, Y31, Y32 (kokobasil), Y33, Y39, Y42 ve Y46 izolatlarının yuvarlak (kok) olduğu belirlendi. Y25, Y27, Y32 ve Y41 izolatları pembe boyandığı için Gram negatif, diğerleri mor boyandığı için Gram pozitif olarak değerlendirildi.

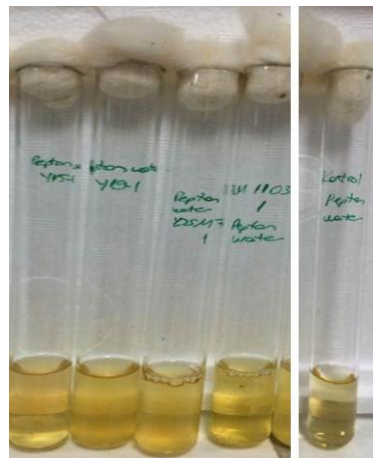
Tablo 3.10. İzolatların gram boyama sonuçları ve hücre şekillerinin karşılaştırılması

İzolat Numarası	Gram boyama	Hücre Şekli
Y4	+	Kok
Y16	+	Kok
Y25	-	Kok
Y27	-	Kok
Y29	+	Kok
Y31	+	Kok
Y32	-	Kokobasil
Y33	+	Kok
Y39	+	Kok
Y41	-	Basil
Y42	+	Kok
Y46	+	Kok

3.3.2. İzolatlarda IMViC testi

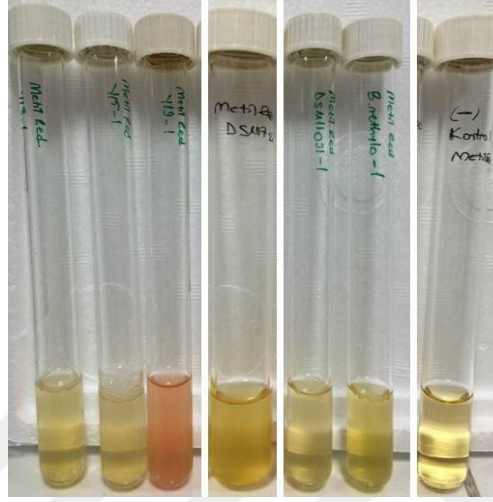
IMViC testleri Bölüm 2.6.2'de anlatıldığı gibi Y13, Y15, Y19, Y37 izolatları ile laboratuvarımızda hâlihazırda bulunan referans suşlardan *B. amyloliquefaciens* (DSM7), *B. vallismortis* (DSM11031) ve *B. methylotrophicus* (DSM28326)'a uygulandı.

İndol test sonucuna göre; Y13, Y37 (Duman ve diğ., 2016) ve *B. methylotrophicus* (DSM28326) (Duman ve diğ., 2016) hariç Y15, Y19, *B. amyloliquefaciens* (DSM7) ve *B. vallismortis* (DSM11031) ortamda bulunan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getiremedikleri için renk değişimi gözlenmedi ve test negatif olarak değerlendirildi (Şekil 3.8).



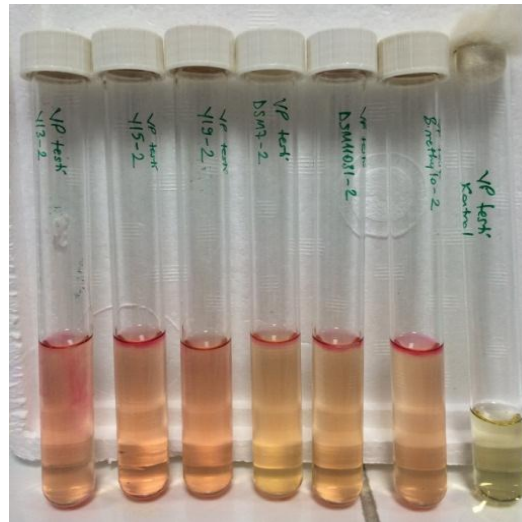
Şekil 3.8. İndol testi sonuçları. Y15, Y19, DSM7, DSM11031, (-) Kontrol

Y13, Y15, Y37, *B. amyloliquefaciens* (DSM7), *B. vallismortis* (DSM11031) ve *B. methylotrophicus* (DSM28326) glukoz metabolizması sonucu metil kırmızısı besiyerinde renk değişimi meydana getiremedikleri için sonuç negatif, Y19 izolatu ise organik asit üretildiğinden renk değişimi gözleendiğinden sonuç pozitif olarak kaydedildi (Şekil 3.9).



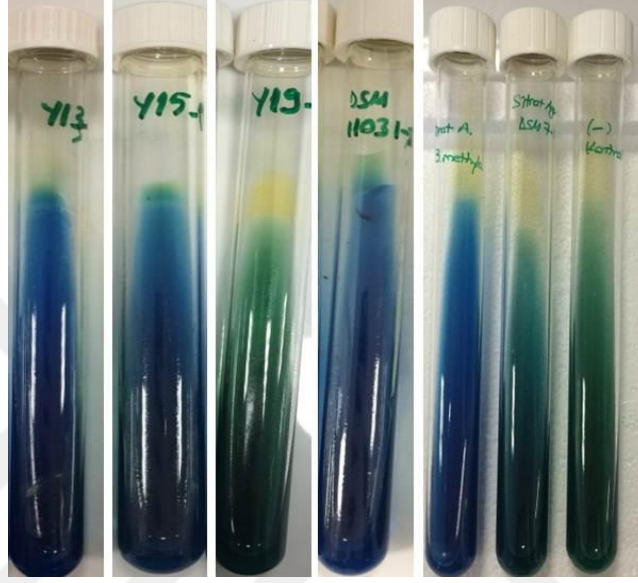
Şekil 3.9. Metil Kırmızısı (Red) testi sonuçları. Y13, Y15, Y19, DSM7, DSM11031, DSM28326, (-) Kontrol

MR-VP Broth (Merck) besiyeri ile yapılan Voges-Proskauer testi sonuçları; Y13, Y15, Y19, Y37 (Duman ve diğ., 2016), *B. amyloliquefaciens* (DSM7), *B. vallismortis* (DSM11031) ve *B. methylotrophicus* (DSM28326)'da pembe renk değişimi gözleendiğinden sonuç pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Voges-Proskauer testi sonuçları. Y13, Y15, Y19, DSM7, DSM11031, DSM28326, (-) Kontrol

Simmon's Sitrat Agar'a (Merck) ekim yapılarak uygulanan sitrat test sonucunda; Y13, Y15, Y37 (Duman ve diğ., 2016), *B. amyloliquefaciens* (DSM7), *B. vallismortis* (DSM11031) ve *B. methylotrophicus* (DSM28326) sitratı tek karbon kaynağı olarak kullandıkları için besiyerinde yeşilden maviye renk değişimi gözlemlendi ve sonuç pozitif olarak değerlendirilirken, Y19 izolatında renk değişimi gözlenmediği için sonuç negatif olarak değerlendirildi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Sitrat testi sonuçları. Y13, Y15, Y19, DSM11031, DSM28326, DSM7, (-) Kontrol

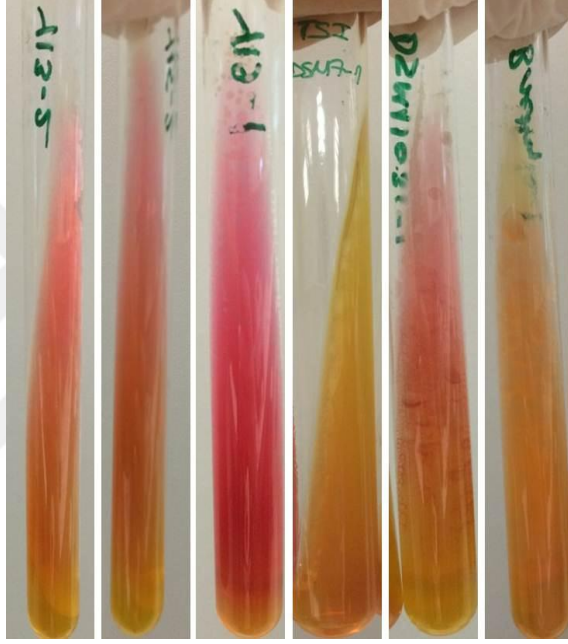
IMViC testlerinin sonuçları Tablo 3.11'de özetlendi. Tablo incelendiğinde Y13 ve Y37 izolatlarının *B. methylotrophicus* (DSM28326) ile Y15 izolatının ise *B. amyloliquefaciens* (DSM7) ve *B. vallismortis* (DSM11031) ile aynı sonuçları verdikleri gözlemlendi.

Tablo 3.11. IMViC testlerinin sonuçları

	Y13	Y15	Y19	Y37	<i>B. methylotrophicus</i> DSM28326	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7	<i>B. vallismortis</i> DSM11031
İndol	+	-	-	+	+	-	-
Metil Kırmızısı	-	-	+	-	-	-	-
Voges Proskauer	+	+	+	+	+	+	+
Sitrat	+	+	-	+	+	+	+

3.3.3. İzolatlarda üç şekerli demir (TSI) agar testi

Üç şekerli demir agar testi, Bölüm 2.6.3'te anlatıldığı gibi Y13, Y15, Y19 ve Y37 (Duman ve diğ., 2016) izolatları ile laboratuvarımızda bulunan *B. amyloliquefaciens* (DSM7), *B. vallismortis* (DSM11031) ve *B. methylotrophicus* (DSM28326) suşlarına uygulandı (Şekil 3.12). Sonuçlara bakıldığında; hiçbir izolatın hidrojen sülfür oluşturmadığı, tümünün glukozdan asit ürettiği ve sadece Y37, *B. amyloliquefaciens* (DSM7), *B. methylotrophicus* (DSM28326)'un laktozdan ve/veya sükrozdan asit üretebildikleri gözlemlendi (Tablo 3.12).



Şekil 3.12. Üç şekerli demir agar test sonuçlarının görüntüleri. Y13, Y15, Y19, DSM7, DSM11031 ve DSM28326

Tablo 3.12. Üç şekerli demir agar testi sonuçları

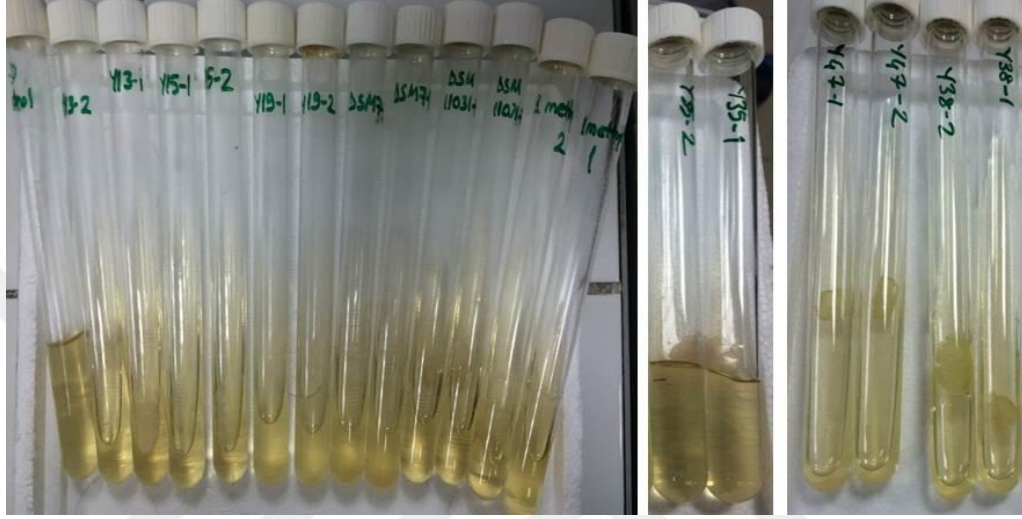
	Y13	Y15	Y19	Y37	<i>B. methylotrophicus</i> DSM28326	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7	<i>B. vallismortis</i> DSM11031
H ₂ S üretimi	-	-	-	-	-	-	-
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+
Laktöz/Sükroz	-	-	-	+	+	+	-

3.3.4. İzolatlarda jelatin ve nişasta hidroliz testi

Bölüm 2.6.4'te anlatıldığı şekilde jelatin hidroliz testi; Y13, Y15, Y19, Y35, Y37, Y38, Y47, *B. amyloliquefaciens* (DSM7), *B. vallismortis* (DSM11031) ve *B. methylotrophicus* (DSM28326)'a, nişasta hidroliz testi ise Y13, Y15, Y19, Y37, *B.*

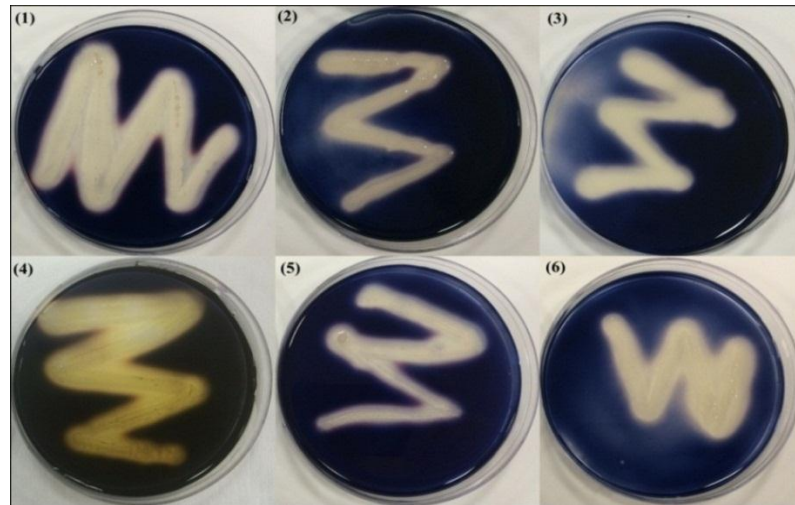
amyloliquefaciens (DSM7), *B. vallismortis* (DSM11031) ve *B. methylotrophicus* (DSM28326)'a uygulandı.

Y35 izolatı jelatini hidrolize edemezken, Y13, Y15, Y19, Y37 (Duman ve diğ., 2016), Y38, Y47, *B. amyloliquefaciens* (DSM7), *B. vallismortis* (DSM11031) ve *B. methylotrophicus* (DSM28326) ise jelatini hidrolize edebilmektedir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Jelatin hidroliz testi sonuçları. (-) Kontrol, Y13, Y15, Y19, DSM7, DSM11031, DSM28326, Y35, Y47, Y38

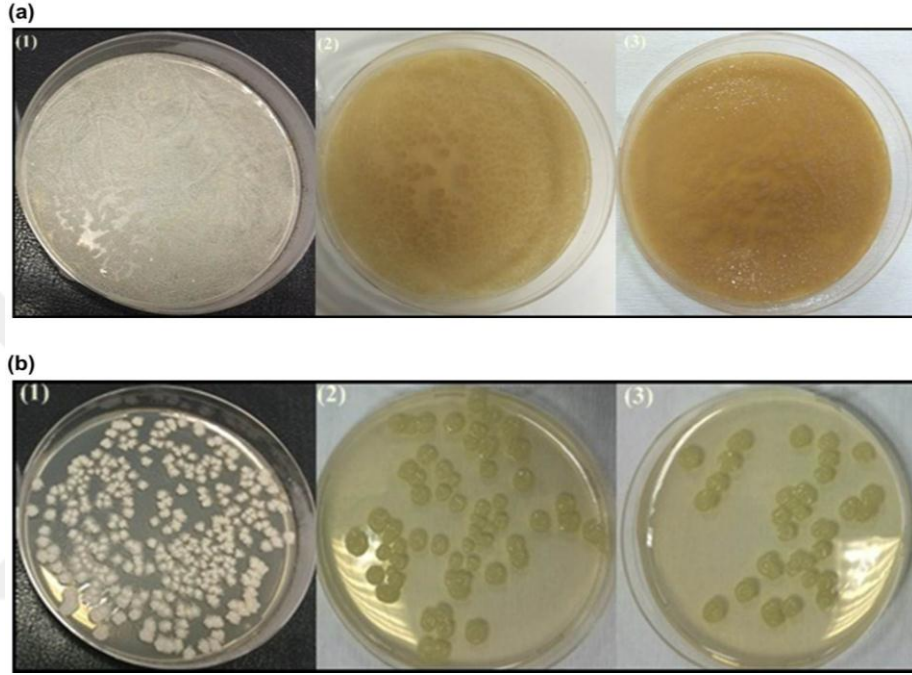
Nişasta hidroliz testi sonuçlarına göre ise; Y13, Y15, Y19, Y37 (Duman ve diğ., 2016), *B. amyloliquefaciens* (DSM7), *B. vallismortis* (DSM11031) ve *B. methylotrophicus* (DSM28326) (Duman ve diğ., 2016) nişastayı hidrolize edebilmektedirler (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Nişasta hidrolizasyon testi sonuçları. (1) Y13, (2) Y15, (3) Y19, (4) DSM7, (5) DSM11031, (6) DSM28326

3.3.5. Tirozin agar ve pH 5,6 agar besiyerlerinde büyüme yeteneklerinin analizi

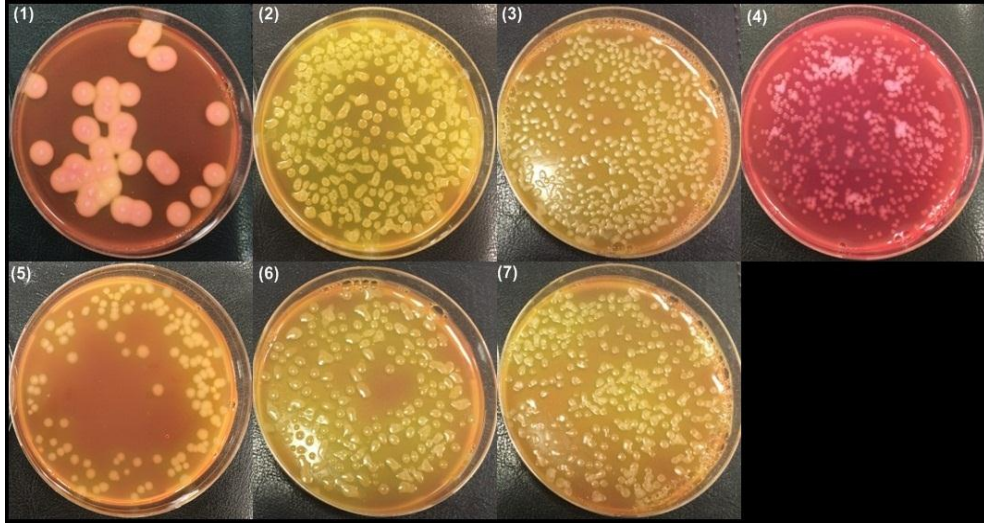
B. sonorensis ve *B. licheniformis* türlerinin ayrımı için Y35, Y38 ve Y47 izolatları; Bölüm 2.6.5'te anlatıldığı gibi Tirozin ve pH 5,6 agar besiyerlerine (Ek-C) ekildi ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası; Y35 izolatında her iki besiyerinde de krem renkli koloniler gözlenirken, Y38 ve Y47 izolatlarında ise Tirozin agarda kahverengi, pH 5,6 agarda ise parlak sarı koloniler gözlemlendi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Y35, Y38 ve Y47 izolatlarının Tirozin (a) ve pH 5,6 (b) agar besiyerlerindeki görüntüleri (1); Y35, (2); Y38, (3); Y47

3.3.6. MYP (Mannitol egg yolk polymyxine) agar besiyerinde büyüme potansiyelleri

Özellikle *B. cereus* izolatının ayırt edilmesi amacıyla Y1, Y13, Y15, Y19, *B. amyloliquefaciens* (DSM7), *B. vallismortis* (DSM11031) ve *B. methylotrophicus* (DSM28326) Bölüm 2.6.6'da anlatıldığı şekilde MYP Agar (Merck) besiyerine ekildi, 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası morfoloji görüntülerine Şekil 3.16'da yer verildi.



