



**PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN ÇEŞİTLİ  
*Bacillus* TÜRLERİ'NİN 16S rRNA  
YÖNTEMİ İLE TANILANMASI**

**Emre DAVARCI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı**

**Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ**

**2017**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN ÇEŞİTLİ *Bacillus* TÜRLERİ'NİN 16S  
rRNA YÖNTEMİ İLE TANILANMASI

Emre DAVARCI

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM  
2017

Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU

PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN ÇEŞİTLİ *Bacillus* TÜRLERİ'NİN 16S rRNA YÖNTEMİ İLE TANILANMASI

Doc. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında, Emre DAVARCI tarafından hazırlanan bu çalışma, 14/02/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (3/3)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doc. Dr. Arzu Ala GÖRMEZ

İmza : 

Üye : Doc. Dr. Neslihan DİKBAŞ

İmza : 

Üye : Doc. Dr. Emine ORHAN

İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **02.03/2017** tarih ve **3/79** nolu kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Cavit KAZAZ  
Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN ÇEŞİTLİ *Bacillus* TÜRLERİ'NİN 16S rRNA YÖNTEMİ İLE TANILANMASI

Emre DAVARCI

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Farklı ekosistemlerden endüstriyel enzim üreticisi olan mikroorganizmaların taranması, izolasyonu ve konvensiyonel yöntemlerle tanılanması mikrobiyal biyoteknolojinin temel konularından biridir. Mikroorganizmalar tanılanırken morfolojik ve biyokimyasal verilerin moleküler veriler ile desteklenmesi gerekmektedir. Bakteriyel moleküler taksonomide en çok kullanılan moleküler yöntem 16S rRNA sekans analizidir.

Çalışmada, peynirden endüstriyel öneme sahip olan *Bacillus* türlerinin izole edilerek tanılanması amaçlanmıştır. Bu amaçla morfolojik ve biyokimyasal testlerin yanı sıra 16S rRNA'ya dayalı moleküler tanılamadan yararlanılmıştır.

16S rRNA bölgeleri PCR ile çoğaltılarak sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen profil, gen bankasındaki verilerle karşılaştırılarak tanılama yapılmıştır. 16S rRNA bölgeleri sekans sonuçları gen bankasındaki verilerle %99-100 oranında homoloji göstermiştir. Buna göre çalışmada tanılanan bakteriler; *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus rhamnosus* ve *Raoultella ornithinolytica* olarak tespit edilmiştir.

Çalışmanın sonucunda, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* ve *Bacillus safensis* bakteri türleri değerlendirilmeye alınmıştır ve filogenetik analizle tespit edilen diğer bakteri türleri ile olan ilişkileri ortaya konulmuştur.

**2017, 42 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Peynir, izolasyon, *Bacillus*, 16S rRNA

## ABSTRACT

MSc Thesis

### IDENTIFICATION OF VARIOUS *Bacillus* SPECIES ISOLATED FROM CHEESE BY 16S rRNA METHOD

Emre DAVARCI

Atatürk University  
Natural Sciences Institute  
Department of Agrikultural Biotechnology  
Department of Enzyme and Microbial Biotechnology

Assoc. Prof. Dr. Neslihan DİKBAS

Screening, isolation and identification industrial enzyme producer microorganisms by conventional methods from different ecosystems is one of the main aspects of microbial biotechnology. In the identification of microorganisms, morphological and biochemical data should be supported with molecular data. The most commonly used molecular method in bacterial molecular taxonomy is 16S rRNA sequence analysis.

The aim of this study was to isolate and identify the *Bacillus* species that has an industrial importance. Accordingly, in addition to morphological and biochemical tests, molecular identification based on 16S rRNA was used.

16S rRNA regions were amplified by PCR and sequence analysis was performed. The profile obtained as a result of the analysis was compared with the data in the gene bank. The 16S rRNA region sequence results showed 99-100% homology with the data in the gene bank. The bacteria identified in this study are determined as *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Raoultella ornithinolytica*.

As a result of the study, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus safensis* bacterial strains were evaluated and their relationship with other bacterial species detected by phylogenetic analysis were presented.

**2017, 42 pages**

**Keywords:** Cheese, *Bacillus*, Isolation, 16S rRNA.

## TEŞEKKÜR

Bu alıőmanın yűrűtűlmesinde gűstermiő olduėu her tűrlű yardım ve katkılarından dolayı danıőman hocam Sayın Doç. Dr. Neslihan DİKBAŐ'a, teőekkűr etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca çalıőmalarım sırasında desteklerini bizden esirgemeyen Fen Fakűltesi Biyoloji bűlűműndeki deėerli hocam Sayın Doç. Dr. Őzlem BARIŐ'a, Ziraat Fakűltesi Tarla Bitkileri bűlűműndeki deėerli hocam Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN'a, Bűlűműműz doktora űėrencisi Sayın Doktora Őėrencisi Merve ŐENOL KOTAN'a, laboratuvar çalıőmalarımda her daim yanımda olan Yűksek lisans arkadaőım Yunus IŐIK'a ve yűksek lisans arkadaőlarıma teőekkűr ederim.

Daima, yardım ve desteklerini gűrdűėűm anne ve babama ise minnettar olduėumu bildirmek isterim.

**Emre DAVARCI**

**Őubat, 2017**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>13</b>
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar .....	13
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar .....	13
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler .....	14
3.2. Yöntem .....	14
3.2.1. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı .....	14
3.2.2. Kaynaktan örneklerin alınması ve bakterilerin izolasyonu .....	16
3.2.5. Katalaz testi .....	18
3.2.6. İzolatların DNA izolasyonu.....	19
3.2.7. 16S rRNA bölgesinin PCR yardımı ile çoğaltılması:.....	19
3.2.8. DNA dizi analizlerinin alınması ve sonuçların değerlendirilmesi: .....	20
3.2.9. Filogenetik analiz .....	20
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>22</b>
4.1. Peynir Örneklerinden Bakteri İzolasyonu Sonuçları.....	22
4.2. Kullanılan Mikroorganizmaların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri .....	22
4.3. Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi .....	24
4.4. DNA izolasyon sonucu.....	25
4.5. PCR Sonuçları .....	26
4.6. Dizi Analizi Sonuçları .....	27
4.7. Dendogram Grafiği.....	31

<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>36</b>
KAYNAKLAR .....	40
ÖZGEÇMİŞ .....	43





## SİMGELER DİZİNİ

bp	Base pair (Baz çifti)
CTAB	Hekzadesil trimetil-amonyum bromit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
g	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen per oksit
KOH	Patasyum hidroksit
L	Litre
ml	Mililitre (10 <sup>-3</sup> )
NaCl	Sodyum klorit tuzu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
TAE	Tris Asetat EDTA tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre (10 <sup>-6</sup> )

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Dilüsyon hazırlanış şeması .....	16
Şekil 4.1. <i>Bacillus pumilus</i> (3n17-3) .....	24
Şekil 4.2. <i>Bacillus safensis</i> (3n20).....	24
Şekil 4.3. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (8 n17-1) .....	25
Şekil 4.4. DNA izolasyon sonuçları jel görüntüsü.....	26
Şekil 4.5. PCR sonuçları jel görüntüsü. ....	27
Şekil 4.6. <i>Bacillus</i> izolatlarından 16S rRNA gen bölgesine ait dizi analizi sonuçları....	28
Şekil 4.7. <i>Bacillus</i> izolatlarından 16S rRNA genine ait hizalama sonuçları .....	31
Şekil 4.8. Elde edilen tüm sekans dizilimlerinin dendogram grafiği.....	35

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 4.1.</b> Peynir örneklerinden izole edilen bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri .....	23
<b>Çizelge 4.2.</b> Peynir numunelerinden izole edilen bakterilerin katı kültür özellikleri .....	25



## 1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, canlıların veya onların ürünlerini insana (veya çevresine) yararlı bir ürün üretmek veya bir problemi çözmek için kullanılması olarak tanımlanır (Thieman and Palladino 2013). Biyoteknoloji, disiplinler arası bir bilim dalıdır. Biyoteknoloji, hücre ve doku biyolojisi, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, genetik, fizyoloji ve biyokimya gibi doğal bilimlerin yanında mühendislik ve bilgisayar mühendisliğinden yararlanarak, DNA teknolojisiyle bitki, hayvan ve mikroorganizmaları geliştirmek, doğal olarak var olmayan veya insan ihtiyaçları kadar üretilmeyen yeni ve az bulunan ürünleri elde etmek için kullanılan teknolojilerin tümüdür. Biyoteknolojinin tıbbi, tarım ve hayvancılık, gıda, çevre ve endüstriyel biyoteknoloji olarak 5 temel alanı bulunmaktadır (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2017).