Şekil 3.16. Farklı *Bacillus* izolatlarına ait MYP Agar besiyerindeki morfolojileri. (1); Y1, (2); Y13, (3); Y15, (4); Y19, (5); DSM7, (6); DSM11031, (7); DSM28326

Şekil 3.16'da; Y13, Y15, *B. amyloliquefaciens* (DSM7), *B. vallismortis* (DSM11031) ve *B. methylotrophicus* (DSM28326)'un mannitolü kullanabildiği, Y1 ve Y19'un ise mannitolü kullanamadığı ayrıca lesitinaz aktivitesinin sadece Y1'de meydana geldiği gözlemlendi (Tablo 3.13).

Tablo 3.13. Farklı *Bacillus* izolatlarının MYP Agar besiyerindeki sonuçları

	Y1	Y13	Y15	Y19	<i>B.</i> <i>methylotrophicus</i> DSM28326	<i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> DSM7	<i>B.</i> <i>vallismortis</i> DSM11031
Mannitol	-	+	+	-	+	+	+
Lesitinaz	+	-	-	-	-	-	-

3.3.7. Sıcaklık, pH ve NaCl'nin büyüme üzerine etkilerinin belirlenmesi

Y1, Y7, Y12, Y13, Y15, Y19, Y35, Y37, Y38 ve Y47 izolatları ve için sıcaklık, pH ve NaCl'nin büyüme üzerine etkilerinin sonuçlarına Tablo 3.14'te yer verildi. Buna göre aşağıda verilen bulgular ortaya çıkmaktadır:

- ✓ Y1 izolatının; 30°C ve 45°C sıcaklıklarda, pH 5-10 aralığında ve %3 (w/v) NaCl'da,
- ✓ Y7 izolatının; 30°C, 45°C ve 50°C sıcaklıklarda, pH 5-10 aralığında ve %3-5 (w/v) NaCl'da,
- ✓ Y12 izolatının; 30°C ve 45°C sıcaklıkta, pH 5-9 aralığında ve %3 (w/v) NaCl'da,

- ✓ Y13, Y37 ve *B. methylotrophicus* (DSM28326)'un 30°C ve 45°C sıcaklıkta, pH 5-9 aralığında ve %3-10 (w/v) NaCl aralığında,
- ✓ Y15 izolatının; 30°C, 45°C ve 50°C sıcaklıklarda, pH 5-9 aralığında ve %3-8 (w/v) NaCl aralığında,
- ✓ Y19 izolatının; 30°C sıcaklıkta, pH 6-10 aralığında ve %3 (w/v) NaCl'da,
- ✓ Y35 izolatının; 30°C, 45°C ve 50°C sıcaklıklarda, pH 5-9 aralığında ve %3-12 (w/v) NaCl aralığında,
- ✓ Y38 ve Y47 izolatlarının ise; 30°C, 45°C ve 50°C sıcaklıklarda, pH 5-9 aralığında ve %3-5 (w/v) NaCl aralığında büyüme gösterdiği tespit edildi.



Tablo 3.14. İzolatların farklı sıcaklık, pH ve NaCl tolerans sonuçları

	Y1	Y7	Y12	Y13	Y15	Y19	Y35	Y37	Y38	Y47	<i>B. methylotrophias</i> DSM28326	<i>B. amyloquefaciens</i> DSM7	<i>B. vallismortis</i> DSM11031
Büyüme sıcaklığı (°C)													
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
50	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH													
5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl miktarı (% w/v)													
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
10	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.3.8. VITEK-MS (Kütle spektrometresi) analizi

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan VITEK-MS cihazı (bioMérieux, Fransa) ile biyokimyasal olarak karakterize edilen izolatların analiz sonuçları Tablo 3.15'te listelendi.

Tablo 3.15. İzolatlara ait VITEK-MS sonuçları

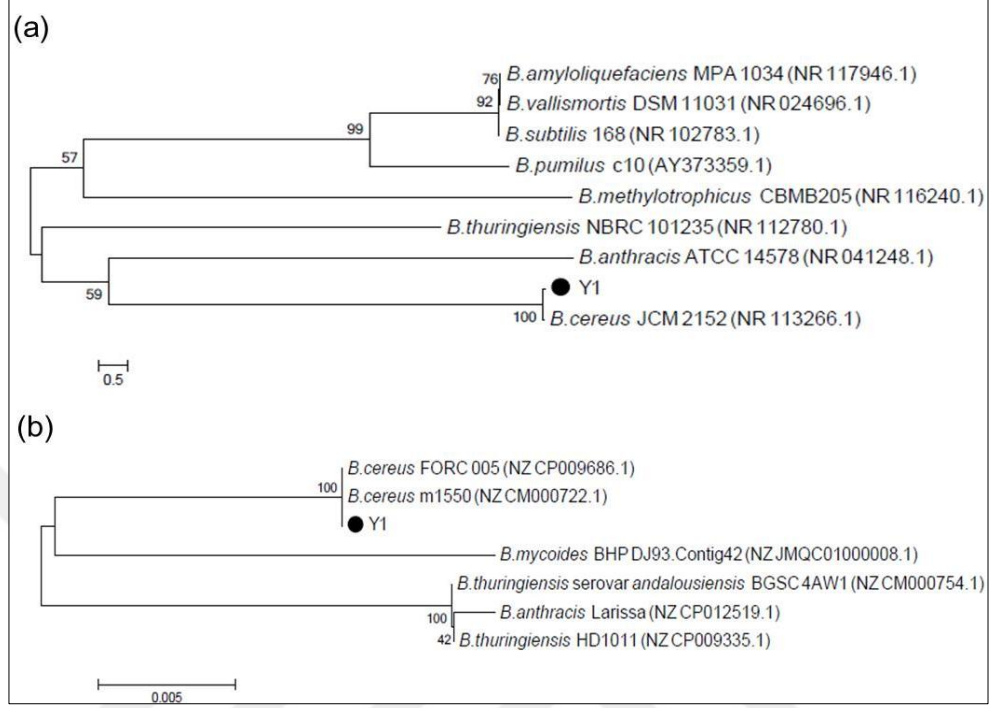
İzolat Numarası	MS Sonuçları	Benzerlik %	İzolat Numarası	MS Sonuçları	Benzerlik %
Y1	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. cereus</i>	33,3	Y18-2	<i>B. pumilus</i>	99
Y2	<i>B. thuringiensis</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. cereus</i>	33	Y19	<i>B. thuringiensis</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. cereus</i>	33
Y3	<i>B. thuringiensis</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. cereus</i>	33,3	Y22	<i>B. pumilus</i>	99
Y4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99	Y32	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	99
Y5	<i>B. thuringiensis</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. cereus</i>	33,3	Y33	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
Y7	<i>B. pumilus</i>	99	Y35	<i>B. licheniformis</i>	99
Y12	<i>B. megaterium</i>	99,9	Y37	<i>B. subtilis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>	50
Y13	<i>B. subtilis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>	50	Y38	<i>B. licheniformis</i>	99
Y14	<i>B. pumilus</i>	99	Y50	<i>B. thuringiensis</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. cereus</i>	33
Y16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99			

İzolatların VITEK-MS sonuçlarına bakıldığında; Y4, Y16, Y32, Y33 numaralı izolatların *Bacillus* cinsine ait olmadıkları, Y1, Y2, Y3, Y5, Y19, Y50; Y7, Y14, Y18-2, Y22; Y13, Y37; Y35 ve Y38 numaralı izolatların ise kendi içlerinde birbirleriyle aynı sonuçları verdikleri tespit edildi (Tablo 3.15).

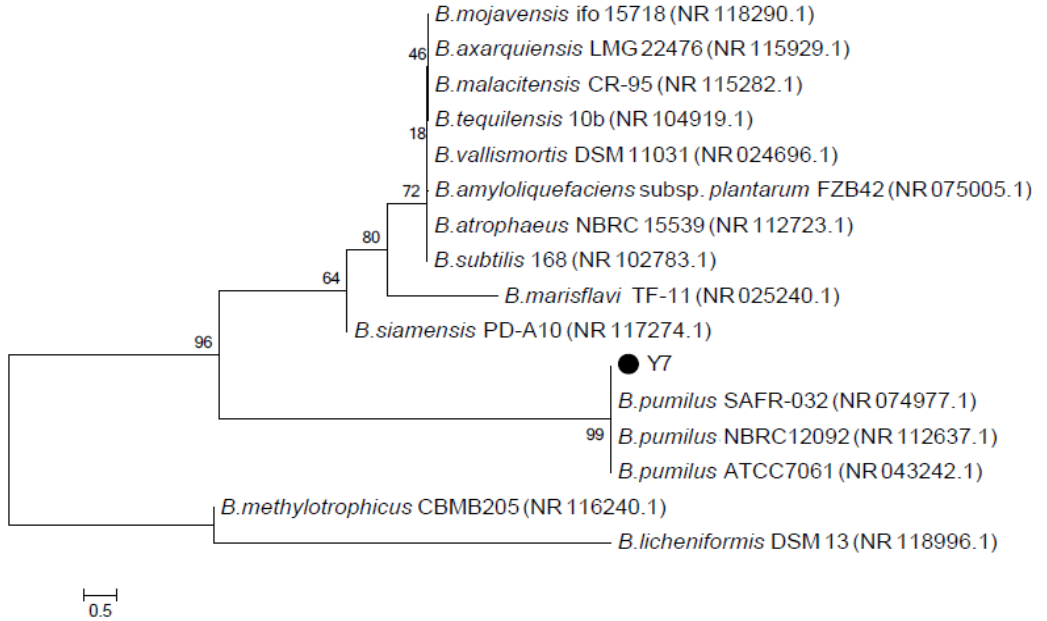
3.4. Filogenetik Analizlerin Karşılaştırılması

Y1, Y7, Y12, Y13, Y15, Y35, Y37, Y38 ve Y47 izolatların yakın ilişkili olduğu bakteriler ile filogenetik benzerlikleri belirlendi. Elde edilen dendogram'a göre Y1 izolatının *B. cereus*, Y12 izolatının *B. megaterium*, Y13 ve Y37 izolatlarının *B. methylotrophicus* (Duman ve diğ., 2016), Y15 izolatının *B. subtilis*, Y35 izolatının *B.*

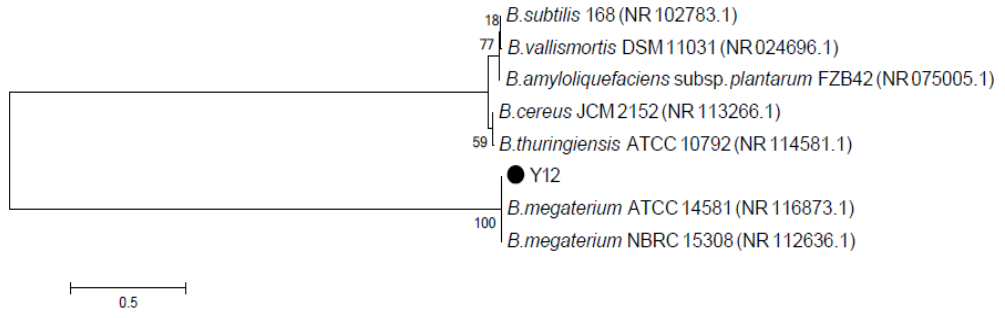
licheniformis, Y38 ve Y47 izolatlarının ise *B. sonorensis* ile benzerlik gösterdiği tespit edildi. İzolatların filogenetik ağaçları; Şekil 3.17-3.25'de yer almaktadır.



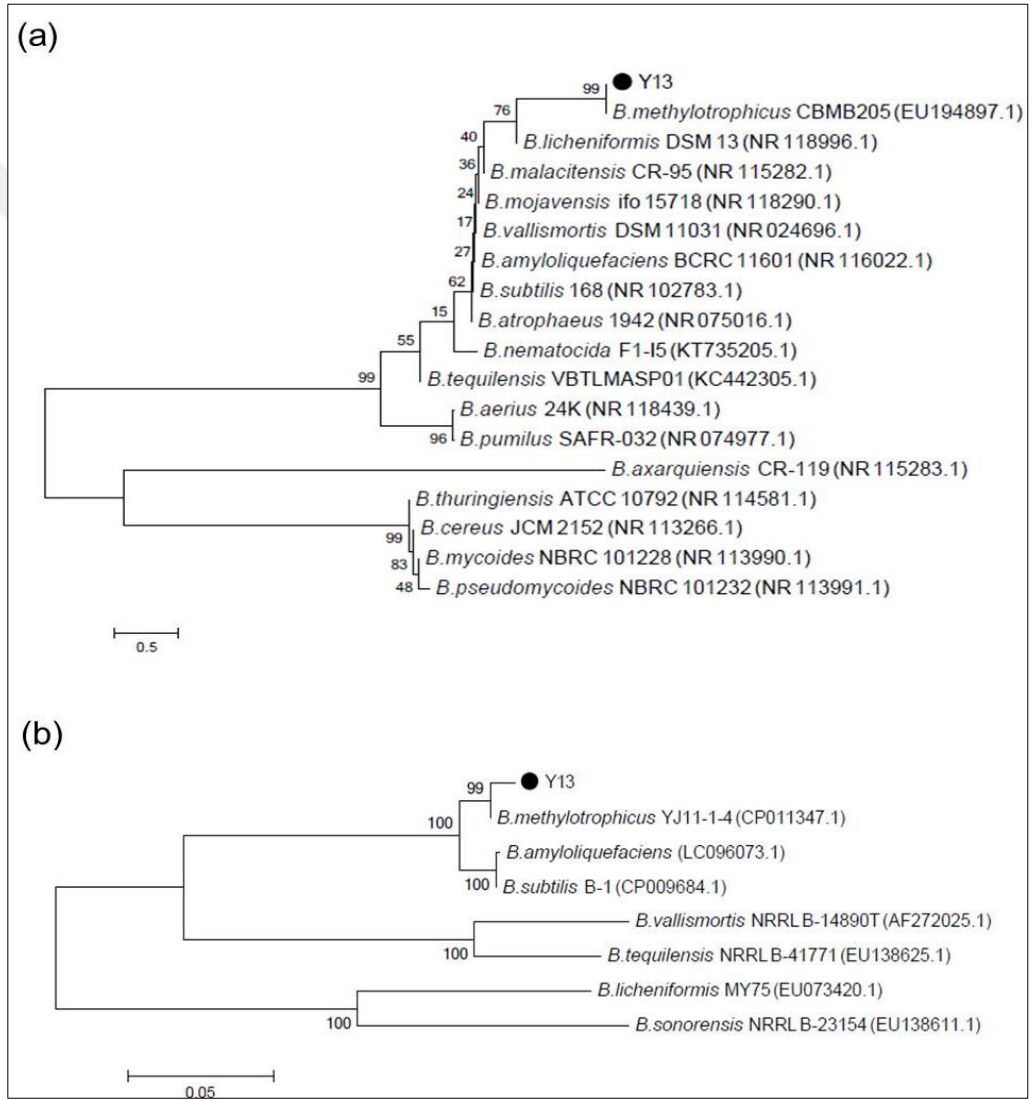
Şekil 3.17. Y1 izolatının 16S rRNA (a) ve kısmi gyrB (b) gen bölgelerine ait filogenetik ağaçları



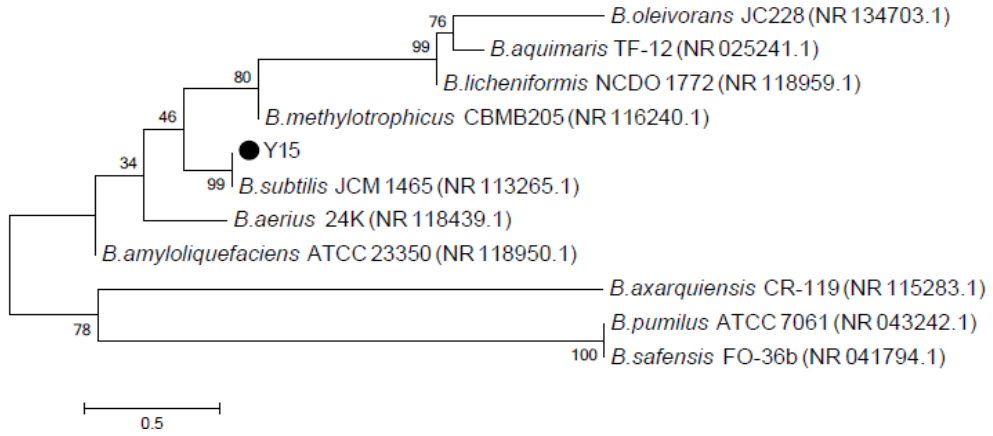
Şekil 3.18. Y7 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait filogenetik ağacı



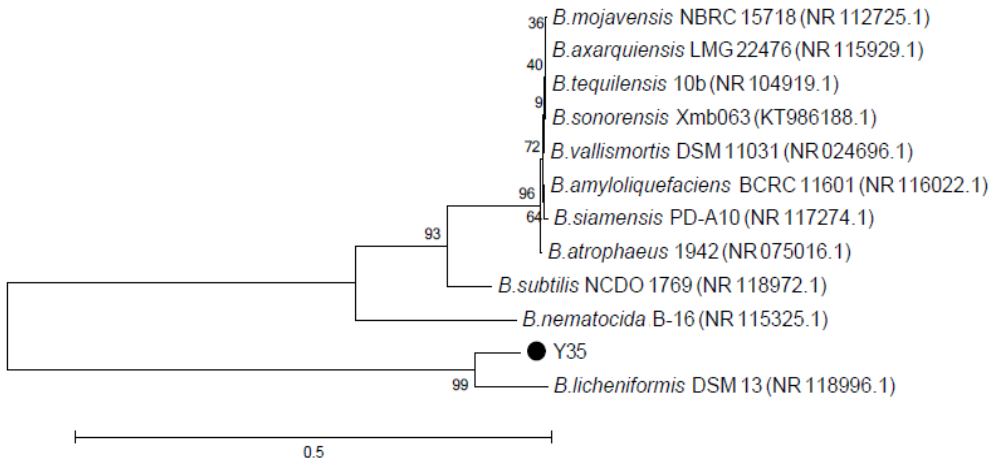
Şekil 3.19. Y12 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait filogenetik ağacı



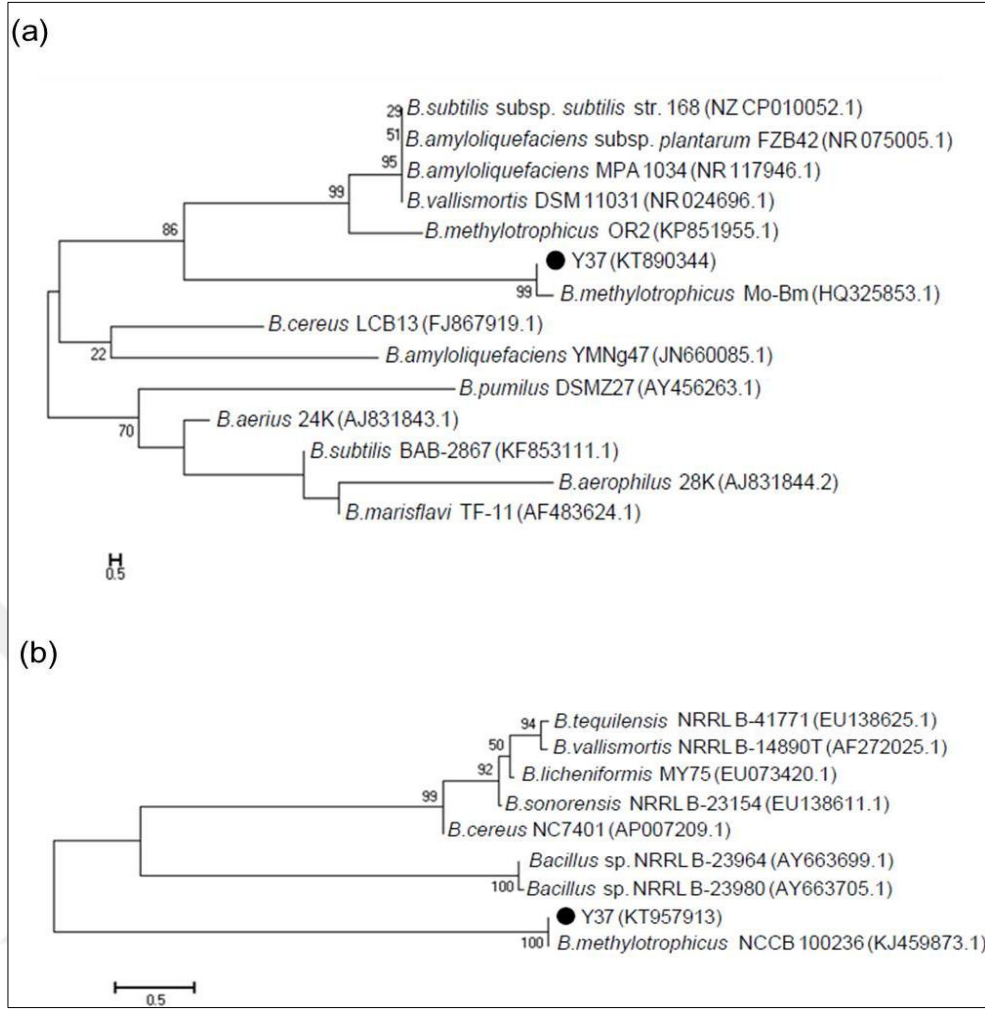
Şekil 3.20. Y13 izolatının 16S rRNA (a) ve kısmi gyrA (b) gen bölgelerine ait filogenetik ağaçları



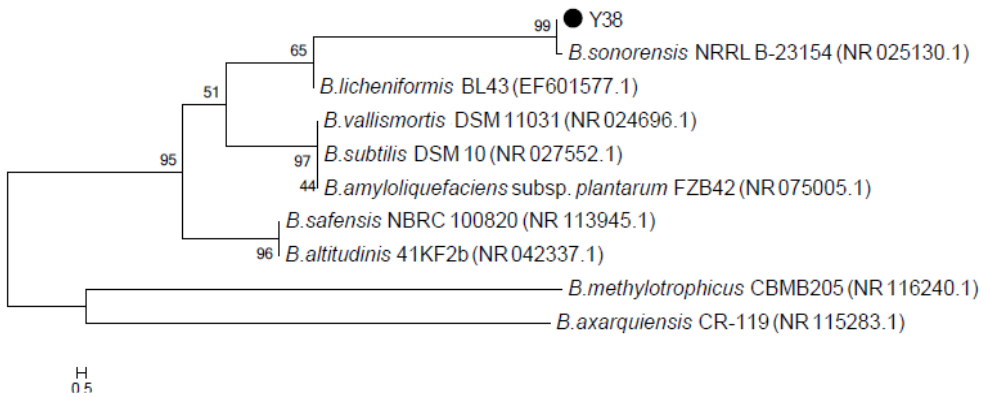
Şekil 3.21. Y15 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait filogenetik ağacı



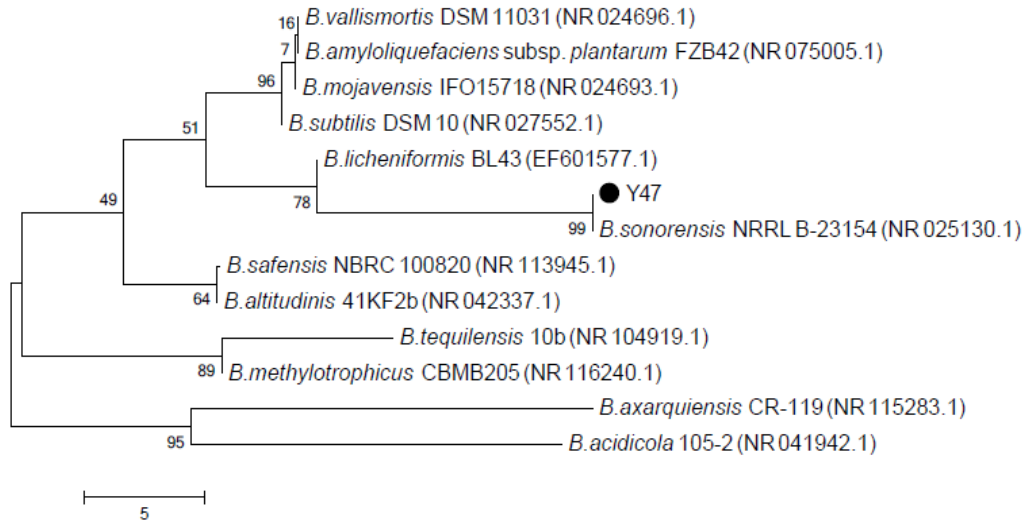
Şekil 3.22. Y35 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait filogenetik ağacı



Şekil 3.23. Y37 izolatının 16S rRNA (a) ve kısmi gyrA (b) gen bölgelerine ait filogenetik ağaçları (Duman ve diğ., 2016)



Şekil 3.24. Y38 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait filogenetik ağacı



Şekil 3.25. Y47 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait filogenetik ağacı

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, topraktan izole edilen 45 izolatın morfolojik, moleküler ve biyokimyasal analizleri sonucunda 20 tanesinin *Bacillus* cinsine ait olmadığı (16S rRNA BLAST ve VITEK-MS sonuçlarına göre) gözlenirken, geriye kalan 25 izolattan birbirine benzer olanlar aynı grup altında toplanarak her bir gruptan en az bir izolat seçilerek 9 farklı izolatta (Y1, Y7, Y12, Y13, Y15, Y35, Y37, Y38 ve Y47) tür tanımlamasına gidildi. 9 farklı izolata ait yapılan analizler ve değerlendirmeler aşağıda ayrıntılı olarak verildi.

Y1 izolatının 16S rRNA dizi sonuçları incelendiğinde (Ek-B); beş farklı *Bacillus* türüne %99'luk benzerlik gösterdiği tespit edildi. Bu türlerden hangisine yüksek oranda benzediğini bulmak üzere ilave moleküler ve biyokimyasal analizler gerçekleştirildi. Buna göre Y1 öncelikle VITEK-MS ile analiz edildi (Tablo 3.15) ve protein spektrumlarına göre karşılaştırma sonucu benzediği *Bacillus* tür sayısı ikiye indi. VITEK-MS sonucuna göre %33 oranında *B. cereus*, *B. mycooides* veya *B. thuringiensis* çıktı fakat Y1 izolatının koloni morfolojisi karakteristik bir koloni görünümüne sahip olan *B. mycooides*'e benzememektedir (URL-7). Ayrıca Y1 izolatına ait kısmi gyrB gen bölgesine ait BLAST analiz sonucu da bu izolatın iki türe benzediğini (%100 *B. cereus* ya da %99 *B. thuringiensis*) gösterdi (Ek-B). Y1 izolatının bu iki türden hangisi olduğunu belirlemek amacıyla *B. cereus* ve *B. thuringiensis*'in moleküler ayrımında kullanılan kısmi gyrB geninin Sau3AI ile kesilmesi sonucu oluşan fragman sayısına ve "cry" gen varlığına dayanan analizler uygulandı. Restriksiyon kesim analizine göre tanımlamak istenen izolat *B. thuringiensis* ise PZR ürününü (kısmi gyrB) tek yerden kesmesi beklenirken, *B. cereus* ise iki yerden kesmesi beklenmekteydi (Manzano ve diğ., 2003). Ayrıca *B. thuringiensis* ise "cry" geninin varlığını gösteren yaklaşık 1600-1700 bp uzunluğuna sahip bantla ayırt edilebilecekti (Chen ve Tsen, 2002). Restriksiyon kesim sonrası iki adet bant gözlenmesinin yanında cry gen varlığına işaret eden bandın bulunmaması bu izolatın *B. cereus* olabileceğini destekler niteliktedir. Moleküler analizlerin yanında *B. cereus* olduğunun doğrulanmasında oldukça basit bir yöntem olan MYP testi uygulandı. Buna göre *B. cereus* mannitolü kullanamadığından pembe renkli koloni oluşturması beklenirken, lesitinaz pozitif olması sebebiyle de koloni etrafında beyaz presipitasyon varlığı beklenmekteydi (Kalkan ve Halkman, 2006b).

Sonuçlar ise moleküler testleri doğrular niteliktedir. Ayrıca *B. cereus* olarak tanımlanan Y1 izolatına uygulanan farklı sıcaklık, pH ve NaCl'nin büyüme üzerine etki sonuçlarının (Tablo 3.14) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'in belirttiği biyokimyasal test sonuçları ile uyumlu olduğu tespit edildi (Logan ve diğ., 2009). Yapılan tüm morfolojik, moleküler ve biyokimyasal test sonuçları Y1 izolatının *B. cereus* olarak tanımlanmasını sağladı.

Y7 izolatı; 16S rRNA BLAST (Ek-B) ve VITEK-MS sonuçlarına (Tablo 3.15) göre %100-99 oranında *B. pumilus*'a benzemektedir. Büyüme sıcaklıklarının karşılaştırılması sonuçlarında Hindistan'ın kıyı çevresinden izole edilen *B. pumilus*'un sıcaklık potansiyelleri ile benzer olduğu görüldü (Parvathi ve diğ., 2009). Moleküler ve biyokimyasal sonuçlara göre Y7 izolatı *B. pumilus* olarak tanımlandı.

Y12 izolatı; 16S rRNA BLAST (Ek-B) ve VITEK-MS sonucuna (Tablo 3.15) göre %100-99,9 oranında *B. megaterium*'a benzerlik göstermektedir. Bu sonucu desteklemek adına yapılan biyokimyasal test bulgularına göre; Y12 izolatı; 30°C ve 45°C sıcaklıkta, pH 5-9 aralığında ve %3 (w/v) NaCl'de büyüme göstermektedir (Tablo 3.14). Literatürde daha önceden rapor edilen *B. megaterium* büyüme potansiyelleri ile karşılaştırıldığında *B. megaterium*'un pH 5,7 ila 7'de, %7 (w/v) NaCl'de büyüdüğü, büyüme sıcaklığının ise 3-20°C'den 35-45°C'e kadar olduğu bildirilmiştir (URL-8). Elde edilen bulgular literatür ile uyumlu olup Y12 izolatının *B. megaterium* olarak tanımlanmasını sağladı.

Y13 ve Y37 izolatlarının koloni morfolojilerinin birbirleriyle aynı özellikler taşıdıkları gözlemlendi (Tablo 3.1). 16S rRNA BLAST analiz sonuçlarına göre de; %100-99 oranında farklı *Bacillus* türlerine benzerlik gösterdikleri tespit edildi (Ek-B). Y13 ve Y37 izolatlarının tanımlanmasında 16S rRNA dizi analizi tek başına yeterli olmadığından dolayı korunmuş başka bir gen bölgesi olan kısmi *gyrA* gen bölgeleri çoğaltıldı ve dizi analiz sonuçlarına göre %99 oranında üç farklı *Bacillus* türüne (*B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*) benzerlik gösterdikleri tespit edildi (Ek-B). İzolatların VITEK-MS analizlerine göre ise %50 oranında *B. amyloliquefaciens*'e, %50 oranında ise *B. subtilis*'e benzerlik gösterdiği görüldü (Tablo 3.15). VITEK-MS sonuçlarında *B. methylotrophicus* çıkmamasının nedeni cihazın panelinde bu türün tanımlı olmamasından ileri gelmektedir. Diğer yandan yapılan biyokimyasal analizlerde Y13 ve Y37'nin indol oluşumu (+), metil kırmızısı testi (-), voges-proskauer testi (+), sitrat kullanımı (+), glukozdan asit üretimi (+), H₂S

oluşumu (-), jelatin (+) ve nişasta hidroliz (+) özelliklerinin referans suş olan *B. methylotrophicus* (DSM28326) ile uyumlu olması bu iki izolatın *B. methylotrophicus*'a büyük oranda benzediğine işaret etmektedir. Ayrıca; Y13 izolatının mannitol kullanımı ve lesitinaz aktivite sonuçları, Y13 ve Y37 (Duman ve diğ., 2016) izolatlarının ise sıcaklık, pH ve NaCl toleranslarının (Tablo 3.14) *B. methylotrophicus* (DSM28326) ile benzer olduğu tespit edildi. Morfolojik, moleküler ve biyokimyasal test sonuçları Y13 ve Y37 izolatlarının *B. methylotrophicus* olarak tanımlanmalarını destekledi.

Y15 izolatı; 16S rRNA BLAST analiz sonucuna göre %100 *B. subtilis*'e benzerlik göstermektedir (Ek-B). Y15'de yapılan biyokimyasal analiz sonuçlarının farklı kaynaklardan izole edilen *B. subtilis* örnekleri ile uyumlu olduğu görüldü. Örneğin, indol oluşumu (-), metil kırmızısı testi (-), voges-proskauer testi ve sitrat kullanımı (+), jelatin ve nişasta hidrolizi (+) bakımından *B. subtilis* F-2-01 ile benzerdir (Kubota ve diğ., 1993). Ayrıca Zheng ve diğ. (2008) tarafından yapılan çalışmada topraktan izole edilen nitril çözücü özellikte olan *B. subtilis* ZJB-063'ün Y15 izolatı gibi H₂S üretmediği ancak glukozdan asit oluşturduğu ve mannitolü kullandığı rapor edilmiştir. Topçal ve diğ. (2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, *B. subtilis* olarak tanımlanan izolatın Y15 gibi lesitinaz aktivitesinin olmadığı rapor edilmiştir. Aynı şekilde laktozdan asit üretim sonucunun *B. subtilis* NCDO 1769^T'de gözlenen laktozdan asit üretimi ile benzerlik gösterdiği (Huang ve diğ., 2005), farklı sıcaklık, pH ve NaCl toleranslarının da (Tablo 3.14) *B. subtilis* ile uyumlu olduğu sonucuna varıldı (URL-9). Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde Y15 izolatı *B. subtilis* olarak tanımlandı.