Endüstriyel biyoteknoloji ürünleri biyolojik temelli kimyasallar, malzemeler ve yakıtlardır. Bu ürünler yenilenebilir kaynaklar, yaşayan hücreler ve/veya enzimlerden kullanılarak üretilir. Endüstriyel biyoteknoloji, modern moleküler biyoloji tekniklerinin kullanımı ile tekstil, kâğıt ve kimyasal maddelerin üretimine katkı sağlayan önemli bir bilim dalı haline gelmiştir (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2017).

Biyoteknolojinin önemli bir alt dalı olan mikrobiyal biyoteknolojide, bakteri ve mayalar gibi mikroorganizmaların manipülasyonu; pek çok gıdanın yapımında ve işlenmesinin kolaylaştırılmasında, endüstriyel atıkların daha etkin temizlemesinde ve enzim üretimi gibi birçok üretimde yararlanılmaktadır. Bakteri ve diğer mikropların bol miktarda bulunması, çok sayıda potansiyel biyoteknoloji uygulamasına olanak sağlamaktadır. Gen klonlama yöntemlerinin geliştirilmesinden çok öncelerde insanlar mikroorganizmaları biyoteknolojide kullanmaktaydılar. Mikrobiyal biyoteknoloji birçok yeni uygulama üreten dinamik bir alandır (Thieman and Palladino 2013).

Mikrobiyoloji iki temel konuyla ilgilenir. Birincisi yaşamı anlama ile ilgili temel bilim ikincisi ise bilimin insan ihtiyaçları açısından uygulamalarıdır. Temel biyolojik bilim

olarak mikrobiyoloji yaşamsal süreçleri izlemek için araçlar sunmaktadır. Hayatın kimyasal ve fiziksel temelini, en iyi şekilde anlaşılması mikroorganizmaların çalışılmasıyla elde edilmiştir. Mikrobiyal hücreler çok hücreli organizmaların hücreleri ile fazla sayıda ortak biyokimyasal özelliğe sahiptir. Mikrobiyoloji uygulamalı bir bilim olarak tıp, tarım ve endüstrideki önemli pratik problemlerle ilgilenir. Yine insanlar, hayvanlar ve bitkilerdeki birçok hastalıklar da bazı mikroorganizmalar tarafından oluşturulur. Mikroorganizmaların geçmişi bitki ve hayvanların ortaya çıkışından milyonlarca yıl öncesine dayanır. Bu nedenle mikroorganizmaların evrimsel çeşitliliği çok fazladır. Bu çeşitlilik sayesinde mikroorganizmalar farklı özellikler kazanmışlardır ve farklı ortamlarda yaşamaya adapte olmuşlardır (Ustaçelebi 1999).

Endüstriyel mikrobiyoloji, değerli ticari ürünleri üretmek veya önemli kimyasal reaksiyonları gerçekleştirmek amacıyla büyük miktarda mikroorganizmalardan faydalanır. Endüstriyel mikrobiyolojik prosesler, mikroorganizmaların normalde yapabildiği metabolik aktivitelerin birçok durumda ilgilenilen ürünün aşırı oranda üretimi maksadıyla geliştirilmiş şeklindedir. Endüstriyel mikroorganizmaların oluşturduğu reaksiyonları tanımlamak için biyokatalizör terimi kullanılır. Endüstriyel mikrobiyoloji, şarap ve bira yapımında olduğu gibi alkollü fermantasyon proseslerinden köken almıştır. Daha sonra ilaçların, gıda katkı maddelerinin, enzimlerin, sitrik asit ve bütanol gibi kimyasalların üretimi için mikrobiyal işlemler geliştirilmiştir. Endüstriyel mikroorganizmalar bir ve daha fazla ürünü yüksek verimde sentezleyebilen metabolik uzmanlardır. Bu yüksek verimi sağlamak için mikroorganizmalar mutasyon ya da rekombinasyonlar ile genetik olarak değişime uğratılabilir (Madigan and Martinko 2010).

Yararlı bir endüstriyel mikroorganizmanın özelliklerin başında mikroorganizmanın büyük ölçekli kültürde üreme ve ürün oluşturma yeteneğine sahip olması gerekmektedir. Bu organizma büyük fermentörlere kolayca inoküle edilebilmelidir. Büyük miktarda temin edilebilen ve pahalı olmayan sıvı kültür ortamında üreyebilme yeteneğine sahip olmalıdır. Bunun yanı sıra hızlı üremeli ve istenilen ürünü kısa zamanda üretmelidir. Özellikle insanlara ve ekonomik öneme sahip hayvan ve bitkilere

patojen olmamalıdır. Endüstriyel mikroorganizma genetik değişimlere imkân veren yapıda olmalıdır (Madigan and Martinko 2010).

Zirai açıdan pek çok tarım ürününün verimi mikrobiyal aktiviteye bağımlıdır. Örneğin baklagiller olarak bilinen bitki türü üyesi olan bazı ürün bitkileri kökleri üzerinde nodüller adı verilen yapıları oluşturan bakterilerle yakın iş birliğinde hayatlarını devam ettirirler. Kök nodüllerinde bu bakteriler atmosferik azotu ( $N_2$ ), bitkinin gelişmesi için kullandığı azota ( $NH_3$ ) dönüştürürler. Ayrıca mikroorganizmalar insan etkisiyle meydana getirilen çevresel atıkların temizlenmesinde de yardımcı olarak kullanılırlar. Petrol kirliliği, çözücüler, pestisitler gibi kirleticilerin parçalanmasında kullanılırlar (Madigan and Martinko 2010).

Bir besiyerinin bileşiminde vitaminler, proteinler, karbonhidratlar, mineral maddeler ve iz elementler gibi organik ve inorganik maddeler bulunur. Bütün mikroorganizmalar beslenme ve gelişimlerinde sadece suda çözünen maddeleri kullanabilirler. Duruma göre besiyerleri jelleştirici maddeler kullanılarak katı hale getirilir. En yaygın olarak kullanılan jelleştirici madde agardır. Kullanılan besiyerlerinin hemen hemen tümü hazır karışımlar halinde kuru besiyeri olarak bulunmaktadır. Bunlar saf su içerisinde eritildikten ve sterilize edildikten sonra kullanılırlar. Besiyeri hazırlanırken dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır. Bunlar; kuru besiyerinin eritilmesi, pH'nın ayarlanması, besiyerinin steril edilmesi, besiyerinin petri kaplarına dikkatlice dökülmesi ve besiyerinin kurutulması aşamalarıdır (Sekin 2004).

Besiyerleri kullanılan jelleştirici madde konsantrasyonuna göre katı besiyeri, yarı katı besiyeri ve sıvı besiyeri olarak üçe ayrılır. Katı besiyerleri %1'den daha fazla agar içeren besiyerleridir ve bu besiyerleri tek koloni oluşumunu sağlar. Mikroorganizma sayısı ve çeşidinin saptanması amacı ile kullanılan besiyerleridir. Yarı katı besiyerleri %1'den daha az miktarda agar içeren besiyerleridir. Bu besiyeri hareketli mikroorganizmaların tespitinde kullanılır. Sıvı besiyeri ile hızlı bir çoğalma ve mikroorganizmaların aktive edilmesinde kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar genellikle sıvı besiyerlerinde daha iyi gelişme şartlarına sahip olurlar (Sekin 2004).

Genel amaçlı besiyerleri çok sayıda mikroorganizmanın gelişimini sağlayacak besin maddesi içermektedir. Seçici ve zenginleştirici besiyerleri; sadece belirli mikroorganizmaların gelişmelerini sağlarlar. Eksik besin maddesi içeren besiyerleri ise gelişmenin yavaşlamasına dolayısı ile gelişen mikroorganizmalarda karakteristik eksiklik belirtilerine neden olmaktadır (Sekin 2004).

Bakteri ekiminde dört farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler; dökme plaka ekim, yayma plaka ekim, petri damlatma yöntemi ve petri film yöntemidir. Dökme plak yöntemi en güvenilir canlı mikroorganizmaların sayım yöntemidir. Birçok gıdanın mikrobiyolojik tanısında zorunlu olarak kullanılan yöntemdir. Yöntemin alt duyarlılık sınırı bir gram gıda örneği için yüz mikroorganizmadan daha düşüktür. Yayma plak yönteminde besiyerleri petrilere önceden dökülmüş ve hazır haldedir. Sıcaklıktan mikroorganizmalar zarar görmezler ayrıca bu yöntemde koloniler yüzeyde oluştuklarından dolayı başka testler içinde kullanılabilirler. Bu yöntemin dezavantajı mikroorganizmaların saptanabileceği alt sınırdan ortaya çıkmasıdır (Sekin 2004).