Y35 izolatı, 16S rRNA gen dizi (Ek-B) ve VITEK-MS (Tablo 3.15) analiz sonuçlarına göre %99 oranında *B. licheniformis*'e benzerlik göstermektedir. Biyokimyasal test sonuçları değerlendirildiğinde; jelatin hidroliz testi (-), büyüme gösterdiği pH (pH 5-9 aralığında) ve NaCl tolerans sonuçlarının (%12 (w/v) NaCl) *B. licheniformis* MTCC 429^T ile (Shivaji ve diğ., 2006) ve büyüme gösterdiği sıcaklık (Tablo 3.14) bakımından ise *B. licheniformis* NRRL NRS-1264^T ile uyumlu olduğu görüldü (Palmisano ve diğ., 2001). Ayrıca farklı besiyerlerinde (Tirozin agar ile pH 5,6 agar) büyütüldüğünde Şekil 3.15'te görüldüğü üzere her iki besiyerinde krem renkli kolonilerin oluşmasını desteklemesi ile *B. licheniformis* özelliklerini taşıdığı tespit edildi (Palmisano ve diğ., 2001). Moleküler ve biyokimyasal sonuçlara göre Y35 izolatı *B. licheniformis* olarak tanımlandı.

Y38 ve Y47 izolatlarının koloni morfolojilerinin birbirleriyle benzer özellikler taşıdıkları gözlemlendi (Tablo 3.1). 16S rRNA BLAST analiz sonuçlarına göre; %100-99 oranında *B. sonorensis* ve *B. licheniformis*'e benzerlik göstermektedirler (Ek-B). Y38 numaralı izolat, VITEK-MS (Tablo 3.15) analiz sonucuna göre %99 oranında *B. licheniformis*'e benzemektedir. Ancak bu doğru olmayabilir, çünkü cihazın panelinde *B. sonorensis* kayıtlı değildir. Bu nedenle ilave testler yapıldı. Y38 ve Y47 izolatları ile yapılan biyokimyasal testlere göre de jelatin hidroliz testi (+) ve NaCl tolerans sonuçlarının (%5 (w/v) NaCl) *B. licheniformis* MTCC 429^T ile uyumlu olmayıp, *B. sonorensis* DSM 13779^T ile uyumlu olduğu tespit edildi (Shivaji ve diğ., 2006). Ayrıca büyüme gösterdikleri sıcaklık (Tablo 3.14) ve tirozin agarda kahverengi, pH 5,6 agarda ise parlak sarı renkte koloniler şeklinde gelişmeleri (Şekil 3.15) bakımından *B. licheniformis* NRRL NRS-1264^T ile uyumlu olmayıp, Arizona, Sonoran çölündeki topraktan izole edilen *B. sonorensis* NRRL B-23154^T (DSM 13779^T) ile uyumlu sonuçlar verdikleri gözlemlendi (Palmisano ve diğ., 2001). Böylece Y38 ve Y47 numaralı izolatlar *B. sonorensis* olarak tanımlandı.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, öncelikle İzmit ve çevresindeki topraklardan *Bacillus* cinsi bakterilerin izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen saf kültürler Gram boyama ile boyandıktan sonra morfolojik olarak Gram pozitif, çubuk şekilli olan bakteriler deney materyali olarak seçildi ve her bir izolat Y1, Y2, Y3 şeklinde sırasıyla numaralandırıldı. Deney materyali olarak seçilen 45 izolatın stok kültürleri hazırlandıktan sonra koloni morfolojileri karşılaştırıldı ve benzer olanlar gruplandırıldı. Daha sonra, moleküler düzeyde tanımlanmaları amacıyla 16S rRNA gen dizi analizleri gerçekleştirildi. 16S rRNA gen dizi analizleri ile tanımlanamayan, yakın akraba olan türleri birbirinden ayırmak için ilave moleküler (kısmi *gyrB* gen bölgesinin *Sau3AI* enzimi ile muamele edilmesi, kısmi *gyrA* gen bölgesi dizi analizi, “*cry*” gen varlığı) ve biyokimyasal analizler yapıldı. Filogenetik analizler ise NJ (neighbour-joining) metodu ile gerçekleştirildi. Sonuç olarak morfolojik, moleküler, biyokimyasal ve filogenetik analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; toplam 45 izolattan 20 tanesinin *Bacillus* cinsine ait olmadığı gözlenirken, geriye kalan 25 izolattan birbirine benzer olanlar aynı grup altında toplanarak her bir gruptan en az bir izolat seçilerek 9 farklı izolatın [Y1; *B. cereus*, Y7; *B. pumilus*, Y12; *B. megaterium*; Y13 ve Y37 (Duman ve diğ., 2016); *B. methylotrophicus*, Y15; *B. subtilis*, Y35; *B. licheniformis*, Y38 ve Y47; *B. sonorensis*] tür düzeyinde tanımlanmaları yapıldı (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. Bakteriyel izolatların tür tayini sonuçları

İzolat Numarası	Tür
Y1	<i>Bacillus cereus</i>
Y7	<i>B. pumilus</i>
Y12	<i>B. megaterium</i>
Y13	<i>B. methylotrophicus</i>
Y15	<i>B. subtilis</i>
Y35	<i>B. licheniformis</i>
Y37	<i>B. methylotrophicus</i>
Y38	<i>B. sonorensis</i>
Y47	<i>B. sonorensis</i>

Morfolojik, moleküler ve biyokimyasal tanımlaması yapılan izolatların 16S rRNA, kısmi gyrA/gyrB gen bölgelerine ait dizileri (Ek-A) NCBI gen bankasına yüklenerek her biri için GenBank numarası alındı (Tablo 5.2).

Tablo 5.2. Tanımlanan izolatlara ait GenBank numaraları

İzolat Numarası	GenBank Numarası
Y1- 16S rRNA	KX549260
Y1-gyrB	KX592164
Y7- 16S rRNA	KX592605
Y12- 16S rRNA	KX592602
Y13-16S rRNA	KX588227
Y13-gyrA	KX592163
Y15-16S rRNA	KX592604
Y35-16S rRNA	KX592606
Y37-16S rRNA (Duman ve diğ., 2016)	KT890344
Y37-gyrA (Duman ve diğ., 2016)	KT957913
Y38-16S rRNA	KX592603
Y47-16Sr RNA	KX592601

Topraktan izole edilerek morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanmaları yapılan *Bacillus* türlerinden, endüstriyel biyoteknoloji alanına (özgün enzim, antibiyotik, toksin üretimi, ilaç ham maddelerinin sentezi vb.) yönelik çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

Albayrak G., Protein Sentezi ve Yıkımı, Editörler: Yıldırım A., Bardakçı F., Tanyolaç B., Karataş M., *Moleküler Biyoloji*, 1. basım, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 143-165, 2007.

Alfredo P., Javier R., Rafael P., Santiago C., Francisco J. S., Influence of pH on Heat Resistance of Spores of *Bacillus coagulans* in Buffer and Homogenized Foods, *International Journal of Food Microbiology*, 1999, **46**(3), 243-249.

Arda M., *Temel Mikrobiyoloji*, 2. basım, Medisan Yayınevi, Ankara, 2000.

Aronson A. I., Beckman W., Dunn P., *Bacillus thuringiensis* and Related Insect Pathogens, *Microbiol. Rev.*, 1986, **50**(1), 1-24.

Attallah A. G., EL-Shaer H. F. A., Abd-El-Aal S. K., 16S rRNA Characterization of a *Bacillus* Isolates From Egyptian Soil and its Plasmid Profile, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2014, **5**(4), 1590-1604.

Ayhan K., *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, 2. basım, Sim Matbaası, Ankara, 2000.

Berekaa M. M., Improved Exopolysaccharide Production by *Bacillus licheniformis* strain-QS5 and Application of Statistical Experimental Design, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2014, **3**(4), 876-886.

Berkeley R. C. W., Logan N., *Bacillus, Alicyclobacillus and Paenibacillus*, Editors: Emmerson A. M., Hawkey P. M., Gillespie S. H., *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, 2nd ed., Chichester, Wiley, 185, 1997.

Bodorova-Urgosikova J., Benada O., Tich P., Large-scale Isolation and Partial Characterization of Plasmid DNA from *B. larvae*, *Folia Microbiologica*, 1992, **37**(2), 82-86.

Burke W. F., Mc Donald K. O., Davidson E., Effects of UV Light on Spore Viability and Mosquito Larvicidal Activity of *Bacillus sphaericus* 1593, *Applied and Environmental Polymer Degredation*, 1983, **4**(2), 91-102.

Chang Y. H., Shangkuan Y. H., Lin H. C., Liu H. W., PCR Assay of the GroEL Gene for Detection and Differentiation of *Bacillus cereus* Group Cells, *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(8), 4502-4510.

Chattopadhyay A., Bhatnaga N. B., Bhatnagar R., Bacterial Insecticidal Toxins, *Critical Reviews in Microbiology*, 2004, **30**(1), 33-54

Chen M. L., Tsen H. Y., Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and gyrB Gene Based PCR Primers and Sequencing of Their Annealing Sites, *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **92**(5), 912-919.

Chilcott C. N., Wigley P. J., Isolation and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* from Soil and Insect Habitats in New Zealand, *Journal of Invertebrate Pathology*, 1993, **61**(3), 244-247.

Demeli M., Fındık ve Tahıl Ambarlarından *Bacillus* İzolasyonu, Karakterizasyonu ve İzolatların İnsektisidal Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2012, 315554.

Duman Y., Yüzügüllü Karakuş Y., Sertel A., Polat F., Production, Purification and Characterization of a Thermo-alkali Stable and Metal-tolerant Carboxymethylcellulase from Newly Isolated *Bacillus methylotrophicus* Y37, *Turkish Journal of Chemistry*, 2016, **40**(5), 802-815.

Errington J., Regulation of Endospore Formation in *Bacillus subtilis*, *Nature Reviews Microbiology*, 2003, **1**(2), 117-127.

Çetinkaya E., Ayhan K., Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler, *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2012, **2**(1), 53-62.

Gonzales J. M., Carlton B. C., Patterns of Plasmid DNA in Crystalliferous and AcrySTALLIFEROUS Strains of *Bacillus thuringiensis*, *Plasmid*, 1980, **3**(1), 92-98.

Gordon R. E., Haynes W. C., Pang C. H. N., *The Genus Bacillus*, D.C. United States Department of Agriculture, Washington, 1973.

GuoHui Y., ChunYan N., YuanFeng C., YanHong C., ZiHong Y., Use of 16S rDNA, *gyrA* and *gyrB* Gene Sequence to Identify a Biocontrol *Bacillus* sp. Strain R31, *Chinese Journal of Biological Control*, 2010, **26**(2), 160-166.

Haddar A., Sellami-Kamoun A., Fakhfakh-Zouari N., Hmidet N., Nasri M., Characterization of Detergent Stable and Feather Degrading Serine Proteases from *Bacillus mojavensis* A21, *Biochemical Engineering Journal*, 2010, **51**(1-2) 53–63.

Helgason E., Okstad O. A., Caugant D. A., Johansen H. A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolstø A. B., *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* One Species on the Basis of Genetic Evidence, *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(6), 2627-2630.

Huang X. W., Niu Q. H., Zhou W., Zhang K. Q., *Bacillus nematocida* sp. nov., A Novel Bacterial Strain with Nematotoxic Activity Isolated From Soil in Yunnan, China, *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, **28**(4), 323-327.

Joung K. B., Cote J. C., A Phylogenetic Analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars by RFLP-Based Ribotyping, *Journal of Applied Microbiology*, 2001, **91**(2), 279-289.

Kalaylı E., Beyatlı Y., *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA'ları, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2003, **1**(12), 24-35.

Kalkan S., Halkman K., *Bacillus cereus* ve İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2006a, **4**(1), 1-11.

Kalkan S., Halkman K., *Bacillus cereus*'un Standart Analiz Yöntemi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2006b, **4**(3), 31-36.

Kaynar P., Beyatlı Y., Balıklardan İzole Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2006, **4**(3), 1-30.

Keay L., Mosley M. H., Anderson R. G., O'connor R. J., Wildi B. S., Production and Isolation of Microbiological Proteases, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 1972, **3**, 63-92.

Kim H. S., Lee D. W., Woo S. D., Yu M. Y., Kang K. S., Distribution, Serological Identification, and PCR Analysis *Bacillus thuringiensis* Isolated From soils of Korea, *Current Microbiology*, 1998, **37**(3), 195-200.

Koneman E. W., *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Washington, 2006.

Kubota H., Matsunobu T., Uotani K., Takebe H., Satoh A., Tanaka T., Taniguchi M., Production of Poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1993, **57**(7), 1212-1213.

Kuo W. S., Chak K. F., Identification of Novel cry-type Genes from *Bacillus thuringiensis* Strains on the Basis of Restriction Fragment Length Polymorphism of the PCR-Amplified DNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(4), 1369-1377.

Li Q., Xu L. Z., Zou T., Ai P., Huang G. H., Li P., Zheng A. P., Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* strain HD521, *Stand Genomic Sci.*, 2015, **10**(1), 1-8.

Lin S., Identification of Contamination Sources of *B. cereus* in Pasteurized Milk, A Thesis Presented to Faculty of Graduate Studies of University of Guelph, 1997, 109.

Logan N. A., De Vos P., Genus *Bacillus*, Editors: De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Frieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Springer Dordrecht Heidelberg London, New York, 21-128, 2009.

Manzano M., Cocolin L., Cantoni C., Comi G., *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* Differentiation Using a PCR-RE Technique, *International Journal of Food Microbiology*, 2003, **81**(3), 249-254.

Massle J., Roberts G., White P. J., Selective Isolation of *Bacillus sphaericus* from Soil by Use of Acetate as The Only Major Source of Carbon, *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, **49**(6), 1478-1481.

Özdoğan H., Çesitli Et Örneklerinden İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması, Proteolitik ve Lipolitik Enzim Aktivitelerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007, 212717.

Öztürk F., Ankara'daki Topraklardan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması, Moleküler Düzeyde Tiplendirilmesi ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007, 200967.

Palmisano M., Nakamura L., Duncan K., Istock C., Cohan F., *Bacillus sonorensis* sp. nov., A Close Relative of *Bacillus licheniformis*, Isolated from Soil in The Sonoran Desert, Arizona, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, **51**(5), 1671-1679.

Parvathi A., Krishna K., Jose J., Joseph N., Nair S., Biochemical and Molecular Characterization of *Bacillus pumilus* Isolated from Coastal Environment in Cochin, India, *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009, **40**(2), 269-275.

Rosovitz M. J., Voskuil M. I., Chambliss G. H., *Bacillus*, Systematic Bacteriology, Editors: Collier L., Balows A., Susman M., *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed., Oxford University Press, New York, 5-730, 1998.

Sacchi C. T., Whitney A. M., Mayer L. W., Morey R., Steigerwalt A., Boras A., Weyant R. S., Popovic T., Sequencing of 16S rRNA Gene: A rapid Tool for Identification of *Bacillus anthracis*, *Emerging Infectious Diseases*, 2002, **8**(10), 1117-1123.

Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P. E., Rolain J. M., Raoult D., Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by MALDI-TOF MS, *Clin. Infect. Dis.*, 2009, **49**(4), 543-551.

Shivaji S., Chaturvedi P., Suresh K., Reddy G. S. N., Dutt C. B. S., Wainwright M., Narlikar J. V., Bhargava P. M., *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., Isolated from Cryogenic Tubes Used for Collecting Air Samples from High Altitudes, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, **56**(7), 1465-1473.

Singh S., Moholkar V. S., Goyal A., Isolation, Identification and Characterization of a Cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* Strain SS35 from Rhinoceros Dung, *ISRN Microbiology*, DOI: 10.1155/2013/728134.

Sneath P. H. A., Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci, Editors: Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1104-1139, 1986.

Soyuçok A., Ekiz T., Başyigit K. G., Ekzopolisakkaritlerin Özellikleri ve Gıda Sanayindeki Önemi, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD*, DOI: 10.17100/nevbiltek.48986.

Starostin K. V., Demidov E. A., Bryanskaya A. V., Efimov V. M., Rozanov A. S., Peltek S. E., Identification of *Bacillus* strains by MALDI-TOF MS Using Geometric Approach, *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep16989.

Takeno A., Okamoto A., Tori K., Oshima K., Hirakawa H., Toh H., Agata N., Yamada K., Ogasawara N., Hayashi T., Shimizu T., Kuhara S., Hattori M., Ohta M., Complete Genome Sequence of *Bacillus cereus* NC7401, Which Produces High Levels of the Emetic Toxin Cereulide, *Journal of Bacteriology*, 2012, **194**(17), 4767-4768.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S., MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(12), 2725-2729.

Tanaka T., Kuroda M., Sakaguchi K., Isolation and Characterization of Four Plasmids from *Bacillus subtilis*, *Journal of Bacteriology*, 1977, **129**(3), 1487-1494.

Tatlıpınar A., İncir Bitkisinden *Bacillus thuringiensis* İzolasyonu ve Kristal Gen Profillerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla, 2010, 275896.

Temiz A., *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*, 4. basım, Hatipoğlu Yayıncılık, Ankara, 2008.

Tetik Z., Tabanidae (Insecta: Diptera) Türlerinin Sindirim Sistemlerinden Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2007, 212983.

Tony B. D., Goyal D., Khanna S., Decolorization of Direct Red 28 by Mixed Bacterial Culture in An Up-Flow Immobilized Bioreactor, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, **36**(7), 955-960.

Topçal F., Dığrak M., Gündođan R., Toprakdan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması ve Bakteriosin Üretimlerinin Belirlenmesi, *Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2014, **4**(2), 57-67.

Tourasse N. J., Helgason E., Okstad O. A., Hegna I. K., Kolsto A. B., The *Bacillus cereus* Group: Novel Aspects of Population Structure and Genome Dynamics, *Journal of Applied Microbiology*, 2006, **101**(3), 579-593.