Mikroorganizmaların karakteristik özelliklerini inceleyebilmek için saf halde bulunmaları gerekir. Saf kültürler, izolasyon ve saf kültür yöntemleri ile elde edilirler. Bu yöntemler mikroorganizmaların karışık bir kültürden ayrıştırmasına dayanır ve saf kültürler bir hücreden yola çıkarak elde edilmeye çalışılır (Sekin 2004).

Biyoteknolojik çalışmalarda endüstriyel öneme sahip mikroorganizmalar kullanılmadığıdır. *Bacillus* cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri sebebiyle, bakteriler arasında dikkat çeken mikroorganizmalardandır (Ediz ve Beyatlı 2005).

*Bacillaceae* familyasının iki önemli cinsi bulunmaktadır. Bunlar *Bacillus* ve *Clostridium* cinsleridir. Bunlar DNA yapısındaki G+C oranlarına göre sınıflandırılır. *Bacillus*'lar rDNA dizilişlerine bakılarak 3 temel gruba ayrılmıştır. Bunlar *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus circulans*'tır (Demeli 2012).

*Bacillus*'lar Gram pozitif (+) olarak boyanırlar, vejetatif formları düz pürüzsüz 0.5-1.2 µm eninde 2.5-10 µm boyunda basil yapıdadırlar. Zorunlu aerobik veya fakultatif anaerobik bakterilerden meydana gelir. *Bacillus*'ların koloni yapıları besi yeri çeşidi yaşam süresi gibi dış faktörlerin etkisiyle değişebilir Tek tek veya uzun zincirler şeklinde görünürler. *Bacillus* türlerinin tamamı ısıya dayanıklıdır ve spor oluşturma kabiliyetine sahiptirler (Ustaçelebi 1999; Demeli 2012).

*Bacillus* türleri pek çok ortam özelliklerinde toprak, nehir, kıyı suları gibi su kaynakları ve bitkilerinde bulunduğu koşullarda yoğunlaşan mikroorganizmalardır. *Bacillus* türlerinin çoğu hayvan ve insanlar için zararsız olmakla birlikte birkaç patojen türü vardır. Patojen türler gıda ihtiyacı bakımından oldukça hassas olup özel büyüme ortamlarına gereksinimleri vardır. Metabolik değişkenlikleri, önemli genetiksel farklılıklardan ortaya çıkmaktadır. DNA'nın G-C oranı %33-67 arasında değişmektedir (Ustaçelebi 1999).

*Bacillus anthracis* ve *Bacillus cereus* dışındaki türleri insan ve hayvanlarda hastalık yapmamaktadır. *Bacillus* türlerinin ısıya, ışına ve dezenfektanlara dirençli sporların oluşması tıp alanında büyük sorunlar oluşturmaktadır. Bunların yanında *Bacillus* türlerini, klinik açıdan pek çok yararları da vardır. Antibiyotik ve organik maddelerle yapılan deneylerde ve ameliyathane malzemelerinin sterilizasyonunun kontrolünde kullanılır (Ustaçelebi 1999).

*Bacillus amyloliquefaciens* genelde  $\alpha$ -amilaz ve proteaz sentezinde görev alan mikroorganizmadır. *Bacillus subtilis*'e benzediği için belli bir dönem alt tür olarak görülmüştür. Fenotipik özellikleri bakımından *Bacillus subtilis*'e çok benzediğinden sadece klasik testler ile bunları birbirinden ayırt etmek mümkün değildir. Gram (+) ve çubuk şeklinde yapıya sahiptir. Enleri 0.7-0.9 mm boyları 1.8-3mm'dir. 15°C altında ve 50°C'den fazla sıcaklıklarda üreyemezler. Optimum üreme sıcaklıkları 30-40°C arasındadır (Selen 2006).



*Bacillus pumilus* türü simbiyotik bir bakteridir. Özellikle bitki gelişiminde rol oynamakla birlikte; klinikte (insan yüz ve kalın bağırsağında), evcil hayvanlarda, besinlerde ve sporları doğada (toprak ve bitkilerde) yayılış gösterir. Gram pozitif, peritrik flagellalı, hareketli ve çubuk şeklinde, sporlu ve koloni morfolojisi değişkendir (bükülmüş veya düzensiz). Pigmentleşme yok ve çoğu opaktır. Nutrient agarda düz ve hafif sarımsı renkte ürerler. Koyun kanlı agarda hemoliz oluşturmazlar. Aerobik olup, pH 5.7-9.5, bazıları pH 4.5 da ürerler. NaCl toleransları % 0-10 dur. Büyüme sıcaklığı 5-15 °C ve 40-50 °C'dir. Geniş bir yayılışa sahiptirler, sporları doğada (toprak, bitkiler) yaygın olup klinik vakalardan ve evcil hayvanlardan kolaylıkla izole edilir (Erbey 2015).

*Bacillus safensis*, Gram (+), mezofilik, aerobik ve kemo-heterotrofik bir bakteridir. Yüksek tuz toleranslı ve çubuk şeklindedir. Geniş habitat alanlarında kolonileşirler. Bunlardan bazıları; Tuzlu çöl, endüstriyel atık su, kirlili petrol bölgesi, rizosfer, bağırsaklar, bitki vücudu, insan ve hayvan dışkıları ve topraktan izole edilirler (Lateef and Adelere 2015)

Mikroorganizmaların isimlendirilmelerinde, Carl Von Linne'nin geliştirdiği binomal isimlendirme sistemi ilk olarak 1853-1977 arası Cohn'nun yürüttüğü çalışmalarda kullanılmıştır. Mikroorganizmaya verilen 1. isim cins ismi olup büyük harfle başlamaktadır. 2. isim ise tür ismi olup baş harfi de küçük yazılmaktadır. Mikroorganizma isimlerinin italik harflerle olması, örneğin *Lactococcus lactis* gibi, tüm biyolojik bilimlerde olduğu gibi mikrobiyolojinin de bir kuralıdır. Genel bir kural olarak cins ismi daha fazla mikroorganizmanın şekli veya formuyla ilgilidir (Tunail 2009).

Mikroorganizmaların sınıflandırmaları; en küçük (sınırları dar) birimlerin kendilerini içine alacak birimler içinde düzenlenmeleri, onlarında daha büyük birimler içine yerleştirilmeleridir. En küçük birim suşların oluşturduğu türdür. Aynı türün bireylerine suş denir. Suşlar kendi aralarında tür özellikleri değişmeksizin birey farklılıkları gösterir. Türler alt türleri, alt türler varyeteleri içine alsa da her türün alt tür ve varyetesi bulunmaz, ama her türde sayısız suş bulunur. Aynı türün farklı kaynaklardan izole

edilen kültürleri farklı suşlar olarak kabul edilir. Türler kendisinden daha büyük bir birim olan cins içinde, cinsler familya içinde yer alırlar. Bu gruplandırma daha büyük taksonlara doğru (takım, sınıf, bölüm, alem ve süper alem) ilerler (Tunail 2009).

Nükleik asitler ve proteinlerin incelenmesi taksonomiye büyük fayda sağlamıştır. Bu moleküller ya doğrudan gen ya da genlerin ürünleri olduklarından canlılar arasındaki gerçek benzerlik hakkında önemli bilgiler verirler (Ünal 2012).

DNA dizi analizde, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlamıştır. Herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesine paralel olarak DNA dizi analizi yöntemleri de gelişme göstermiştir. (Zülal 2001).

Filogenetik (filetik) sınıflandırmada, genel benzerliklerden ziyade mikroorganizmaların akrabalıkları evrimsel ilişkilere dayandırılarak incelemektedir. Zaman içinde filetik sınıflandırmada kullanılan; morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal parametrelerin evrimsel gelişmeler için belirleyici olmadığı, buna karşılık moleküler karakteristiklerin özellikle rRNA moleküllerinin ve bunları determine eden genlerin en iyi evrimsel göstergeler olduğu anlaşılmıştır. Ribozomlar protein sentezlerinin yapıldığı yerler olup bütün hücrelerde mevcuttur. Hücre için çok önemli fonksiyonu yerine getirdiklerinden çok iyi korunmuş gen ürünleridir. Özellikle rRNA sekansları ne genetik kod dejenerasyonları gösterir, ne de mutasyonlar ile fazlaca değişime uğramıştır. rRNA moleküllerini determine eden genlerin evrimsel süreçte çok yavaş bir değişime uğradıkları, mutasyonların en az düzeyde olduğu görüşü hâkimdir. O nedenle tüm talepleri karşılayan bu filogenetik markır Carl Woese tarafından çok kullanılmış ve prokaryotların filogenetik ağaçları ortaya koymuştur (Tunail 2009).