URL-1: http://textbookofbacteriology.net/Bacillus_2.html, (Ziyaret tarihi: 16 Ekim 2016).

URL-2: <http://www.bbc.co.uk/education/guides/z36mmp3/revision/2>, (Ziyaret tarihi: 17 Ekim 2016).

URL-3: <http://slideplayer.biz.tr/slide/11004468/>, (Ziyaret tarihi: 20 Ekim 2016).

URL-4: <http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/test-prosedurleri/UMS-B-TP-11-KIA-TSI.pdf>, (Ziyaret tarihi: 15 Şubat 2016).

URL-5: http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Biyokimyasal%20T%20estler.pdf, (Ziyaret tarihi: 21 Şubat 2016).

URL-6: <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF611FCE38FE57A3E2>, (Ziyaret tarihi: 01 Mart 2016).

URL-7: <http://newatlas.com/smartphone-bacteria-growth/26331/#gallery>, (Ziyaret tarihi: 11 Aralık 2016).

URL-8: <http://www.tgw1916.net/Bacillus/megaterium.html>, (Ziyaret tarihi: 11 Ağustos 2016).

URL-9: <http://www.tgw1916.net/Bacillus/subtilis.html>, (Ziyaret tarihi: 11 Ağustos 2016).

Ustaçelebi Ş., *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.

- Wang L. T., Lee F. L., Tai C. J., Kasai H., Comparison of *gyrB* Gene Sequences, 16S rRNA Gene Sequences and DNA–DNA Hybridization in The *Bacillus subtilis* Group, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, **57**(8), 1846-1850.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J., 16S ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study, *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**(2), 697-703.
- Wipat A., Harwood C. R., The *Bacillus subtilis* Genome Sequence: The Molecular Blueprint of a Soil Bacterium, *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, **28**, 1-9.
- Woese C. R., Gutell R., Gupta R., Noller H. R., Detailed Analysis of The Higher-Order Structure of 16S-like Ribosomal Ribonucleic Acids, *Microbiol. Rev.*, 1983, **47**(4), 621-669.
- Woodford N., Johnson A. P., *Molecular Bacteriology*, Humana Pres, New Jersey, 68-71, 1998.
- Yedidağ F., Farklı Habitatlardan Elde Edilen Endospor Oluşturan Basillerin Antikandidal Aktivitelerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Dumlupınar, 2011, 292563.
- Yılmaz M., Topraktan İzole Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plasmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2003, 133461.
- Yoshimura K., Yamamoto O., Seki T., Oshima Y., Distribution of Heterogenous and Homologous Plasmids in *Bacillus* spp., *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, **46**(6), 1268-1275.
- Young C. S., Lethbridge G., Shaw L. J., Burns R. G., Survival of Inoculated *Bacillus cereus* Spores and Vegetative Cells in Nonplanted and Rhizosphere Soil, *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, **27**(8), 1017-1026.
- Yuzugullu Y., Trinh C. H., Smith M. A., Pearson A. R., Phillips S. E. V., Sutay Kocabas D., Bakir U., Ogel Z. B., McPherson M. J., Structure, Recombinant Expression and Mutagenesis Studies of the Catalase with Oxidase Activity from *S. thermophilum*, *Acta Crystallographica Section D*, 2013, **69**(3), 398-408.
- Zengin M., *Scytalidium thermophilum* Katalaz-fenol Oksidaz Enzimi Ana Kanal Yapısının Katalitik Aktivitedeki Rolünün Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2016, 436221.
- Zheng L. P., Zou T., Ma Y. J., Wang J. W., Zhang Y. Q., Antioxidant and DNA Damage Protecting Activity of Exopolysaccharides from the Endophytic Bacterium *Bacillus cereus* SZ1, *Molecules*, 2016, **21**(2), 174.
- Zheng Y. G., Chen J., Liu Z. Q., Wu M. H., Xing L. Y., Shen Y. C., Isolation, Identification and Characterization of *Bacillus subtilis* ZJB-063, A Versatile Nitrile-Converting Bacterium, *Applied Microbiology Biotechnology*, 2008, **77**(5), 985-993.



EK-A

Projede tanımlanan 9 farklı izolata ait kısmi 16S rRNA, gyrA ve gyrB gen dizileri

Y1 Numaralı İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Dizilimi:

Baz Sayısı: 990

Gen Bankası No: KX549260

```
TCCTAAACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAG
CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAAC
TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAA
TTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAACACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGC
TAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT
TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACG
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGA
AAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGC
TAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTC
CGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTATTTTCAAGCAACGCGAAGAACCCTTA
CCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTT
```

Y1 Numaralı İzolatın gyrB Geninin Baz Dizilimi

Baz Sayısı: 288

Gen Bankası No: KX592164

```
ACAGAATTAGAAGTATTTGTACATCGTGAAGGTAAAATCCATTACCAAAAATATG
AAAGAGGTATTCCGGTTGCGGATTTAAAAGTCATTGGTGACACAGATCAAACAG
GAACAATAACTCGATTTAAACCAGATCCGGAAATTTCCAAGAAACAACAGTAT
ACGATTTTGATACGCTAGCAACTCGTATGCGTGAATTAGCGTTTTTAAATCGTAA
TATTAATAACAATTGAAGATAAACGTGAACATAAGCAAAGAAAGAATTCCAT
TACGAAGGTGGAATT
```

EK-A (Devam)

Y7 Numaralı İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Dizilimi

Baz Sayısı: 1244

Gen Bankası No: KX592605

```
GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCG
GATAGTTCCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCAC
TTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA
CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAA
AGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACG
GTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAA
CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTG
TAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCT
TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACC
CTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT
TGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
CTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTA
GCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGC
GTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
```

EK-A (Devam)

Y12 Numaralı İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Dizilimi

Baz Sayısı: 1246

Gen Bankası No: KX592602

```
GTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATAC
CGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCA
CTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG
ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGT
AAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGAC
GGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGG
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGGCTTTTTTGGTCTG
TAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTT
TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACT
CTAGAGATAGAGCGTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGT
TGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGG
TCAAGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCC
TACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGA
```

Y13 Numaralı İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Dizilimi

Baz Sayısı: 1037

Gen Bankası No: KX588227

```
GTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGA
GTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG
GCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTT
CGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
GGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTT
TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGC
GGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG
GCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCCGGG
GAGGGTCATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTC
CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGG
CGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAG
GGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTT
GACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGAGTGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG
```

EK-A (Devam)

Y13 Numaralı İzolatın gyrA Geninin Baz Dizilimi

Baz Sayısı: 852

Gen Bankası No: KX592163

CACAGGCGGATTCTGTACGCAATGAATGATTTAGGCATGACCAAGTGACAAACC
ATATAAAAAATCTGCCCGTATCGTCGGTGAAGTTATCGGTAAGTACCACCCGCA
CGGTGACTCAGCGGTTTACGAATCAATGGTCAGAATGGCGCAGGATTTTAACT
ACCGCTACATGCTTGTGACGGACACGGCAACTTCGGTTTCGGTTGACGGCGAC
TCAGCGGCCCGCATGCGTTACACAGAAGCGAGAATGTCAAAAATTGCAATGGA
AATCCTCCGGGACATTACGAAAGATACGATTGATTATCAAGATAACTATGACGG
CGCAGAAAGAGAACCTGTCTCATGCCTTCGAGATTTCCGAATCTGCTCGTAA
ACGGAGCTGCCGGTATTGCGGTCGGAATGGCGACAAATATCCTCCGCATCAG
CTTGGGGAAGTCATTGAAGGCGTGCTTCCCGTAAGCGAGAATCCTGAAATTAC
AAACCAGGAGCTGATGGAGTACATCCCGGGCCCGGATTTTCCGACTGCAGGT
CAGATTTTGGGCCGGAGCGGCATCCGCAAGGCATATGAATCCGGACGGGGAT
CCATTACGATCCGGGCTAAGGCTGAAATCGAAGAGACATCATCGGGAAAAGAA
AGAATTATTGTCACAGAACTTCTTATCAGGTGAACAAAGCGAGATTAATTGAA
AAAATCGCAGATCTTGTCCGGGACAAAAAATCGAAAGAATTACCGATCTGCGT
GACGAATCCGACCGTAACGGAATGAGAATCGTCATTGAGATCCGCCGTGACGC
CCATGCTCACGTCATTTTGAATAACCTGTACAAACAAACGGCCCTGCAGACGTC
T

Y15 Numaralı İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Dizilimi

Baz Sayısı: 988

Gen Bankası No: KX592604

TGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTG
GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGAAG
GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAG
GGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGG
GGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATT
CCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAG
GCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTA
GGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT
TGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGG

EK-A (Devam)

Y35 Numaralı İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Dizilimi

Baz Sayısı: 1031

Gen Bankası No: KX592606

AGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGGCGGACGGGT
GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGC
TTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
TTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCTGAATAGG
GCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
GCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGG
AGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCA
CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCG
ACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAAGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAG
GGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGTCGCAAGACTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAGAAGTACCAGGTCTTGACATCTCT
GACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTCGGGGCAGAGTGACAGTGGTGCATT
GATGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGT

Y37 Numaralı İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Dizilimi

Baz Sayısı: 1312

Gen Bankası No: KT890344

TAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATA
AAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGT
TCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGC
TCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGA
GTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTA
AGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACC
AGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCA
GAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGC
ACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAATGGTGGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAA
CAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGT
TCGGATCGCAGTCTGCACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC

EK-A (Devam)

Y37 Numaralı İzolatın gyrA Geninin Baz Dizilimi

Baz Sayısı: 914

Gen Bankası No: KT957913

```
CCGTGACGGTCTGAAGCCGGTTCACAGGCGGATTTTGTACGCAATGAATGATT
TAGGCATGACCAGTGACAAACCATATAAAAAATCTGCCCGTATCGTCGGTGAA
GTTATCGGTAAGTACCACCCGCACGGTGACTCAGCGGTTTACGAATCAATGGT
CAGAATGGCGCAGGATTTTAACTACCGCTACATGCTTGTTGACGGACACGGCA
ACTTCGGTTCGGTTGACGGCGACTCAGCGGCCGCGATGCGTTACACAGAAGC
GAGAATGTCAAAAATCGCAATGGAAATCCTCCGGGACATTACGAAAGATACGAT
TGATTATCAAGATAACTATGACGGCGCAGAAAGAGAACCCTGTGTCATGCCTTC
GAGATTTCCGAATCTGCTCGTAAACGGAGCTGCCGGTATTGCGGTCCGAATGG
CGACAAATATTCTCCGCATCAGCTTGGGGAAGTCATTGAAGGCGTGCTTGCC
GTAAGTGAGAATCCTGAGATTACAAACCAGGAGCTGATGGAATACATCCCGGG
CCCGGATTTTCCGACTGCAGGTCCAGATTTTGGGCCGGAGCGGCATCCGCAAG
GCATATGAATCCGGACGGGGATCCATTACGATCCGGGGCTAAGGCTGAAATCGA
AGAGACATCATCGGGAAAAGAAAGAAATTATTGTCACAGAACTTCTTATCAGGT
GAACAAAGCGAGATTAATTGAAAAAATCGCAGATCTTGTCCGGGACAAAAAAT
CGAAGGAATTACCGATCTGCGTGACGAATCCGACCGTAACGGAATGAGAATCG
TCATTGAGATCCGCCGTGACGCCAATGCTCACGTCATTTTGAATAACCTGTACA
AACAAACGGCCCTGCAGACGTCTTTCGGAATCAATCTGCTGGCGCTCGTTGAC
GGACAGCCGA
```

Y38 Numaralı İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Dizilimi

Baz Sayısı: 1057

Gen Bankası No: KX592603

```
ATACATGCAAGTCGAGCGAACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTTAGCGGC
GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
GAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAA
AAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTT
CGAACAGGGCGGTGCCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGC
TCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGA
GTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA
AGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCAAGCAACGCGAAGAACCCTTAC
CAAGTCTTGACATCCTCTGACACCCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGC
AGAGTGACAGTGGTTGCATGGTTGTTGTCAGCTTCGTGTCGTGAGATGTTGG
GTTAAGT
```

EK-A (Devam)

Y47 Numaralı İzolatın 16S rRNA Geninin Baz Dizilimi

Baz Sayısı: 1062

Gen Bankası No: KX592601

```
CATGCAAGTCGAGCGAACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGA
AACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAG
GTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT
GAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCA
ACAGGGCGGTGCCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC
GTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAA
CCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG
AATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAG
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
GTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCC
TGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
TCTTGACATCCTCTGACACCCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAG
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAG
```


EK-B

Tüm izolatların BLAST analiz sonuçları

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rrnA) gene, complete sequence	1797	1797	99%	0.0	99%	NR_074540.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain JCM 2152 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1797	1797	99%	0.0	99%	NR_113266.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain CCM 2010 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1797	1797	99%	0.0	99%	NR_115714.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain NRRC 15305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1797	1797	99%	0.0	99%	NR_112630.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain ATCC 14579 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1797	1797	99%	0.0	99%	NR_114582.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain IAM 12605 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1797	1797	99%	0.0	99%	NR_115526.1
<input type="checkbox"/> Bacillus anthracis str. Ames strain Ames 16S ribosomal RNA, complete sequence	1792	1792	99%	0.0	99%	NR_074453.1
<input type="checkbox"/> Bacillus toyonensis strain BCT-7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1775	1775	99%	0.0	99%	NR_121761.1
<input type="checkbox"/> Bacillus pseudomycoides strain NRRC 101232 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	99%	0.0	99%	NR_113991.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	99%	0.0	99%	NR_114581.1

Şekil B.1. Y1 (16S rRNA-990 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain FORC_005, complete genome	532	532	100%	4e-147	100%	NZ_CP009686.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus m1550 chromosome, whole genome shotgun sequence	532	532	100%	4e-147	100%	NZ_CM000722.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain YC-10, complete genome	527	527	100%	2e-145	99%	NZ_CP011349.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD_1, complete genome	527	527	100%	2e-145	99%	NZ_CP010005.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar galleriae strain HD-29, complete genome	527	527	100%	2e-145	99%	NZ_CP010089.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. HD-1, complete genome	527	1054	100%	2e-145	99%	NZ_CP004870.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520, complete genome	527	527	100%	2e-145	99%	NZ_CP004858.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520, complete genome	527	527	100%	2e-145	99%	NZ_CP007607.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus VD133 genomic scaffold acaTw-supercont1_2, whole genome shotgun sequence	527	527	100%	2e-145	99%	NZ_KB976184.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. HD73, complete genome	527	527	100%	2e-145	99%	NC_020238.1

Şekil B.2. Y1 (gyrB-288 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Acinetobacter calcoaceticus strain ATCC 23055 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	534	534	71%	3e-151	78%	NR_117619.1
<input type="checkbox"/> Acinetobacter calcoaceticus strain JCM 6842 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	534	534	71%	3e-151	78%	NR_113343.1
<input type="checkbox"/> Acinetobacter calcoaceticus strain ATCC 23055 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	534	534	71%	3e-151	78%	NR_114958.1
<input type="checkbox"/> Acinetobacter calcoaceticus strain CIP 81.8 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	534	534	71%	3e-151	78%	NR_114922.1
<input type="checkbox"/> Acinetobacter calcoaceticus strain LMG 1046 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	534	534	71%	3e-151	78%	NR_114921.1
<input type="checkbox"/> Acinetobacter calcoaceticus strain DSM 30006 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	534	534	71%	3e-151	78%	NR_119113.1
<input type="checkbox"/> Acinetobacter calcoaceticus PHEA-2 strain PHEA-2 16S ribosomal RNA, complete sequence	532	532	71%	1e-150	78%	NR_102826.1
<input type="checkbox"/> Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	532	532	68%	1e-150	79%	NR_102814.1
<input type="checkbox"/> Acinetobacter temborogae strain DSM 14971 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	532	532	69%	1e-150	78%	NR_117629.1
<input type="checkbox"/> Acinetobacter pittii strain ATCC 19004 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	532	532	68%	1e-150	79%	NR_117621.1

Şekil B.3. Y2 (16S rRNA-1227 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. DET2TS4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	412	412	60%	6e-111	78%	GU122951.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate: S-9	375	375	45%	7e-100	80%	AB331854.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. SQ-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	342	342	39%	7e-90	80%	KF453960.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain TS242 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	339	339	40%	1e-88	80%	KF525344.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Bacillus sp. clone FAC168 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	333	333	49%	4e-87	78%	JN092833.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. S3-R6TC-BA1 clone 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	313	313	59%	6e-81	76%	GU325802.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. th9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	303	303	45%	3e-78	77%	EU814517.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain KUDC1021 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	300	300	45%	5e-77	77%	FJ944647.1
<input type="checkbox"/> Bacillus anthracis strain AIMST 11 Dz 14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	294	294	30%	2e-75	82%	HQ670485.1
<input type="checkbox"/> Streptomyces clavuligerus strain MML2001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	291	291	59%	3e-74	75%	KF542656.1

Şekil B.4. Y3 (16S rRNA-1211 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

EK-B (Devam)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Acinetobacter pittii strain ATCC 19004 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1349	1349	100%	0.0	100%	NR_117621.1
Acinetobacter pittii strain LMG 1035 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1349	1349	100%	0.0	100%	NR_117930.1
Acinetobacter pittii strain CIP 70.29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1349	1349	100%	0.0	100%	NR_116774.1
Acinetobacter calcoaceticus strain NCCB 22016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1349	1349	100%	0.0	100%	NR_042387.1
Acinetobacter calcoaceticus PHEA-2 strain PHEA-2 16S ribosomal RNA, complete sequence	1343	1343	100%	0.0	99%	NR_102826.1
Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1343	1343	100%	0.0	99%	NR_102814.1
Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1343	1343	100%	0.0	99%	NR_116039.1
Acinetobacter nosocomialis strain RUH 2376 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1332	1332	100%	0.0	99%	NR_117931.1
Acinetobacter calcoaceticus strain ATCC 23055 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1327	1327	100%	0.0	99%	NR_117619.1
Acinetobacter calcoaceticus strain JCM 6842 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1327	1327	100%	0.0	99%	NR_113343.1

Şekil B.5. Y4 (16S rRNA-730 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus toyonensis strain BCT-7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1860	1860	100%	0.0	100%	NR_121761.1
Bacillus thuringiensis Bt407 16S ribosomal RNA, complete sequence	1860	1860	100%	0.0	100%	NR_102506.1
Bacillus cereus ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rrnA) gene, complete sequence	1860	1860	100%	0.0	100%	NR_074540.1
Bacillus cereus strain JCM 2152 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1860	1860	100%	0.0	100%	NR_113266.1
Bacillus thuringiensis strain NBRC 101235 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1860	1860	100%	0.0	100%	NR_112780.1
Bacillus cereus strain CCM 2010 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1860	1860	100%	0.0	100%	NR_115714.1
Bacillus cereus strain NBRC 15305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1860	1860	100%	0.0	100%	NR_112630.1
Bacillus cereus strain ATCC 14579 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1860	1860	100%	0.0	100%	NR_114582.1
Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1860	1860	100%	0.0	100%	NR_114581.1
Bacillus thuringiensis strain IAM 12077 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1860	1860	100%	0.0	100%	NR_043403.1

Şekil B.6. Y5 (16S rRNA-1007 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus toyonensis strain BCT-7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2187	2187	100%	0.0	99%	NR_121761.1
Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2187	2187	100%	0.0	99%	NR_114581.1
Bacillus thuringiensis strain IAM 12077 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2187	2187	100%	0.0	99%	NR_043403.1
Bacillus thuringiensis strain NBRC 101235 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2183	2183	100%	0.0	99%	NR_112780.1
Bacillus thuringiensis Bt407 16S ribosomal RNA, complete sequence	2182	2182	100%	0.0	99%	NR_102506.1
Bacillus anthracis str. Ames strain Ames 16S ribosomal RNA, complete sequence	2182	2182	100%	0.0	99%	NR_074453.1
Bacillus cereus ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rrnA) gene, complete sequence	2182	2182	100%	0.0	99%	NR_074540.1
Bacillus cereus strain JCM 2152 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2182	2182	100%	0.0	99%	NR_113266.1
Bacillus cereus strain CCM 2010 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2182	2182	100%	0.0	99%	NR_115714.1
Bacillus cereus strain NBRC 15305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2182	2182	100%	0.0	99%	NR_112630.1

Şekil B.7. Y6 (16S rRNA-1229 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus pumilus SAFR-032 strain SAFR-032 16S ribosomal RNA, complete sequence	2298	2298	100%	0.0	100%	NR_074977.1
Bacillus pumilus strain NBRC 12092 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2298	2298	100%	0.0	100%	NR_112637.1
Bacillus pumilus strain ATCC 7061 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2298	2298	100%	0.0	100%	NR_043242.1
Bacillus safensis strain NBRC 100820 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2287	2287	100%	0.0	99%	NR_113945.1
Bacillus safensis strain FO-36b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2287	2287	100%	0.0	99%	NR_041794.1
Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2270	2270	100%	0.0	99%	NR_118441.1
Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2265	2265	100%	0.0	99%	NR_118439.1
Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2265	2265	100%	0.0	99%	NR_042336.1
Bacillus altitudinis strain 41KF2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2265	2265	100%	0.0	99%	NR_042337.1
Bacillus pumilus strain SBMP2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2248	2248	100%	0.0	99%	NR_118381.1

Şekil B.8. Y7 (16S rRNA-1244 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

EK-B (Devam)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus cereus ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rRNA) gene, complete sequence	2374	2374	100%	0.0	100%	NR_074540.1
Bacillus cereus strain JCM 2152 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2374	2374	100%	0.0	100%	NR_113266.1
Bacillus cereus strain CCM 2010 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2374	2374	100%	0.0	100%	NR_115714.1
Bacillus cereus strain NBRC 15305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2374	2374	100%	0.0	100%	NR_112630.1
Bacillus cereus strain ATCC 14579 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2374	2374	100%	0.0	100%	NR_114582.1
Bacillus cereus strain IAM 12605 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2374	2374	100%	0.0	100%	NR_115526.1
Bacillus toyonensis strain BCT-7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2368	2368	100%	0.0	99%	NR_121761.1
Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2368	2368	100%	0.0	99%	NR_114581.1
Bacillus thuringiensis strain IAM 12077 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2368	2368	100%	0.0	99%	NR_043403.1
Bacillus thuringiensis strain NBRC 101235 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2364	2364	100%	0.0	99%	NR_112780.1

Şekil B.9. Y8 (16S rRNA-1285 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus cereus ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rRNA) gene, complete sequence	1784	1784	100%	0.0	99%	NR_074540.1
Bacillus cereus strain JCM 2152 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1784	1784	100%	0.0	99%	NR_113266.1
Bacillus cereus strain CCM 2010 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1784	1784	100%	0.0	99%	NR_115714.1
Bacillus cereus strain NBRC 15305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1784	1784	100%	0.0	99%	NR_112630.1
Bacillus cereus strain ATCC 14579 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1784	1784	100%	0.0	99%	NR_114582.1
Bacillus cereus strain IAM 12605 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1784	1784	100%	0.0	99%	NR_115526.1
Bacillus anthracis str. Ames strain Ames 16S ribosomal RNA, complete sequence	1779	1779	100%	0.0	99%	NR_074453.1
Bacillus toyonensis strain BCT-7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1762	1762	100%	0.0	99%	NR_121761.1
Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1762	1762	100%	0.0	99%	NR_114581.1
Bacillus thuringiensis strain IAM 12077 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1762	1762	100%	0.0	99%	NR_043403.1

Şekil B.10. Y9 (16S rRNA-990 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus pumilus SAFR-032 strain SAFR-032 16S ribosomal RNA, complete sequence	2368	2368	100%	0.0	100%	NR_074977.1
Bacillus pumilus strain NBRC 12092 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2368	2368	100%	0.0	100%	NR_112637.1
Bacillus pumilus strain ATCC 7061 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2368	2368	100%	0.0	100%	NR_043242.1
Bacillus safensis strain NBRC 100820 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2357	2357	100%	0.0	99%	NR_113945.1
Bacillus safensis strain FO-36b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2357	2357	100%	0.0	99%	NR_041794.1
Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2340	2340	100%	0.0	99%	NR_118441.1
Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2335	2335	100%	0.0	99%	NR_118439.1
Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2335	2335	100%	0.0	99%	NR_042336.1
Bacillus albidinis strain 41KF2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2335	2335	100%	0.0	99%	NR_042337.1
Bacillus pumilus strain SBMP2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2318	2318	100%	0.0	99%	NR_118381.1

Şekil B.11. Y11 (16S rRNA-1282 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus megaterium strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2302	2302	100%	0.0	100%	NR_116873.1
Bacillus megaterium strain NBRC 15308 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2302	2302	100%	0.0	100%	NR_112636.1
Bacillus megaterium strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2298	2298	100%	0.0	99%	NR_117473.1
Bacillus aryabhatai strain B8W22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2290	2290	100%	0.0	99%	NR_118442.1
Bacillus megaterium strain IAM 13418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2290	2290	100%	0.0	99%	NR_043401.1
Bacillus aryabhatai strain B8W22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2290	2290	100%	0.0	99%	NR_115953.1
Bacillus simplex strain DSM 1321 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2276	2276	100%	0.0	99%	NR_115603.1
Bacillus megaterium QM R1551 strain QM R1551 16S ribosomal RNA, complete sequence	2274	2274	100%	0.0	99%	NR_074290.1
Bacillus flexus strain SBMP3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2246	2246	100%	0.0	99%	NR_118382.1
Bacillus flexus strain NBRC 15715 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2241	2241	100%	0.0	99%	NR_113800.1

Şekil B.12. Y12 (16S rRNA-1246 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

EK-B (Devam)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus methylotrophicus strain CBMB205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1916	1916	100%	0.0	100%	NR_116240.1
Bacillus amyloliquefaciens strain MPA 1034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1903	1903	100%	0.0	99%	NR_117946.1
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1903	1903	100%	0.0	99%	NR_041455.1
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1899	1899	100%	0.0	99%	NR_112685.1
Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum strain FZB42 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1897	1897	100%	0.0	99%	NR_075005.1
Bacillus amyloliquefaciens strain BCRC 11601 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1897	1897	100%	0.0	99%	NR_116022.1
Bacillus subtilis strain 168 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1892	1892	100%	0.0	99%	NR_102783.1
Bacillus siamensis strain PD-A10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1892	1892	100%	0.0	99%	NR_117274.1
Bacillus vallismortis strain DSM 11031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1886	1886	100%	0.0	99%	NR_024696.1
Bacillus vallismortis strain NBRC 101236 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1882	1882	100%	0.0	99%	NR_113994.1

Şekil B.13. Y13 (16S rRNA-1037bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus methylotrophicus strain YJ11-1-4, complete genome	1153	1153	100%	0.0	99%	NZ_CP011347.1
Bacillus amyloliquefaciens SQR9, complete genome	1153	1153	100%	0.0	99%	NZ_CP006890.1
Bacillus subtilis strain ATCC 19217, complete genome	1153	1153	100%	0.0	99%	NZ_CP009749.1
Bacillus amyloliquefaciens strain X1 Bamy_X1_contig000021, whole genome shotgun sequence	1153	1153	100%	0.0	99%	NZ_JQNZ01000021.1
Bacillus methylotrophicus strain FKM10 Scaffold1, whole genome shotgun sequence	1153	1153	100%	0.0	99%	NZ_LNTG01000001.1
Bacillus methylotrophicus strain KACC 13105 contig_5, whole genome shotgun sequence	1153	1153	100%	0.0	99%	NZ_JTKJ02000014.1
Bacillus amyloliquefaciens Lx-11 contig00003, whole genome shotgun sequence	1153	1153	100%	0.0	99%	NZ_AUNG01000003.1
Bacillus sp. 5B6 5B6, whole genome shotgun sequence	1142	1142	100%	0.0	98%	NZ_AJST01000001.1
Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum AS43_3, complete genome	1142	1142	100%	0.0	98%	NC_019842.1
Bacillus amyloliquefaciens strain G341, complete genome	1142	1142	100%	0.0	98%	NZ_CP011686.1

Şekil B.14. Y13 (gyrA-852 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus pumilus SAFR-032 strain SAFR-032 16S ribosomal RNA, complete sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_074977.1
Bacillus safensis strain NBRC 100820 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_113945.1
Bacillus pumilus strain NBRC 12092 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_112637.1
Bacillus safensis strain FO-36b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_041784.1
Bacillus pumilus strain ATCC 7061 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_043242.1
Bacillus pumilus strain CIP 52.67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_115334.1
Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1253	1253	100%	0.0	99%	NR_118439.1
Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1253	1253	100%	0.0	99%	NR_042336.1
Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1253	1253	100%	0.0	99%	NR_118441.1
Bacillus albidinis strain 41KF2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1253	1253	100%	0.0	99%	NR_042337.1

Şekil B.15. Y14 (16S rRNA-690 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain ATCC 6633 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1825	1825	100%	0.0	100%	NR_118486.1
Bacillus subtilis strain JCM 1465 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1825	1825	100%	0.0	100%	NR_113265.1
Bacillus subtilis strain NBRC 13719 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1825	1825	100%	0.0	100%	NR_112629.1
Bacillus subtilis strain BCRC 10255 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1825	1825	100%	0.0	100%	NR_116017.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1825	1825	100%	0.0	100%	NR_115001.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-6.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1825	1825	100%	0.0	100%	NR_114996.1
Bacillus subtilis strain IAM 12118 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1825	1825	100%	0.0	100%	NR_112116.1
Bacillus subtilis strain DSM 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1825	1825	100%	0.0	100%	NR_027552.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-44.a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1821	1821	100%	0.0	99%	NR_114997.1
Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain BGSC 3A28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1820	1820	100%	0.0	99%	NR_104873.1

Şekil B.16. Y15 (16S rRNA-998 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

EK-B (Devam)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus saprophyticus strain ATCC 15305 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1312	1312	100%	0.0	100%	NR_074999.1
Staphylococcus saprophyticus subsp. bovis strain GTC 843 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1306	1306	100%	0.0	99%	NR_041324.1
Staphylococcus saprophyticus strain ATCC 15305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1306	1306	100%	0.0	99%	NR_115607.1
Staphylococcus saprophyticus strain NBRC 102446 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1304	1304	100%	0.0	99%	NR_114090.1
Staphylococcus saprophyticus strain JCM 2427 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1304	1304	100%	0.0	99%	NR_113349.1
Staphylococcus xylosum strain JCM 2418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1301	1301	100%	0.0	99%	NR_113350.1
Staphylococcus xylosum strain KL 162 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1301	1301	100%	0.0	99%	NR_036907.1
Staphylococcus cohnii subsp. urealyticus strain CK27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1262	1262	100%	0.0	99%	NR_037046.1
Staphylococcus arlettae strain ATCC 43957 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1262	1262	100%	0.0	99%	NR_024664.1
Staphylococcus equorum strain PA 231 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1256	1256	100%	0.0	99%	NR_027520.1

Şekil B.17. Y16 (16S rRNA-710 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus cereus ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rrnA) gene, complete sequence	1755	1755	100%	0.0	100%	NR_074540.1
Bacillus cereus strain JCM 2152 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1755	1755	100%	0.0	100%	NR_113266.1
Bacillus cereus strain CCM 2010 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1755	1755	100%	0.0	100%	NR_115714.1
Bacillus cereus strain NBRC 15305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1755	1755	100%	0.0	100%	NR_112630.1
Bacillus cereus strain ATCC 14579 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1755	1755	100%	0.0	100%	NR_114582.1
Bacillus cereus strain IAM 12605 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1755	1755	100%	0.0	100%	NR_115526.1
Bacillus anthracis str. Ames strain Ames 16S ribosomal RNA, complete sequence	1749	1749	100%	0.0	99%	NR_074453.1
Bacillus anthracis strain ATCC 14578 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1749	1749	100%	0.0	99%	NR_041248.1
Bacillus toyonensis strain BCT-7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1744	1744	99%	0.0	99%	NR_121761.1
Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1744	1744	99%	0.0	99%	NR_114581.1

Şekil B.18. Y17 (16S rRNA-950 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strain GTC 1228 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1269	1269	100%	0.0	99%	NR_041323.1
Staphylococcus hominis strain DM 122 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1264	1264	100%	0.0	99%	NR_036956.1
Staphylococcus haemolyticus JCSC1435 strain JCSC1435 16S ribosomal RNA, complete sequence	1242	1242	100%	0.0	99%	NR_074994.1
Staphylococcus haemolyticus strain JCM 2416 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1242	1242	100%	0.0	99%	NR_113345.1
Staphylococcus devriesei strain KS-SP_60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	100%	0.0	99%	NR_116627.1
Staphylococcus haemolyticus strain SM 131 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1230	1230	100%	0.0	99%	NR_036955.1
Staphylococcus jettensis strain SEQ110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1227	1227	100%	0.0	99%	NR_118248.1
Staphylococcus petrasii strain CCM 8418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1225	1225	100%	0.0	99%	NR_118450.1
Staphylococcus luadunensis HKU09-01 strain HKU09-01 16S ribosomal RNA, complete sequence	1219	1219	100%	0.0	99%	NR_074868.1
Staphylococcus luadunensis strain ATCC 43809 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1219	1219	100%	0.0	99%	NR_024668.1

Şekil B.19. Y18-1 (16S rRNA-690 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus pumilus SAFR-032 strain SAFR-032 16S ribosomal RNA, complete sequence	1367	1367	100%	0.0	100%	NR_074977.1
Bacillus safensis strain NBRC 100820 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1367	1367	100%	0.0	100%	NR_113945.1
Bacillus pumilus strain NBRC 12092 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1367	1367	100%	0.0	100%	NR_112637.1
Bacillus safensis strain FO-36b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1367	1367	100%	0.0	100%	NR_041794.1
Bacillus pumilus strain ATCC 7061 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1367	1367	100%	0.0	100%	NR_043242.1
Bacillus pumilus strain CIP 52.67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1367	1367	100%	0.0	100%	NR_115334.1
Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1345	1345	100%	0.0	99%	NR_118439.1
Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1345	1345	100%	0.0	99%	NR_042336.1
Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1345	1345	100%	0.0	99%	NR_118441.1
Bacillus alitudinis strain 41KF2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1345	1345	100%	0.0	99%	NR_042337.1

Şekil B.20. Y18-2 (16S rRNA-740 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

EK-B (Devam)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus amyloliquefaciens strain MPA 1034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1325	1325	100%	0.0	99%	NR_117946.1
Bacillus methylotrophicus strain CRMB205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1325	1325	100%	0.0	99%	NR_116240.1
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1325	1325	100%	0.0	99%	NR_041455.1
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1321	1321	100%	0.0	99%	NR_112685.1
Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum strain FZB42 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1319	1319	100%	0.0	99%	NR_075005.1
Bacillus siamensis strain PD-A10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	100%	0.0	99%	NR_117274.1
Bacillus amyloliquefaciens strain BCRC 11601 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	100%	0.0	99%	NR_116022.1
Bacillus subtilis strain 168 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1314	1314	100%	0.0	99%	NR_102783.1
Bacillus atropheus 1942 strain 1942 16S ribosomal RNA, complete sequence	1314	1314	100%	0.0	99%	NR_075016.1
Bacillus atropheus strain NBRC 15539 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1314	1314	100%	0.0	99%	NR_112723.1

Şekil B.21. Y19 (16S rRNA-720 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Buchnera aphidicola str. Sq (Schizaphis graminum) strain Sq 16S ribosomal RNA, complete sequence	279	279	61%	2e-74	74%	NR_074512.1
Buchnera aphidicola str. APS (Acyrthosiphon pisum) strain APS 16S ribosomal RNA, complete sequence	246	246	61%	2e-64	73%	NR_074159.1