16S rRNA baz dizileri belirlenen ve bir bilgisayar yardımıyla kıyaslanan bütün bakterilerde, birbirinin tamamen aynı korunmuş sekanslar görülmüştür, ama bunlar ökaryotların ve diğer bazı bakterileri gruplarının eş değer sekanslarından belirgin olarak ayrılmaktadır. Diğer oligonükleotit fragmanlarında cinsten cinse veya türden türe farklı

diziler bulunmaktadır. Bu diziler imza dizileri (parmak izleri) olarak adlandırılır. 16S rRNA'ya dayalı analizlerde; fragman analizlerinden ziyade molekülün tamamında sekans belirlenmesi daha iyi sonuç alınmasını sağlar. Ayrıca sekans analizleri tür seviyesinin üstündeki gruplandırma çok daha iyi sonuçlar verir. Tür düzeyi için bazen DNA benzerliklerinin saptanması tercih edilmektedir (Tunail 2009).

Peynir, dayanıklı olmasının yanında besin değeri ve toplumun gelişen damak zevki ve isteklerine yanıt verebilecek çok sayıda çeşidiyle önemli bir süt ürünüdür. Tüm dünyada sevilerek tüketilen ve yüzlerce çeşidi bulunan peynirin mikrobiyolojik kalitesi oldukça önemlidir. Peynirde oluşum sürecinde etkili olduğu bilinen mikroorganizmaların bu olumlu etkisinin dışında peynirin yapısında değişime neden olacağı ve böylelikle çokça tüketilmesinden kaynaklanan gıda zehirlenmelerine de yol açtığı bilmektedir. Üretimden tüketime kadar geçen tüm aşamalarda, hijyenik koşullara uyulmasının peynirin mikrobiyolojik kalitesine etkili olduğu belirlenmiştir (Kaynar 2011).

Bu çalışmada karbon ve azot kaynakları bakımından oldukça zengin olan, ayrıca yoğun şekilde iyon içeren bir ortam olarak peynirden izole edilen endüstriyel öneme sahip olan *Bacillus* türlerinin tanılanması amaçlanmıştır. Morfolojik ve biyokimyasal tanılama yanı sıra 16S rRNA'ya dayalı moleküler tanılama ve bölüm kültür koleksiyonuna destek verilmesi hedeflenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

*Zea mays* bitkisinden Endofitik ve ksilanolitik *Bacillus pumilus* suşlarının izolasyonu konulu bir çalışmada bu bitkinin gövde ve yapraklarından bakteri izole edilmiştir. İzolatlar *Bacillus pumilus* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlardan maksimum ksilanaz aktivitesi bulunmuştur (Yaşınok vd 2008).

Bingöl'deki kaplıcalardan izolasyonu yapılan *Bacillus cereus* (KG5) bakterisinin endüstride geniş bir etki gösterdiği ekstraselüler proteaz enziminin üzerinde Ahmetoğlu (2011) bir çalışma yapmıştır. Çalışmanın sonucuna göre *Bacillus* türleri aracılığı ile sentezlenen proteaz enzimi, temizlik ürünlerine katkı maddesi olarak ilave edilebilir ve sıcak su ile daha aktif temizlik sağlayacak yıkama imkânına olanak sağlar.

Başkurt (2012) Türkiye'nin 15 farklı ilinden gelen örnekler ile yapmış olduğu çalışmada, 60 adet bakteri izole etmiştir. Amilaz pozitif çıkan ve R oranı en yüksek 4 adet bakterinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri araştırılmış ve bunların hepsinin *Bacillus* cinsine ait olduğunu bulmuştur. Bu bakterilerin enzim üretme kapasitelerine bakılmıştır. Bunların arasında en yüksek olan bir suşu seçmiştir. Bu suşla amilaz üretimini etkileyen bazı fiziksel faktörlerin etkisi araştırmıştır.

Tepe ve Dursun (2012) *Bacillus pumilus* ile ekzo pektinaz üretiminde ortam pH'sının etkisi konulu bir çalışma yapmışlardır. *Bacillus pumilus* ile pektinaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kesikli sistemde ortam pH' ının ekzo pektinaz üretimine etkileri incelemişler ve optimum pH belirlemişlerdir.

Giresun adasından alınan toprak numuneleri ile yapılan çalışmada. Bazı *Bacillus*'ların izolasyonu yapılmış. Suşların biyokimyasal, morfolojik ve moleküler yönden tanımlanmıştır. Belirlenen *Bacillus*'larda bir kaç ekstraselüler enzimin varlığı kalitatif yöntemlerle incelenmiştir. *Bacillus* izolasyonların bakterilere yönelik antibakteriyal aktiviteleri agar difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak 38 suş *Bacillus*

*cereus* türü, 7 suş *Bacillus thuringiensis* ait, 10 suş *Bacillus megaterium* ait, 6 izolat *B. pumilus*'a ve 12 suş *Bacillus* spp. olarak belirlenmiştir (Katı vd 2016).

Antimikrobiyal aktiviteye sahip termofilik bakterilerin 16S rRNA analizi ile tanılanması konulu çalışmada, Aydın ve Denizli çevresindeki sıcak su kaynaklarından ve topraklarından alınan örneklerden izole edilen ve antimikrobiyal etkiye sahip izolatları kullanılmıştır. İzolatları 16S rRNA sekans analizi yaparak tanılamasını gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda da 7 izolattan bir tanesi *Geobacillus thermoglucosidarius*, iki tanesi *Geobacillus pallidus*, iki tanesi *Geobacillus toebii*, bir tanesi *Anoxybacillus flavithermus* ve bir tanesi de *Anoxybacillus kestanboliensis* ile homolog olarak saptamıştır (Başbülbül vd 2017)

Barış (2009) Erzurum ilinde yürüttüğü bir çalışmada, 2 mağaradan damla taşı örnekleri kullanmıştır. Mikroorganizmaların izolasyonu, karakterizasyonu için morfolojik testler kullanmıştır. Çalışmanın sonucunda *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* izolatlarını tanımlamıştır.

Usta (2012) Türkiye'nin farklı illerinden alınan toprak numuneleri ile yapılan bir çalışmada, 57 bakteri izole etmiştir. İzolatlar morfolojik ve fizyolojik özellikleri aratırması ve 52 tanesinin *Bacillus* türü olduğunu tespit etmiş. Karşıt-çizgi metodu ile antibiyotik üretimi için taramıştır. Çalışmanın sonucunda 25 *Bacillus* suşunun kullanılan test mikroorganizmaları üzerinde etkili olduğunu tespit etmiştir.

Tewari *et al.* (2012) *Bacillus cereus*un izolasyonu ve identifikasyonu için yeni bir kromojenik ortam ile standart ortamın karşılaştırılması konusunda bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, etten izole edilen *Bacillus cereus*'un PCR ile doğrulanan 29 izolatının standart besi yerleri ile yeni kromojenik besi yerinin karşılaştırması yapmışlardır. Sonucunda *B. cereus*'un teşhisinde kullanılan kromojenik besi yeri, konvansiyonel besi yerine göre iyi bir seçenek olarak görmemişlerdir. Ancak bakteri sayımının yapılmasında, standart besi yerine göre daha üstün olduğu belirlemişlerdir.

Karın kaymağı peynirinden izole edilen laktobasillerin tanımlanması konulu bir çalışmada, bazı kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerin teşhisi yapılmıştır. Bu peynirden izolasyonu yapılan 107 çeşit izolatın API 50 CHL kiti yardımı ile tanımlanması gerçekleştirilmiştir (Turgut vd 2012).

Arslan vd (2013) 13 değişik ekmeklik un örneklerinden yapılan çalışmada, *Bacillus* türlerini izole etmişlerdir. İzolatların sünmeyi etkileyip etkilemedikleri ve bu izole edilen izolatların üzerine probiyotik özelliği olan *Lactobacillus rhamnosus*'un inhibitör etkisini araştırmışlardır. İzolatların inhibisyon etkisi in vitro olarak *L. rhamnosus*'a ait 24 ve 48 saatlik hücre ve kültür üst sıvısında, agar difüzyon ve sıvı ortamda incelemişlerdir. Sonuç olarak *L. rhamnosus*'un rope etkeni olan *Bacillus* spp. üzerine inhibisyon etkisi agar difüzyon, sıvı ortamda ve hamurda gözlemlemişlerdir. Böylece insan sağlığına zararlı kimyasal koruyucuların yerine, insan sağlığına yararlı probiyotik biyokoruyucuların kullanabileceğini ifade etmişlerdir.