Şekil B.22. Y21 (16S rRNA-1171 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus pumilus SAFR-032 strain SAFR-032 16S ribosomal RNA, complete sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_074977.1
Bacillus safensis strain NBRC 100820 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_113945.1
Bacillus pumilus strain NBRC 12092 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_112637.1
Bacillus safensis strain FO-36b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_041794.1
Bacillus pumilus strain ATCC 7061 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_043242.1
Bacillus pumilus strain CIP 52.67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_115334.1
Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1253	1253	100%	0.0	99%	NR_118439.1
Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1253	1253	100%	0.0	99%	NR_042336.1
Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1253	1253	100%	0.0	99%	NR_118441.1
Bacillus altitudinis strain 41KF2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1253	1253	100%	0.0	99%	NR_042337.1

Şekil B.23. Y22 (16S rRNA-690 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus anthracis str. Ames strain Ames 16S ribosomal RNA, complete sequence	1182	1182	100%	0.0	100%	NR_074453.1
Bacillus cereus ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rRNA) gene, complete sequence	1182	1182	100%	0.0	100%	NR_074540.1
Bacillus cereus strain JCM 2152 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1182	1182	100%	0.0	100%	NR_113266.1
Bacillus cereus strain CCM 2010 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1182	1182	100%	0.0	100%	NR_115714.1
Bacillus cereus strain NBRC 15305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1182	1182	100%	0.0	100%	NR_112630.1
Bacillus cereus strain ATCC 14579 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1182	1182	100%	0.0	100%	NR_114582.1
Bacillus anthracis strain ATCC 14578 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1182	1182	100%	0.0	100%	NR_041248.1
Bacillus cereus strain IAM 12605 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1182	1182	100%	0.0	100%	NR_115526.1
Bacillus toyonensis strain BCT-7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1166	1166	100%	0.0	99%	NR_121761.1
Bacillus pseudomycolides strain NBRC 101232 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1166	1166	100%	0.0	99%	NR_113991.1
Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1166	1166	100%	0.0	99%	NR_114581.1
Bacillus thuringiensis strain IAM 12077 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1166	1166	100%	0.0	99%	NR_043403.1
Bacillus thuringiensis strain NBRC 101235 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1162	1162	100%	0.0	99%	NR_112780.1
Bacillus thuringiensis BH07 16S ribosomal RNA, complete sequence	1160	1160	100%	0.0	99%	NR_102506.1

Şekil B.24. Y23 (16S rRNA-640 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_113957.1
Staphylococcus epidermidis strain Fusse1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_036904.1
Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A 16S ribosomal RNA, complete sequence	1269	1269	100%	0.0	99%	NR_074995.1
Staphylococcus caprae strain DSM 20608 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1253	1253	100%	0.0	99%	NR_119252.1
Staphylococcus capitis subsp. urealyticus strain MAW 8436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1253	1253	100%	0.0	99%	NR_027519.1
Staphylococcus capitis strain ATCC 27840 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1247	1247	100%	0.0	99%	NR_117006.1
Staphylococcus capitis strain JCM 2420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1247	1247	100%	0.0	99%	NR_113348.1
Staphylococcus caprae strain ATCC 35538 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1247	1247	100%	0.0	99%	NR_024665.1
Staphylococcus capitis strain LK 499 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1247	1247	100%	0.0	99%	NR_036775.1
Staphylococcus saccharolyticus strain JCM 1768 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1242	1242	100%	0.0	99%	NR_113405.1

Şekil B.25. Y24 (16S rRNA-690 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

EK-B (Devam)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus licheniformis strain ATCC 14580 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1251	1251	100%	0.0	99%	NR_074923.1
Bacillus licheniformis strain DSM 13 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1245	1245	100%	0.0	99%	NR_118996.1
Bacillus licheniformis strain BCRC 11702 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1245	1245	100%	0.0	99%	NR_116023.1
Bacillus licheniformis strain NBRC 12200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1243	1243	100%	0.0	99%	NR_113588.1
Bacillus sonorensis strain NBRC 101234 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1229	1229	100%	0.0	99%	NR_113993.1
Bacillus sonorensis strain NRRL B-23154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1223	1223	100%	0.0	99%	NR_025130.1
Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1201	1201	100%	0.0	99%	NR_042338.1
Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain BGSC 3A28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1181	1181	98%	0.0	98%	NR_104873.1
Bacillus amyloliquefaciens strain BCRC 11601 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1181	1181	98%	0.0	98%	NR_116022.1
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1177	1177	98%	0.0	98%	NR_112695.1

Şekil B.26. Y25 (16S rRNA-680 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus pasteurii 16S ribosomal RNA, complete sequence	1238	1238	100%	0.0	100%	NR_121749.1
Staphylococcus warneri SG1 strain SG1 16S ribosomal RNA, complete sequence	1232	1232	100%	0.0	99%	NR_102499.1
Staphylococcus warneri strain AW 25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1232	1232	100%	0.0	99%	NR_025922.1
Staphylococcus pasteurii strain ATCC 51129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1199	1199	100%	0.0	99%	NR_114435.1
Staphylococcus pasteurii strain ATCC 51129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1199	1199	100%	0.0	99%	NR_024669.1
Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A 16S ribosomal RNA, complete sequence	1182	1182	100%	0.0	99%	NR_074995.1
Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1182	1182	100%	0.0	99%	NR_113957.1
Staphylococcus epidermidis strain Füssel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1182	1182	100%	0.0	99%	NR_036904.1
Staphylococcus caprae strain DSM 20608 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1171	1171	100%	0.0	98%	NR_119252.1
Staphylococcus capitis subsp. urealyticus strain MAW 8436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1171	1171	100%	0.0	98%	NR_027519.1

Şekil B.27. Y26 (16S rRNA-670 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Acinetobacter radioresistens strain NBRC 102413 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1212	1212	100%	0.0	99%	NR_114074.1
Acinetobacter radioresistens strain FO-1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1208	1208	100%	0.0	99%	NR_026210.1
Acinetobacter venetianus strain ATCC 31012 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1147	1147	100%	0.0	98%	NR_042049.1
Acinetobacter lwofii strain JCM 6840 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1131	1131	100%	0.0	98%	NR_113346.1
Prolinoborus fasciculus strain CIP 103579 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1131	1131	100%	0.0	98%	NR_104948.1
Acinetobacter lwofii strain DSM 2403 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1131	1131	100%	0.0	98%	NR_026209.1
Acinetobacter beijerinckii strain 58a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1120	1120	100%	0.0	97%	NR_042234.1
Acinetobacter puyangensis strain BQ4-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1105	100%	0.0	97%	NR_109507.1
Acinetobacter junii strain ATCC 17908 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1103	1103	100%	0.0	97%	NR_117623.1
Acinetobacter junii strain DSM 6964 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	97%	NR_026208.1

Şekil B.28. Y27 (16S rRNA-660 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Acinetobacter radioresistens strain FO-1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	854	854	98%	0.0	90%	NR_026210.1
Acinetobacter radioresistens strain NBRC 102413 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	852	852	98%	0.0	90%	NR_114074.1
Acinetobacter venetianus strain ATCC 31012 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	798	798	98%	0.0	89%	NR_042049.1
Acinetobacter lwofii strain JCM 6840 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	98%	0.0	88%	NR_113346.1
Prolinoborus fasciculus strain CIP 103579 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	793	793	98%	0.0	88%	NR_104948.1
Acinetobacter lwofii strain DSM 2403 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	98%	0.0	88%	NR_026209.1
Acinetobacter beijerinckii strain 58a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	787	787	98%	0.0	88%	NR_042234.1
Acinetobacter tembergeriae strain DSM 14971 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	765	765	98%	0.0	88%	NR_117629.1
Acinetobacter junii strain ATCC 17908 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	765	765	98%	0.0	88%	NR_117623.1
Acinetobacter haemolyticus strain ATCC 17906 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	765	765	98%	0.0	88%	NR_117622.1

Şekil B.29. Y28 (16S rRNA-670 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

EK-B (Devam)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus warneri SG1 strain SG1 16S ribosomal RNA, complete sequence	1149	1149	99%	0.0	85%	NR_102499.1
Staphylococcus warneri strain AW 25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1149	1149	99%	0.0	85%	NR_025922.1
Staphylococcus pasteurii 16S ribosomal RNA, complete sequence	1144	1144	99%	0.0	85%	NR_121749.1
Staphylococcus pasteurii strain ATCC 51129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1127	1127	99%	0.0	85%	NR_024669.1
Staphylococcus pasteurii strain ATCC 51129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1112	1112	98%	0.0	85%	NR_114435.1
Staphylococcus auricularis strain WK 811M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1110	1110	99%	0.0	85%	NR_036897.1
Staphylococcus auricularis strain ATCC 33753 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1107	1107	99%	0.0	85%	NR_118683.1
Staphylococcus epidermidis strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1105	99%	0.0	85%	NR_113957.1
Staphylococcus epidermidis strain Fussel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1105	99%	0.0	85%	NR_036904.1
Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A 16S ribosomal RNA, complete sequence	1099	1099	99%	0.0	84%	NR_074995.1

Şekil B.30. Y29 (16S rRNA-1150 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus litoralis strain SW-211 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	237	237	59%	1e-61	73%	NR_043015.1
Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	220	220	59%	1e-56	73%	NR_118439.1
Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	220	220	59%	1e-56	73%	NR_042336.1
Bacillus stratosphericus strain 41KF2a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	220	220	59%	1e-56	73%	NR_118441.1
Bacillus niabensis strain 4T19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	220	220	59%	1e-56	73%	NR_043334.1
Bacillus althudinis strain 41KF2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	220	220	59%	1e-56	73%	NR_042337.1
Bacillus halosaccharovorans strain E33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	217	217	59%	1e-55	73%	NR_109116.1
Bacillus idriensis strain SMC 4352-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	217	217	68%	1e-55	72%	NR_043268.1
Bacillus herbersteinensis strain D-1.5 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	215	215	45%	5e-55	74%	NR_042286.1
Bacillus numilus SAFR-032 strain SAFR-032 16S ribosomal RNA, complete sequence	209	209	59%	2e-53	73%	NR_074977.1

Şekil B.31. Y31 (16S rRNA-1219 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Acinetobacter radioresistens strain NBRC 102413 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1249	1249	100%	0.0	99%	NR_114074.1
Acinetobacter radioresistens strain FO-1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1245	1245	100%	0.0	99%	NR_026210.1
Acinetobacter venetianus strain ATCC 31012 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1184	1184	100%	0.0	98%	NR_042049.1
Acinetobacter lwofii strain JCM 6840 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1168	1168	100%	0.0	98%	NR_113346.1
Prolinoborus fasciculatus strain CIP 103579 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1168	1168	100%	0.0	98%	NR_104948.1
Acinetobacter lwofii strain DSM 2403 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1168	1168	100%	0.0	98%	NR_026209.1
Acinetobacter baierinckii strain 58a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1157	1157	100%	0.0	97%	NR_042234.1
Acinetobacter junii strain ATCC 17908 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1140	1140	100%	0.0	97%	NR_117623.1
Acinetobacter junii strain DSM 6964 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	97%	NR_026208.1
Acinetobacter puyangensis strain BQ4-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1136	1136	100%	0.0	97%	NR_109507.1

Şekil B.32. Y32 (16S rRNA-680 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strain GTC 1228 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1626	1626	99%	0.0	99%	NR_041323.1
Staphylococcus hominis strain DM 122 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1626	1626	99%	0.0	99%	NR_036956.1
Staphylococcus haemolyticus JCSC1435 strain JCSC1435 16S ribosomal RNA, complete sequence	1598	1598	99%	0.0	99%	NR_074999.1
Staphylococcus haemolyticus strain JCM 2416 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1598	1598	99%	0.0	99%	NR_113245.1
Staphylococcus leffensis strain SEQ110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1589	1589	99%	0.0	99%	NR_118248.1
Staphylococcus petrasii strain CCM 8418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1587	1587	99%	0.0	99%	NR_118450.1
Staphylococcus devriesei strain KS-SP_60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1587	1587	99%	0.0	99%	NR_116627.1
Staphylococcus haemolyticus strain SM 131 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1587	1587	99%	0.0	99%	NR_036955.1
Staphylococcus luqunensis HKU09-01 strain HKU09-01 16S ribosomal RNA, complete sequence	1570	1570	99%	0.0	99%	NR_074868.1
Staphylococcus luqunensis strain ATCC 43809 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1570	1570	99%	0.0	99%	NR_024668.1

Şekil B.33. Y33 (16S rRNA-890 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

EK-B (Devam)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus licheniformis strain DSM 13 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1840	1840	100%	0.0	99%	NR_118996.1
Bacillus licheniformis strain BCRC 11702 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1840	1840	100%	0.0	99%	NR_116023.1
Bacillus licheniformis strain ATCC 14580 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1829	1829	100%	0.0	99%	NR_074923.1
Bacillus licheniformis strain NBRC 12200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1829	1829	100%	0.0	98%	NR_113588.1
Bacillus sonorensis strain NBRC 101234 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1812	1812	100%	0.0	98%	NR_113993.1
Bacillus sonorensis strain NRRL B-23154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1807	1807	100%	0.0	98%	NR_025130.1
Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1797	1797	100%	0.0	98%	NR_042338.1
Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain BGSC3A28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1724	1724	100%	0.0	97%	NR_104873.1
Bacillus atrophaeus strain NBRC 15539 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1720	1720	100%	0.0	97%	NR_112723.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain QS-44 a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1720	1720	100%	0.0	97%	NR_114997.1

Şekil B.34. Y35 (16S rRNA-1031 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum strain FZB42 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2394	2394	100%	0.0	99%	NR_075005.1
Bacillus amyloliquefaciens strain MPA 1034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2394	2394	100%	0.0	99%	NR_117946.1
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2394	2394	100%	0.0	99%	NR_041455.1
Bacillus methylotrophicus strain CBMB205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2390	2390	99%	0.0	99%	NR_116240.1
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2390	2390	100%	0.0	99%	NR_112685.1
Bacillus subtilis strain 168 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2388	2388	100%	0.0	99%	NR_102783.1
Bacillus amyloliquefaciens strain BCRC 11601 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2388	2388	100%	0.0	99%	NR_116022.1
Bacillus vallismortis strain DSM 11031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2383	2383	100%	0.0	99%	NR_024696.1
Bacillus vallismortis strain NBRC 101236 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2379	2379	100%	0.0	99%	NR_113994.1
Bacillus siamensis strain PD-A10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2379	2379	100%	0.0	99%	NR_117274.1

Şekil B.35. Y37 (16S rRNA-1312 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus methylotrophicus strain YJ11-1-4, complete genome	1227	1227	99%	0.0	99%	NZ_CP011347.1
Bacillus amyloliquefaciens SQR9, complete genome	1227	1227	99%	0.0	99%	NZ_CP006890.1
Bacillus subtilis strain ATCC 19217, complete genome	1227	1227	99%	0.0	99%	NZ_CP009749.1
Bacillus amyloliquefaciens strain X1 Bamy X1 contig000021, whole genome shotgun sequence	1227	1227	99%	0.0	99%	NZ_JONZ01000021.1
Bacillus sp. 5B6 5B6, whole genome shotgun sequence	1210	1210	99%	0.0	99%	NZ_AJST01000001.1
Bacillus amyloliquefaciens CC178, complete genome	1210	1210	99%	0.0	99%	NC_022653.1
Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum AS43.3, complete genome	1210	1210	99%	0.0	99%	NC_019842.1
Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum str. FZB42, complete genome	1210	1210	99%	0.0	99%	NC_009725.1
Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum TriqoCor1448, complete genome	1199	1199	99%	0.0	98%	NZ_CP007244.1
Bacillus sp. Pc3, complete genome	1199	1199	99%	0.0	98%	NZ_CP010406.1

Şekil B.36. Y37 (gyrA-914 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus sonorensis strain NRRL B-23154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1916	1916	100%	0.0	99%	NR_025130.1
Bacillus sonorensis strain NBRC 101234 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1910	1910	100%	0.0	99%	NR_113993.1
Bacillus licheniformis strain DSM 13 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1882	1882	100%	0.0	99%	NR_118996.1
Bacillus licheniformis strain BCRC 11702 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1882	1882	100%	0.0	99%	NR_116023.1
Bacillus licheniformis strain ATCC 14580 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1871	1871	100%	0.0	99%	NR_074923.1
Bacillus licheniformis strain NBRC 12200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1871	1871	100%	0.0	99%	NR_113588.1
Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1840	1840	100%	0.0	98%	NR_042338.1
Bacillus atrophaeus 1942 strain 1942 16S ribosomal RNA, complete sequence	1783	1783	100%	0.0	97%	NR_075016.1
Bacillus atrophaeus strain JCM 9070 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1783	1783	100%	0.0	97%	NR_024689.1
Bacillus atrophaeus strain NBRC 15539 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1779	1779	100%	0.0	97%	NR_112723.1

Şekil B.37. Y38 (16S rRNA-1057 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

EK-B (Devam)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus hominis strain DM 122 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1356	1356	100%	0.0	99%	NR_036956.1
Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strain GTC 1228 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1351	1351	100%	0.0	99%	NR_041323.1
Staphylococcus haemolyticus JCS1435 strain JCS1435 16S ribosomal RNA, complete sequence	1334	1334	100%	0.0	99%	NR_074994.1
Staphylococcus haemolyticus strain JCM 2416 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1334	1334	100%	0.0	99%	NR_113345.1
Staphylococcus lottiensis strain SEQ110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1330	1330	100%	0.0	99%	NR_118248.1
Staphylococcus petrasii strain CCM 8418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1328	1328	100%	0.0	99%	NR_118450.1
Staphylococcus devriesei strain KS-SP_60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1328	1328	100%	0.0	99%	NR_116627.1
Staphylococcus haemolyticus strain SM 131 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1323	1323	100%	0.0	99%	NR_036955.1
Staphylococcus lugdunensis HKU09-01 strain HKU09-01 16S ribosomal RNA, complete sequence	1312	1312	100%	0.0	99%	NR_074868.1
Staphylococcus lugdunensis strain ATCC 43809 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1312	1312	100%	0.0	99%	NR_024668.1

Şekil B.38. Y39 (16S rRNA-740 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Acinetobacter pittii strain ATCC 19004 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1851	1851	100%	0.0	99%	NR_117621.1
Acinetobacter pittii strain LMG 1035 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1851	1851	100%	0.0	99%	NR_117930.1
Acinetobacter calcoaceticus strain NCCB 22016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1851	1851	100%	0.0	99%	NR_042387.1
Acinetobacter calcoaceticus PHEA-2 strain PHEA-2 16S ribosomal RNA, complete sequence	1847	1847	100%	0.0	99%	NR_102826.1
Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1845	1845	100%	0.0	99%	NR_102814.1
Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1845	1845	100%	0.0	99%	NR_116039.1
Acinetobacter pittii strain CIP 70_29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1842	1842	100%	0.0	99%	NR_116774.1
Acinetobacter nosocomialis strain RUH 2376 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1805	1805	100%	0.0	99%	NR_117931.1
Acinetobacter calcoaceticus strain ATCC 23055 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1790	1790	100%	0.0	98%	NR_117619.1
Acinetobacter calcoaceticus strain JCM 6842 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1790	1790	100%	0.0	98%	NR_113343.1

Şekil B.39. Y41 (16S rRNA-1020 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus strain GTC 1228 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1312	1312	100%	0.0	100%	NR_041323.1
Staphylococcus hominis strain DM 122 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1306	1306	100%	0.0	99%	NR_036956.1
Staphylococcus haemolyticus JCS1435 strain JCS1435 16S ribosomal RNA, complete sequence	1284	1284	100%	0.0	99%	NR_074994.1
Staphylococcus haemolyticus strain JCM 2416 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1284	1284	100%	0.0	99%	NR_113345.1
Staphylococcus devriesei strain KS-SP_60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1279	1279	100%	0.0	99%	NR_116627.1
Staphylococcus petrasii strain CCM 8418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1273	1273	100%	0.0	99%	NR_118450.1
Staphylococcus lottiensis strain SEQ110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1273	1273	100%	0.0	99%	NR_118248.1
Staphylococcus haemolyticus strain SM 131 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1273	1273	100%	0.0	99%	NR_036955.1
Staphylococcus lugdunensis HKU09-01 strain HKU09-01 16S ribosomal RNA, complete sequence	1262	1262	100%	0.0	99%	NR_074868.1
Staphylococcus lugdunensis strain ATCC 43809 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1262	1262	100%	0.0	99%	NR_024668.1

Şekil B.40. Y42 (16S rRNA-640 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Staphylococcus cohnii subsp. urealyticus strain CK27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1210	1210	100%	0.0	100%	NR_037046.1
Staphylococcus cohnii strain GH 137 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1205	1205	100%	0.0	99%	NR_036902.1
Staphylococcus nepalensis strain CW1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1179	1179	100%	0.0	99%	NR_028996.1
Staphylococcus artletae strain ATCC 43957 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1177	1177	100%	0.0	99%	NR_024664.1
Staphylococcus saprophyticus strain ATCC 15305 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1160	1160	100%	0.0	99%	NR_074999.1
Staphylococcus xylosum strain JCM 2418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%	NR_113350.1
Staphylococcus equorum strain PA 231 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%	NR_027520.1
Staphylococcus equorum subsp. linens strain OS-84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%	NR_115000.1
Staphylococcus equorum subsp. linens strain RP29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%	NR_041926.1
Staphylococcus xylosum strain KL 162 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%	NR_036907.1

Şekil B.41. Y43 (16S rRNA-655 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

EK-B (Devam)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus amyloliquefaciens strain MPA 1034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1380	1380	100%	0.0	99%	NR_117946.1
Bacillus methylotrophicus strain CRMB205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1380	1380	100%	0.0	99%	NR_116240.1
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1380	1380	100%	0.0	99%	NR_041455.1
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1376	1376	100%	0.0	99%	NR_112685.1
Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum strain FZB42 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1375	1375	100%	0.0	99%	NR_075005.1
Bacillus siamensis strain PD-A10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1375	1375	100%	0.0	99%	NR_117274.1
Bacillus amyloliquefaciens strain BCRC 11601 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1375	1375	100%	0.0	99%	NR_116022.1
Bacillus subtilis strain 168 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1369	1369	100%	0.0	99%	NR_102783.1
Bacillus atrophaeus 1942 strain 1942 16S ribosomal RNA, complete sequence	1369	1369	100%	0.0	99%	NR_075016.1
Bacillus atrophaeus strain NBRC 15539 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1369	1369	100%	0.0	99%	NR_112723.1

Şekil B.42. Y44 (16S rRNA-750 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Acinetobacter pittii strain ATCC 19004 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1478	1478	100%	0.0	100%	NR_117621.1
Acinetobacter pittii strain LMG 1035 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1478	1478	100%	0.0	100%	NR_117930.1
Acinetobacter pittii strain CIP 70 29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1478	1478	100%	0.0	100%	NR_116774.1
Acinetobacter calcoaceticus strain NCCB 22016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1478	1478	100%	0.0	100%	NR_042387.1
Acinetobacter calcoaceticus PHEA-2 strain PHEA-2 16S ribosomal RNA, complete sequence	1472	1472	100%	0.0	99%	NR_102826.1
Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1472	1472	100%	0.0	99%	NR_102814.1
Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1472	1472	100%	0.0	99%	NR_116039.1
Acinetobacter nosocomialis strain RUH 2376 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1445	1445	100%	0.0	99%	NR_117931.1
Acinetobacter calcoaceticus strain ATCC 23055 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1432	1432	99%	0.0	99%	NR_117619.1
Acinetobacter calcoaceticus strain JCM 6842 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1432	1432	99%	0.0	99%	NR_113343.1

Şekil B.43. Y45 (16S rRNA-800 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus anthracis str. Ames strain Ames 16S ribosomal RNA, complete sequence	1386	1386	100%	0.0	100%	NR_074453.1
Bacillus cereus ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rRNA) gene, complete sequence	1386	1386	100%	0.0	100%	NR_074540.1
Bacillus cereus strain JCM 2152 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1386	1386	100%	0.0	100%	NR_113266.1
Bacillus cereus strain CCM 2010 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1386	1386	100%	0.0	100%	NR_115714.1
Bacillus cereus strain NBRC 15305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1386	1386	100%	0.0	100%	NR_112630.1
Bacillus cereus strain ATCC 14579 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1386	1386	100%	0.0	100%	NR_114582.1
Bacillus anthracis strain ATCC 14578 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1386	1386	100%	0.0	100%	NR_041248.1
Bacillus cereus strain IAM 12605 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1386	1386	100%	0.0	100%	NR_115526.1
Bacillus boyonensis strain BCT-7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1371	1371	99%	0.0	99%	NR_121761.1
Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1371	1371	99%	0.0	99%	NR_114581.1

Şekil B.44. Y46 (16S rRNA-750 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus sonorensis strain NRRL B-23154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1962	1962	100%	0.0	100%	NR_025130.1
Bacillus sonorensis strain NBRC 101234 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1956	1956	100%	0.0	99%	NR_113993.1
Bacillus licheniformis strain DSM 13 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1929	1929	100%	0.0	99%	NR_118996.1
Bacillus licheniformis strain BCRC 11702 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1929	1929	100%	0.0	99%	NR_116023.1
Bacillus licheniformis strain ATCC 14580 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1917	1917	100%	0.0	99%	NR_074923.1
Bacillus licheniformis strain NBRC 12200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1917	1917	100%	0.0	99%	NR_113588.1
Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1884	1884	100%	0.0	99%	NR_042338.1
Bacillus atrophaeus 1942 strain 1942 16S ribosomal RNA, complete sequence	1827	1827	100%	0.0	98%	NR_075016.1
Bacillus atrophaeus strain JCM 9070 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1827	1827	100%	0.0	98%	NR_024689.1
Bacillus atrophaeus strain NBRC 15539 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1823	1823	100%	0.0	98%	NR_112723.1

Şekil B.45. Y47 (16S rRNA-1062 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

EK-B (Devam)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus sonorensis strain NRRL B-23154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1275	1275	100%	0.0	100%	NR_025130.1
Bacillus sonorensis strain NBRC 101234 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1269	1269	100%	0.0	99%	NR_113993.1
Bacillus licheniformis strain DSM 13 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1253	1253	100%	0.0	99%	NR_118996.1
Bacillus licheniformis strain BCRC 11702 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1253	1253	100%	0.0	99%	NR_116023.1
Bacillus licheniformis strain ATCC 14580 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1247	1247	100%	0.0	99%	NR_074923.1
Bacillus licheniformis strain NBRC 12200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1245	1245	100%	0.0	99%	NR_113588.1
Bacillus aerius strain 24K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1208	1208	100%	0.0	98%	NR_042338.1
Bacillus subtilis subsp. inaquosorum strain BGSC3A28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1192	1192	99%	0.0	98%	NR_104873.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OS-44.a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1188	1188	99%	0.0	98%	NR_114997.1
Bacillus subtilis strain 168 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1186	1186	99%	0.0	98%	NR_102783.1

Şekil B.46. Y48 (16S rRNA-690 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus atrophaeus 1942 strain 1942 16S ribosomal RNA, complete sequence	745	745	100%	0.0	90%	NR_075016.1
Bacillus amyloliquefaciens strain MPA 1034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	745	745	100%	0.0	90%	NR_117946.1
Bacillus siamensis strain PD-A10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	745	745	100%	0.0	90%	NR_117274.1
Bacillus methylotrophicus strain CBMB205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	745	745	100%	0.0	90%	NR_116240.1
Bacillus atrophaeus strain NRRL NRS-213 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	745	745	100%	0.0	90%	NR_116190.1
Bacillus atrophaeus strain NBRC 15539 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	745	745	100%	0.0	90%	NR_112723.1
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	745	745	100%	0.0	90%	NR_041455.1
Bacillus atrophaeus strain JCM 9070 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	745	745	100%	0.0	90%	NR_024689.1
Bacillus amyloliquefaciens strain NBRC 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	741	741	100%	0.0	90%	NR_112685.1
Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum strain FZB42 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	739	739	100%	0.0	90%	NR_075005.1

Şekil B.47. Y49 (16S rRNA-580 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus toyonensis strain BCT-7112 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1386	1386	100%	0.0	100%	NR_121761.1
Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1386	1386	100%	0.0	100%	NR_114581.1
Bacillus thuringiensis strain IAM 12077 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1386	1386	100%	0.0	100%	NR_043403.1
Bacillus thuringiensis strain NBRC 101235 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1382	1382	100%	0.0	99%	NR_112780.1
Bacillus thuringiensis Bt407 16S ribosomal RNA, complete sequence	1380	1380	100%	0.0	99%	NR_102506.1
Bacillus anthracis str. Ames strain Ames 16S ribosomal RNA, complete sequence	1373	1373	99%	0.0	99%	NR_074453.1
Bacillus cereus ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rRNA) gene, complete sequence	1373	1373	99%	0.0	99%	NR_074540.1
Bacillus cereus strain JCM 2152 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1373	1373	99%	0.0	99%	NR_113266.1
Bacillus cereus strain CCM 2010 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1373	1373	99%	0.0	99%	NR_115714.1
Bacillus cereus strain NBRC 15305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1373	1373	99%	0.0	99%	NR_112630.1

Şekil B.48. Y50 (16S rRNA-750 bç) izolatının BLAST analiz sonucu

EK-C

Besiyeri, Tampon ve Solüsyonların Hazırlanması

50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) Koşturma Tamponu (1l) (Agaroz Jel) : 242 g Tris base 600 ml distile su içerisinde çözündürülür. 57 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) ilave edilerek son konsantrasyon 1 l'ye tamamlanır.

EDTA (0,5 M, pH 8, 100 ml): 7,3 g EDTA tartılır, 30 ml distile su içerisinde çözündürülür. Karıştırıcıda pH 8 olana kadar 1 M NaOH eklenir ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır. Daha sonra filtreden geçirilir.

NaOH (1M, 100 ml): 4 g NaOH tartılır, 80 ml distile su içerisinde çözündürülür. Üzerine 100 ml'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenir ve oda sıcaklığında saklanır.

Kullanılan Besiyerleri:

Nutrient Agar (Merck)

Nutrient Broth (Biolife)

Pepton Water (Merck)

MR-VP (Methyl Red-Voges Proskauer) Broth (Merck)

Simmon's Sitrat Agar (Merck)

Üç Şekerli Demir (TSI) Agar (Merck)

MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxine) Agar (Merck)

Luria-Bertani Broth

Gelatin Broth

Nişasta Agar

Tirozin (Tyrosine) Agar ve pH 5,6 Agar

Nutrient Agar, Nutrient Broth, Pepton Water, MR-VP (Methyl Red-Voges Proskauer) Broth, Simmon's Sitrat Agar, Üç Şekerli Demir (TSI) Agar besiyerleri ticari olarak temin edildi.

Luria-Bertani Broth Besiyeri (g/l): 10 g Tripton, 5 g Yeast ekstrakt, 10 g NaCl distile su içerisinde çözündürülür. pH 6,8-7,2'ye ayarlanır ve son hacim 1 l'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

Gelatin Broth Besiyeri (g/l): 120 g Jelatin, 5 g Pepton, 3 g Beef ekstrakt distile suda çözündürülür. pH 6,8±0,2'ye ayarlanır ve son hacim 1 l'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

EK-C (Devam)

Nişasta Agar Besiyeri (g/l): 3 g Beef ekstrakt, 10 g Soluble starch, 12 g Agar distile suda özdürölür. pH 7,5±0,2'ye ayarlanır ve son hacim 1 l'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

Tirozin (Tyrosine) Agar Besiyeri (g/l): 5 g Pepton, 5 g Tirozin, 3 g Beef ekstrakt, 15 g Agar distile suda özdürölür. pH 7±0,2'ye ayarlanır ve son hacim 1 l'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

pH 5,6 Agar Besiyeri: Ticari olarak temin edilen Nutrient Agar besiyeri hazırlanırken pH'sı 5,6'ya ayarlanır.

Kullanılan boyalar:

Safranin: 0,25 g Safranin, 10 ml %95'lik etil alkolde eritilip 100 ml distile su ile karıştırılır.

Lugol: 2 g Potasyum iyodit 30 ml distile su içerisinde özölüdükten sonra iyice ezilmiş 1 g iyot çözeltiye eklenir ve çözelti hacmi 300 ml'ye tamamlanır.

Kristal viyole: 0,5 g Kristal viyole 100 ml distile su içinde özdürölür.

Kullanılan ayıraçlar:

Metil kırmızısı: 0,2 g metil kırmızısı, 50 ml %95'lik etil alkol içinde özdürölür ve üzerine yavaş yavaş 50 ml damıtık su eklenir.

α-Naftol ayıracı (% 5 (w/v)'lik): 5 g α-Naftol 80 ml %95'lik etil alkol içinde özdürölür ve hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

Kovaks ayıracı: 10 g p-dimetil aminobenzaldehit, 150 ml amil / isoamil ya da butil alkol içinde manyetik karıştırıcıda özdürölür. Bu çözeltiye azar azar 50 ml konsantre HCl eklenir.

Kullanılan özeltiler

KOH özeltisi (% 40 (w/v)'lık): 40 g Potasyum hidroksit yaklaşık 50 ml damıtık su içinde özdürölür ve hacim 100 ml'ye tamamlanır.

EK-C (Devam)

Tablo C.1. Deneylerde kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka ve model
ProFlex™ 3 x 32-well PCR System	Thermo Fisher Scientific
-80°C Ultra Derin Dondurucu	WiseCryo
Buzdolabı	Arçelik,5243 NEB No-Frost
Saf Su Cihazı	Milipore,Direct-Q UV
Hassas Terazı	Scaltec SPB31
Vorteks	IKA, GENIUS3
Otoklav	HMC Hidave HG-80
Yatay Elektroferez	Cleaver, MSMINI10
Elektroferez Güç Kaynağı	Cleaver, CS-300
UV Kabin	Biosan UVC/T-AR
UV Transilüminatör	UVP-GelDoc-It 310 imaging system
UV Visible Spektrofotometre	Agilent Cary-60
Ultra Santrifüj	Sigma 4-17K
Mini Santrifüj	Eppendorf 5418
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph, MR-HeiStandart
Sıvı azot tankı	MVE
Mikrodalga Fırın	Arçelik
Çalkalamalı İnkübatör	New Brunswick Scientific Excella E24
pH metre	Inolab WTW cond 3401
Etüv	Nüve FN500
Buz Makinası	Scotsman AF80
Qubit 2.0 Fluorometer	Invitrogen
Mikroskop	Olympus CX21FS1
VITEK-MS	Biomérieux-50126

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Duman Y., Yüzügüllü Karakuş Y., **Sertel A.**, Polat F., Production, Purification and Characterization of a Thermo-alkali Stable and Metal-tolerant Carboxymethylcellulase from Newly Isolated *Bacillus methylotrophicus* Y37, *Turkish Journal of Chemistry*, 2016, **40**(5), 802-815.

Işık S., Yüzügüllü Karakuş Y., **Sertel A.**, Avcı Duman Y., *Bacillus pumilus* Y7 İzolatından Katalaz Enziminin Üretimi, 23. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Gaziantep, Türkiye, 5-9 Eylül 2016.

Sertel A., Yüzügüllü Y., Işık S., Avcı Duman Y., Polat F., Aksoy Ö., İzmit ve Çevresindeki Topraklardan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması, 18. *Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Konya, Türkiye, 18-19 Aralık 2015.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Kocaeli’nde doğdu. İlk öğrenimini Kocaeli’nde, orta öğrenimini İstanbul’da ve lise öğrenimini Kocaeli’nde tamamladı. 2006 yılında girdiği Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2010 yılında birincilik ile mezun oldu. 2011 yılında Kocaeli Üniversitesi Eğitim Fakülte’sinden Pedagojik Formasyon Sertifikasını aldı. 2011-2013 yılları arasında Acıbadem Kocaeli Hastanesi’nde Biyolog olarak çalıştı. 2014 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.