Fındık ve tahıl ambarlarından toplanan örneklerden 26 izolat elde edilmiştir. Toksin kombinasyonlu *Bacillus* türlerini izole etmeyi hedeflenmiştir. İzolatları kolonyal ve hücresel özellikleri ışık mikroskopuyla, fizyolojik özellikleri genel testler ile biyokimyasal özellikleri ise API kitleri kullanılarak tespit edilmiş. Moleküler karakterizasyonları için ise 16S rDNA baz dizileri ve cry gen içerikleri belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda *Bacillus thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. atrophaeus*, *B. megaterium* ve *Lysinibacillus sphaericus* türleri tespit etmişler ve ayrıca lepidopteran depo zararlıları ile mücadelede etkili bir kontrol ajanı olabileceği belirtmiştir (Demeli 2012).

Erzurum Pasinler kaplıcasından alınan örneklerden yapılan bir çalışmada, termofilik bakterilerin genotipik ve fenotipik karakterizasyonunu belirlemek için yapılmıştır. Bu amaçla yağ asidi, BOX PCR profillemeye metodları ve 16S rDNA dizileme verileri kullanılmıştır. Sonucunda 5 tane *Bacillus licheniformis* ve 5 tane *Aeribacillus pallidus* tespit edilmiştir (Adıgüzel vd 2009).

Bingöl'deki kaplıcalardan izolasyonu yapılan *Bacillus cereus* (KG5) bakterisinin endüstride geniş bir etki gösterdiği ekstraselüler proteaz enziminin üzerinde Ahmetoğlu (2011) bir çalışma yapmıştır. Çalışmanın sonucuna göre *Bacillus* türleri aracılığı ile sentezlenen proteaz enzimi, temizlik ürünlerine katkı maddesi olarak ilave edilebilir ve sıcak su ile daha aktif temizlik sağlayacak yıkama imkânına olanak sağlar.

Aygün (2012) Bazı *Bacillus* izolatlarının 16S rDNA bölgelerinin moleküler ve biyoinformatik karakterizasyonu konulu çalışmasında, sınıflandırma yapılırken morfolojik ve biyokimyasal verilerin moleküler verilerle desteklenmesi gerektiğini vurgulamıştır. Morfolojik ve biyokimyasal yöntemlere göre cins ve tür bakımından teşhisi ve *Bacillus* izolatlarının 16S rDNA bölgelerinin sekans analizleri ile değerlendirmiştir.

Sarıgöl (2007) Ege bölgesindeki çeşitli sıcak su kaynaklarından *Thermus genusu* bakterilerin izolasyonu, moleküler yöntemlerle identifikasyonu ve  $\beta$ -galasidaz aktivitesinin saptanması konulu çalışmasında; Ege bölgesindeki 6 ilden 11 sıcak su kaynağından 32 örnekle çalışmıştır. Elde edilen izolatların akrabalık ve biyoçeşitlilik çalışmaları için 16S rRNA sekans sonuçları kullanmıştır. Çalışmanın Mega 3.1 programı ile neighbor joining methoda göre filogenetik dendogramlarını oluşturmuştur.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmadaki peynir örnekleri (beyaz peynir, lor peyniri ve kaşar peyniri) peynir üretim bakımından yoğun olan Kırklareli ilinden temin edilmiştir.

##### 3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Nutrient agar (Oxoid), Proteinaz K (Merck), Tris - HCl (Merck), NaCl (Merck), Ethanol (Merck), 1XTAE (Sigma), 20X Dimetil sülfoksit (Sigma), 10 x PCR tamponu: (Sigma), dNTPs (Sigma), *Taq* DNA polimeraz (Sigma), Agaroz (Sigma), Jel Red (Sigma).

##### 3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında kullanılan alet ve cihazlar:

İnkübatör (Wisecube, KOREA)

Otoklav (Wiseclave Wac-47, KOREA)

Mikroskop (Bresser, GERMANY)

Steril Kabin (Safefast Classic 212 359, SINGAPORE)

Çalkalayıcı (Shimadzu, PHILIPPINES)

Manyetik Karıştırıcı (Heidolph, GERMANY)

pH Metre (Ohaus Starter3000, USA)

Derin Dondurucu (Nuair -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)

Hassas Terazî (Shimadzu, JAPAN)

Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE)

Su Banyosu (Mettler WNB14, GERMANY)

Mikrodalga Fırın (Arçelik, TÜRKİYE)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)



Vorteks (Wisemix Vm-10, KOREA)

Santrifüj (Therma Mr23 İ, GERMANY)

Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)

Elektroforez Akım Sağlayıcı (Biometra Pack P25, GERMANY)

Jel Görüntüleme Sistemi (Biorad Gel Doc 2000, ITALY)

PCR Cihazı (Thermo Cyclers Block, GERMANY)

DNA İzolasyon Robotu (Qiacube, GERMANY)

### 3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

Bakteri DNA izolasyonu robot kiti (Qiagen).

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

Çalışma boyunca kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışları aşağıda verilmiştir:

**Nutrient agar (Oxoid):** 1 L saf su içerisine 28 g nutrient agar (Oxoid) karışımı ilave edildi. Hazırlanan besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı.

**Nutrient broth (NB)** 1 L saf su içerisine 13 g nutrient broth içeriği (Oxoid) eklendi. Besiyeri otoklavda steril edildi.

**Stok Besiyeri:** 0,65 g nutrient broth karışımına 36 ml gliserol eklendikten sonra son hacim 100ml olana kadar saf su ilave edildi. Magnetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri, otoklavda steril edildi. Aseptik olarak steril 2 ml'lik steril eppendorf tüplerine 1,2 ml konularak hazırlandı (Sahin vd 2006).

**Proteinaz K:** Kit içerisinde hazır bir şekilde gelen proteinaz K'dan 200 µl alınarak steril eppendorf tüplere konuldu. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında bekletildi.

**5 M NaCl çözeltisi:** 29,22 g NaCl'ün (Merck) 100 ml saf su içerisinde homojen bir şekilde çözülmesiyle hazırlandı. Otoklavda yüksek basınçta steril edildi.

**%70'lik Etil alkol:** 70 ml saf etil alkolün üzerine hacmi 100 ml oluncaya kadar saf su eklendi. -20°C'de muhafaza edildi.

**20X Dimetil sülfoksit (DMSO):** %100'lük DMSO (Sigma) 2ml'lik steril eppendorf tüplere alınarak, kullanılıncaya kadar oda ısısında bekletildi.

**1XTAE Tamponu:** 100 ml 10XTAE'nin (Sigma) hacmi steril distile su ile 1 L oluncaya kadar tamamlandı.

**6X yükleme tamponu:** 100 ml yükleme tamponu için %100'lük gliserolden (Sigma-G9012) 40 ml alınarak, 0,1 g bromfenol blue (Sigma) ile karıştırıldı ve hacmi 1x TAE 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon amber şişe içerisinde güneş alması engellenerek, +4°C'de korundu.

**10 x PCR tamponu:** (Sigma) (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, %0,01 jelatin pH: 8,3) *Taq* DNA polimeraz ile birlikte gelmektedir.

**dNTPs (Sigma):** (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10 mM)

**Primerler:** 27F - 1492R primer seti MgCl<sub>2</sub> (Sigma-M1028): 1M olan hazır çözelti 25 mM olacak şekilde steril saf su ile sulandırıldı.

***Taq* DNA polimeraz (Sigma)**

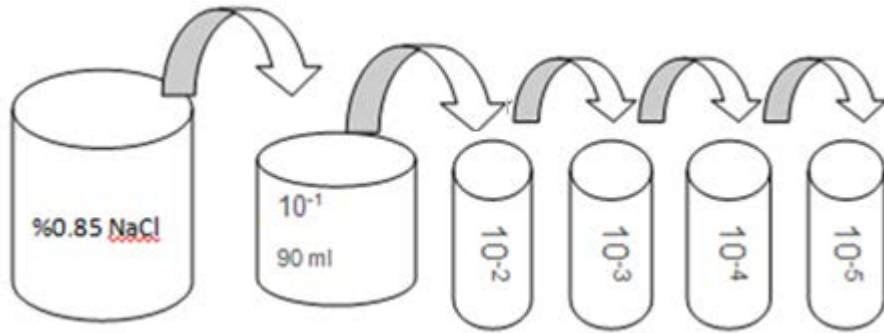
**DNA markır (Sigma):** 1 kb'lık DNA marker.

**Agaroz (Sigma-A5093)**

**Primer çalışma konsantrasyonu:** Ticari olarak liyofilize halde alınan primerler kullanma kılavuzunda yazılan protokol doğrultusunda çözülerek ( $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ ) formülü uygulanarak son konsantrasyonu 50  $\mu$ M olacak şekilde hazırlandı.

### 3.2.2. Kaynaktan örneklerin alınması ve bakterilerin izolasyonu

Çalışmada; Kırklareli'nden gelen peynir örneği steril torbalara alınarak çalışma yapılıncaya kadar buzdolabında saklandı. 1 g örnek 90 ml steril %0.85'lik tuzlu su içerisinde nazikçe homojenize edildi. Daha sonra Şekil 3.1'de gösterildiği gibi tüplere aktarıldı. Hazırlanan dilüsyonlardan ( $10^{-3}$ - $10^{-5}$ )her birinden üç paralel olmak üzere nutrient agar besiyerine yayma tekniği kullanarak ekildi. 32°C'lik etüv'de 3 gün boyunca inkübe edildi. 3 günün sonunda besiyerinde gelişen bakterilerden en iyi gelişmiş tek koloniler seçilerek taze besi yerlerine aktarılarak stok kültürleri hazırlandı ve -80 derecede saklandı.



**Şekil 3.1.** Dilüsyon hazırlanmış şeması

### 3.2.3. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi

Bakterilerin bireysel morfolojileri boyutlarının çok küçük olmaları nedeniyle ancak mikroskoplar ile saptanabilir. Bu amaçla, uygun sıvı veya katı ortamlarda saf olarak üretilen bakterilerden hazırlanan preparatlar spesifik boyalarla boyanarak incelenirler. Mikroskop altında, bakterilerin yapıları (kokoid, çomak, virgül, spiral, pleomorfik, vs.), boyutları, spor durumu (var veya yok, varsa terminal, subterminal, sentral, lateral), boyanma özelliği, endospor varlığı gibi incelemeler yapılmaktadır (Arda 2000; Harley and Prescott 2002).

**a. Hücre morfolojisinin belirlenmesi:** Her bir izolat kristal violet ile boyanarak hücre yapıları kaydedildi (Temiz 2000; Harley and Prescott 2002).

**b. Hücre boyutlarının belirlenmesi:** Basit veya negatif boyama işlemi yapılan preparatlardaki izolatların immersiyon objektifinde oküler mikrometre yardımı ile hücre boyutları hesaplandı (Leloğlu ve Erdoğan 1979; Temiz 2000).

**c. Gram özelliklerinin belirlenmesi:** Bakteri izolatlarının hücre duvarlarındaki farklılığın belirlenmesi için yapılmıştır. Bu amaçla iki farklı yöntem kullanılabilir.

Bu metodlardan birincisi; lam üzerine, %3'lük KOH çözeltisinden bir iki damla konulur. Daha sonra öze ile alınan bakteri KOH çözeltisi ile 5–10 saniye karıştırıldıktan sonra öze yukarıya doğru kaldırılır. Mikroorganizma Gram (-) özellikte ise hücre duvarındaki peptidoglikan tabakası az tabakalı olup, teikoik asit içermediğinden KOH ile kolayca parçalanır, sitoplazma ve hücre içeriği serbest hale geçer. Bunun sonucunda da viskoz bir uzama görülür. Hücre duvarı özelliği Gram (+) olan bakterilerde ise KOH-bakteri karışımı sulu bir sıvı halindedir ve öze yukarı doğru kaldırıldığında uzama gözlenmez (Barış 2009).

Lam üzerine bir damla saf su aktarılır ve daha sonra üzerine besiyerinde 24 saat geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu alınarak iyice yayılır. Ateşten geçirilerek fikse edilir. İlk olarak kristal viyoleto boyası ile 1 dk muamele edilir ve saf su ile 30 sn yıkanır, ardından lügol ile 1 dk muamele edilir ve %96'lık etil alkol ile yıkanır. Tekrar saf sudan geçirilerek son kez safranin boyası uygulanır. Preparat yıkanıp kurutulur. Mikroskop altında incelenir. Gram (+) bakteriler mor renkte iken, Gram (-) bakteriler pembe görünüme sahiptir (Tarakçioğlu 2016)

#### **3.2.4. Kültür özelliklerinin belirlenmesi**

Bakterilerin kültürel özelliklerini belirlemede, bunların katı ve sıvı ortamlardaki saf kültürleri kullanıldı.

İzolatlar katı besiyerlerine nokta veya çizgi ekim şeklinde ekilerek, koloni meydana getirmeleri beklendi, koloni morfolojisi, mikroskopla incelenerek üstten görünüşleri, yüksekliği, kenar şekilleri ve rengi belirlendi (Barış 2009).

Bakteriler sıvı besiyerlerinde üstte pellicül, dipte tortu, veya granüllü bir üreme gösterebilmektedir. İzolatlar nutrient broth içeren tüplere ekilerek sıvı besiyerlerinde kültür özellikleri tespit edildi (Arda 2000).

#### **3.2.5. Katalaz testi**

Elde edilen izolatların katalaz enzimine sahip olup olmadıkları bu testle belirlenmiştir. Aerobik solunum yapan veya fakültatif olan mikroorganizmalarda bu enzim vardır. Katalaz enzimi, solunum sonucunda meydana gelen hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) ve oksijen gazına dönüştürmektedir. Bu amaçla test için 48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu alınıp, üzerine 1 damla %5'lik  $H_2O_2$  ilave edildi. Kabarcık oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Barış 2009).

### 3.2.6. İzolatların DNA izolasyonu

İzolatların DNA'ları bakteri DNA izolasyon kiti (Qiagenden uyarlanan protokol) kullanılarak gerçekleştirildi.

Bu aşamalar;

- 1- Nutrient agarlarda geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu toplanarak steril eppendorf tüplerine alındı.
- 2- Toplanan tüplere 200µl Lizozim + trisHCL çözeltisi eklendi.
- 3- Bu karışım güzelce vorteks edilerek homojen bir çözünme olması sağlandı.
- 4- Vorteks'lenen karışımlar 45 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bu sürede her 15 dakikada bir vorteks yapıldı.
- 5- İnkübasyon sonunda örnekler 12000rpm'de 5 dakika 24°C'de santrifüj edildi.
- 6- Santrifüjlenen örnekler sıvı kısmı dökülerek cidara yapışan pelet kısım bırakıldı.
- 7- Örnekler robotun bölümlerine dizilerek izolasyon başlatıldı.

### 3.2.7. 16S rRNA bölgesinin PCR yardımı ile çoğaltılması:

Bakterilerin sistematığı açısından önemli olan 16S rRNA'nın sentezlendiği bölge seçildi ve evrensel primerler (27F forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3', 1492R reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3') kullanılarak PCR cihazında çoğaltıldı.

PCR reaksiyonun hazırlanması: 30 µl'lik reaksiyon; 3 µl 10 x PCR tamponu, 0,6 µl dNTPs, 0,3 µl 50 µM primer, 0,3 µl 50 µM primer, 1,2 µl DMSO, 1,8 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz ve 21,5 µl steril saf su ile 29 µl'lık reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışıma son olarak 1 µl kalıp DNA eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlandı (Barış 2009).

PCR programı: PCR reaksiyonu hazırlanan örnekler, 95°C’de 2 dakika denatürasyon, bunu takiben 40 döngü olacak şekilde 94°C’de 1 dakika denatürasyon, 53°C’de 1 dakika bağlanma ve 72°C’de 2 dakika uzama basamakları ve son olarak 72°C’de 5 dakika uzama basamağından oluşacak şekilde program hazırlandı (Barış 2009).

16S rDNA PCR ürünlerinin elektroforezi: 0.6 gr agaroz üzerine 50 ml 1XTAE tamponu ilave edildi. Elde edilen karışım mikrodalga fırında şeffaf bir görünüm alınca kadar kaynatıldı. 50°C’ye veya el yakmayacak kadar soğutulan agaroz jele 0,6 µl jel red kimyasalı eklenerek, içerisine tarakların yerleştirildiği elektroforez jel küvetine döküldü. Belli bir süre beklenerek donduğu anlaşılan jelden taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı. 1XTAE tamponu jel yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk kuyucuğa, DNA marker ve diğer kuyulaara örnekler yüklendi. (Barış 2009).

Elektroforez jel düzeneği; 90 volt akımda 60 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, UV ışık sistemi altında görüntüledi ve bilgisayar ortamında analiz edildi (Barış 2009).

### **3.2.8. DNA dizi analizlerinin alınması ve sonuçların değerlendirilmesi**

Sekans analizi sonuçları BioEdit ile analiz edilerek Fasta formatına çevrildi. Primerler bulunup öncesindeki kısımlar çıkarıldı. Daha sonra aradaki her iki taraftan okunan kısım kontrol edilerek düzenlendi ve NCBI veri bankasında sekans sonuçları karşılaştırıldı.

### **3.2.9. Filogenetik analiz**

Elde edilen sekans dizileri birlikte ClustalW versiyon 7 programı kullanılarak hizalanması gerçekleştirildi. Hizalanmış dizilerden MEGA versiyon 7.0 yazılımında “Maximum Likelihood Tree” yöntemi ve “Tamura-Nei Model” düzeltilmesi kullanılarak

filogenetik ağaç oluşturuldu. Ağacın güvenilirliği “Bootstrap” analizi ile (1000 tekrar) test edildi (Sarıgül 2007).





## **4. ARAŞTIRMA BULGULARI**

### **4.1. Peynir rneklerinden Bakteri İzolasyonu Sonuçları**

Çalışma için Kırklareli ilinden gelen peynirden 10 bakteri izole edilmiştir. ÇalıŐmaya seçilen 3 *Bacillus* türü ile devam edilmiştir.

### **4.2. Kullanılan Mikroorganizmaların Morfolojik ve Biyokimyasal zellikleri**

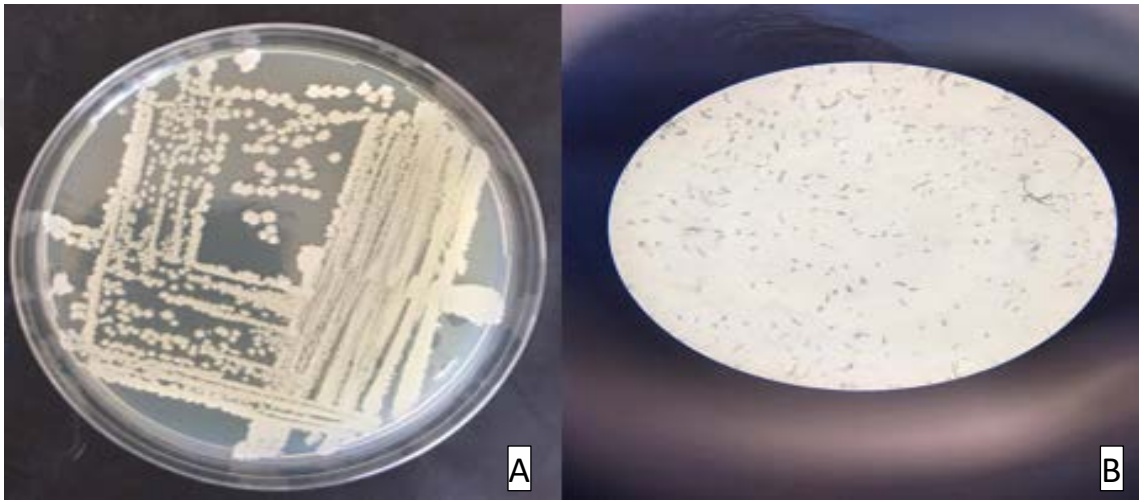
Seçilen 3 izolatın bazı morfolojik özellikleri incelenmiştir. Bunlar boyutları, endospor oluŐturup-oluŐturmama, hareketli olup-olmadığı, Gram zellikleri ve katalaz testi sonuçları tespit edilmiştir. Bu izolatların morfolojik özellikleri ile ilgili sonuçlar izelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Peynir örneklerinden izole edilen bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

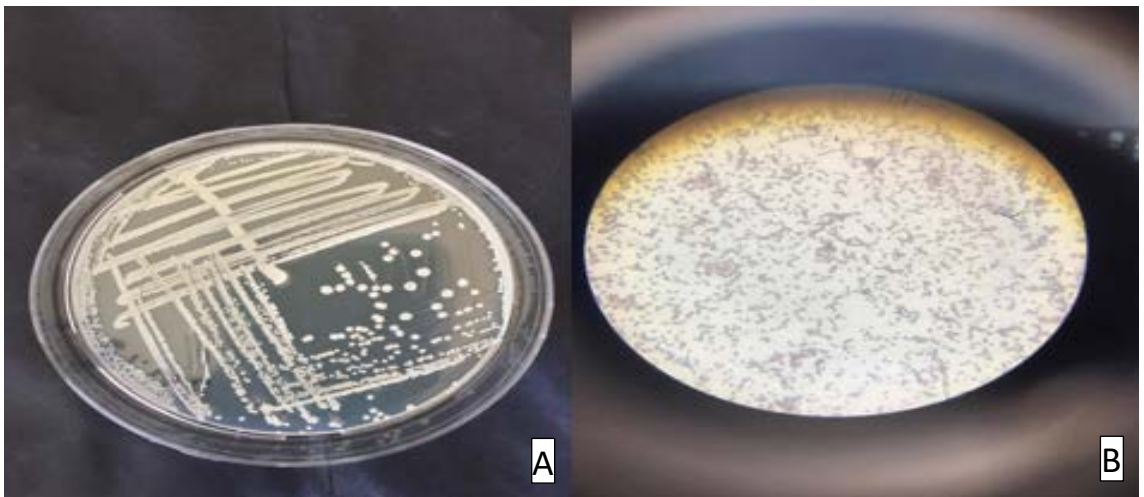
İzolatin Kodu	Tanı Sonucu	Hücre Morfolojisi	Boyutları		Endospor Durumu	Hareket	Gram Özellikleri		Katalaz Testi
			Çapı $\mu\text{m}$	Boyutu $\mu\text{m}$			KOH	Gram Boyama	
3n17-3	<i>Bacillus pumilus</i>	Çubuk	0.5-0.6	2	+	+	+	+	+
8n17-1	<i>Bacillus safensis</i>	Çubuk	0.5-0.6	1.0-1.2	+	+	+	+	+
3n-20	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Çubuk	0.5-0.7	1.0-1.2	+	+	+	+	+

### 4.3. Kültür zelliklerinin Belirlenmesi

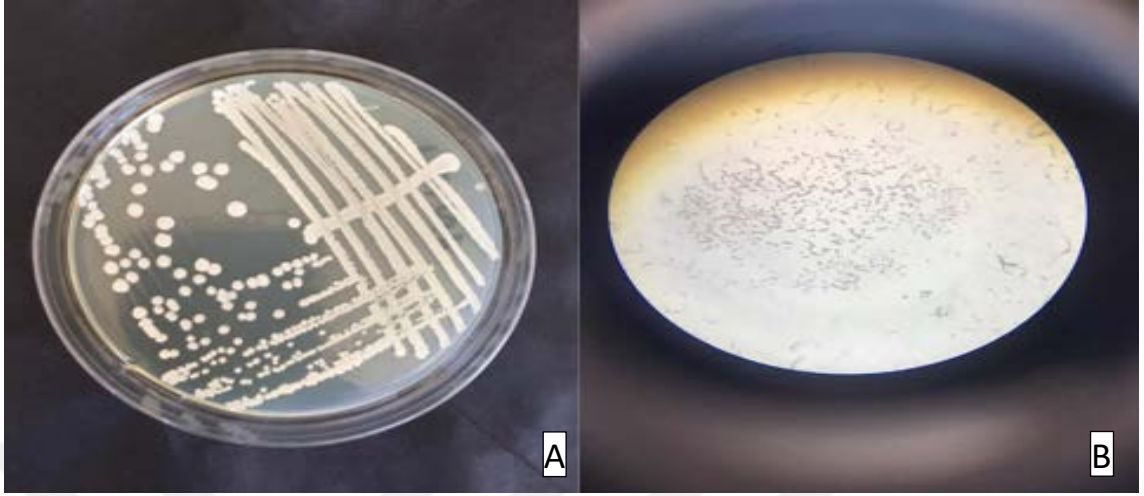
Peynir örneklerinden bakterilerin kültürel özelliklerini incelemeye, bunların katı (Nutrient agar) ve her bir izolatın olgun koloni oluşturduğu sürede sonuçlar alınmıştır. İzolatların kültür özellikleri ile ilgili sonuçları izelge 4.2’de detayları ile verilmiştir. Ayrıca koloni ve hücre morfolojisi Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’te gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** *Bacillus pumilus* (3n17-3)  
\*A. Petri görüntüsü B. Hücre morfolojisi (10\*40)



**Şekil 4.2.** *Bacillus safensis* (3n20)  
\*A. Petri görüntüsü B. Hücre morfolojisi 10\*40



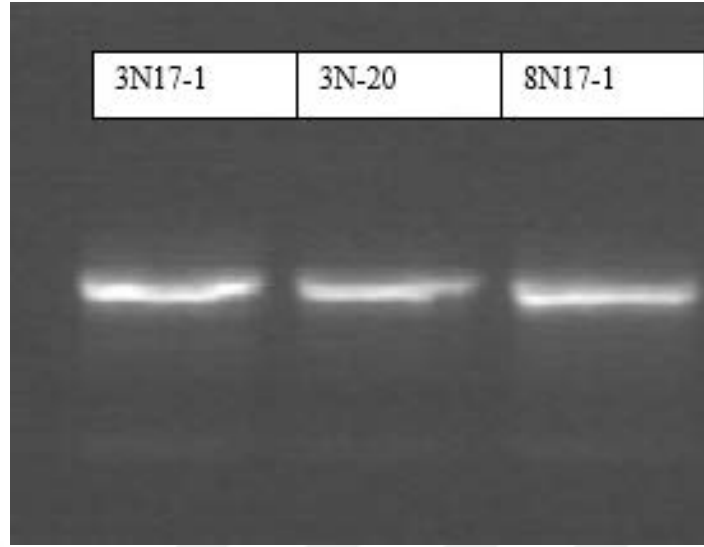
**Şekil 4.3.** *Bacillus amyloliquefaciens* (8 n17-1)  
\*A. Petri görüntüsü B. Hücre morfolojisi 10\*40

**Çizelge 4.2.** Peynir numunelerinden izole edilen bakterilerin katı kültür özellikleri

İzolatin kodu	İzolasyon Sonucu	Koloni Şekli	Koloni Rengi	Koloni kıvamı
3n17-3	<i>B. pumilus</i>	Oval, tepeli	Krem rengi	kuru
8n17-1	<i>B.safensis</i>	Yuvarlak oval, tepeli	Krem rengi	Yumuşak kıvamlı
3n-20	<i>B.amyloliquefaciens</i>	Kenarları tırtıklı, tepesiz	Kremden sarıya dönük	normal

#### 4.4. DNA izolasyon sonucu

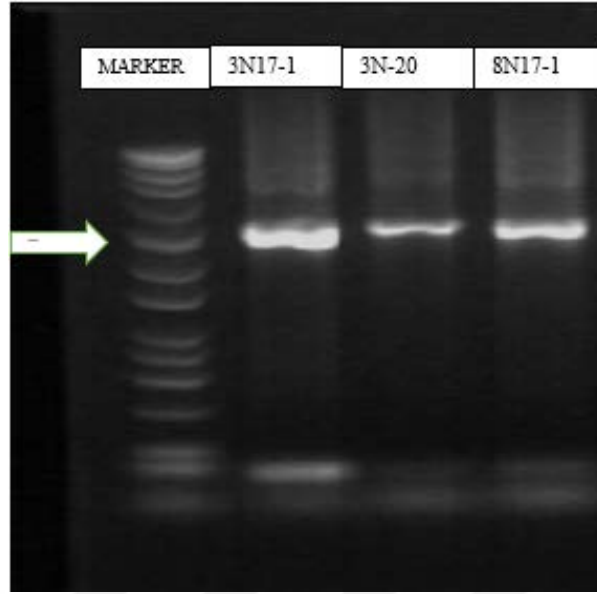
*Bacillus* izolatlarının genomik DNA izolasyonu bölüm 3.4’de belirtilen protokole göre yapılmıştır. DNA izolasyon sonuçları Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.4.** DNA izolasyon sonuçları jel görüntüsü

#### **4.5. PCR Sonuçları**

*Bacillus* izolatlarından elde edilen genomik DNA'lar kullanılarak kurulan PCR reaksiyonları sonucu 1400-1500 bp büyüklüğünde bantlar Şekil 4.5'de gösterilmiştir. İşaretli olan bölge markerda 1400 bp göstermektedir.



**Şekil 4.5.** PCR sonuçları jel görüntüsü  
\*İşaretili bölge 1400 – 1500 bp göstermektedir.

#### 4.6. Dizi Analizi Sonuçları

PCR sonucu çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonucu elde edilen diziler Şekil 4.6'da belirtilmiştir.

>*Bacillus pumilus*

GGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGA  
 CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGAT  
 GAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAT  
 GGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC  
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA  
 GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG  
 CGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG  
 CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCCGGCGGT  
 TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTG  
 AGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA  
 CCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAA  
 CAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCC  
 CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCA  
 AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA  
 ACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTG  
 ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG  
 CAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG  
 AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG  
 GACAGAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCCGAT  
 CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT  
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCG  
 GTGAGGTAACC

**Şekil 4.6.** *Bacillus* izolatlarından 16S rRNA gen bölgesine ait dizi analizi sonuçları

>*Bacillus safensis*

GCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTG  
AACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATT  
AGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG  
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA  
TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGT  
TGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC  
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC  
GTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTC  
ATTGAAAAGTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATG  
CGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGA  
GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT  
AAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  
CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGC  
TTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG  
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGG  
TGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT  
GGGCTACACCGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCGCAAGTTTTAGCCAATCCC  
ATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA  
TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGA

Şekil 4.6. (devam)



> *Bacillus amyloliquefaciens*

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
 GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTG  
 AACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATT  
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG  
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT  
 GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT  
 GTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCAC  
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC  
 GTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC  
 ATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATG  
 CGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGA  
 GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT  
 AAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  
 CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
 TAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGAC  
 GTCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG  
 GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGG  
 TGAAGTCCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT  
 GGGCTACACAGTGTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCC  
 ACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA  
 TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCCGTCACACCACGA  
 GAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT

Şekil 4.6. (devam)

#### 4.7. Dendogram Grafiği

*Bacillus* izolatlarının 16S rRNA genine ait dizi bilgisi clustalW programı ile dikey olarak hizalanmıştır. Hizalama sonuçları Şekil 4.7’de görüldüğü gibidir.

```

Bacillus_pumilus          -----GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGA
Bacillus_safensis        TGCAGTCGAGCGGACGAGAAGAGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGA
Bacillus_amyloliquefaciens -----TGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA
                               *****

Bacillus_pumilus          CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGG
Bacillus_safensis        CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGG
Bacillus_amyloliquefaciens CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGG
                               *****

Bacillus_pumilus          GAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGAT
Bacillus_safensis        GAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGAT
Bacillus_amyloliquefaciens GAAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAAGCAT
                               *****

Bacillus_pumilus          GAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCT
Bacillus_safensis        GAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCT
Bacillus_amyloliquefaciens AAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCT
                               ***

Bacillus_pumilus          AGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
Bacillus_safensis        AGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
Bacillus_amyloliquefaciens AGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
                               *****

Bacillus_pumilus          AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
Bacillus_safensis        AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
Bacillus_amyloliquefaciens AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
                               *****

Bacillus_pumilus          GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
Bacillus_safensis        GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
Bacillus_amyloliquefaciens GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
                               *****

Bacillus_pumilus          CCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
Bacillus_safensis        CCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
Bacillus_amyloliquefaciens CCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
                               *****

```

Şekil 4.7. *Bacillus* izolatlarından 16S rRNA genine ait hizalama sonuçları (ClustalW programı)

Bacillus_pumilus	GAACAAGT GCGAGAGT AACTGCTCG -CACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
Bacillus_safensis	GAACAAGT GCGAGAGT AAC-----ACCTAACCAGAA
Bacillus_amyloliquefaciens	GAACAAGT GCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
	***** ** *****
Bacillus_pumilus	AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
Bacillus_safensis	AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
Bacillus_amyloliquefaciens	AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
	*****
Bacillus_pumilus	CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGT
Bacillus_safensis	CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGT
Bacillus_amyloliquefaciens	CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGT
	*****
Bacillus_pumilus	CTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGA
Bacillus_safensis	CTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGA
Bacillus_amyloliquefaciens	CTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGA
	*****
Bacillus_pumilus	AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATG
Bacillus_safensis	AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATG
Bacillus_amyloliquefaciens	AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATG
	*****
Bacillus_pumilus	CGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA
Bacillus_safensis	CGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA
Bacillus_amyloliquefaciens	CGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA
	*****
Bacillus_pumilus	ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCT
Bacillus_safensis	ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCT
Bacillus_amyloliquefaciens	ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCT
	*****
Bacillus_pumilus	GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCC
Bacillus_safensis	GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCC
Bacillus_amyloliquefaciens	GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCC
	*****

Şekil 4.7. (devam)

Bacillus_pumilus	CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
Bacillus_safensis	CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
Bacillus_amyloliquefaciens	CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
	*****
Bacillus_pumilus	GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
Bacillus_safensis	GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
Bacillus_amyloliquefaciens	GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
	*****
Bacillus_pumilus	CATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
Bacillus_safensis	CATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
Bacillus_amyloliquefaciens	CATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
	*****
Bacillus_pumilus	CCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAG
Bacillus_safensis	CCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAG
Bacillus_amyloliquefaciens	CCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAG
	***** * * *****
Bacillus_pumilus	GTGGTGATGGTTGTCGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
Bacillus_safensis	GTGGTGATGGTTGTCGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
Bacillus_amyloliquefaciens	GTGGTGATGGTTGTCGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
	*****
Bacillus_pumilus	CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACT
Bacillus_safensis	CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACT
Bacillus_amyloliquefaciens	CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACT
	***** *****
Bacillus_pumilus	CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
Bacillus_safensis	CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
Bacillus_amyloliquefaciens	CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
	*****
Bacillus_pumilus	TCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAA
Bacillus_safensis	TCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAA
Bacillus_amyloliquefaciens	TCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAA
	*****

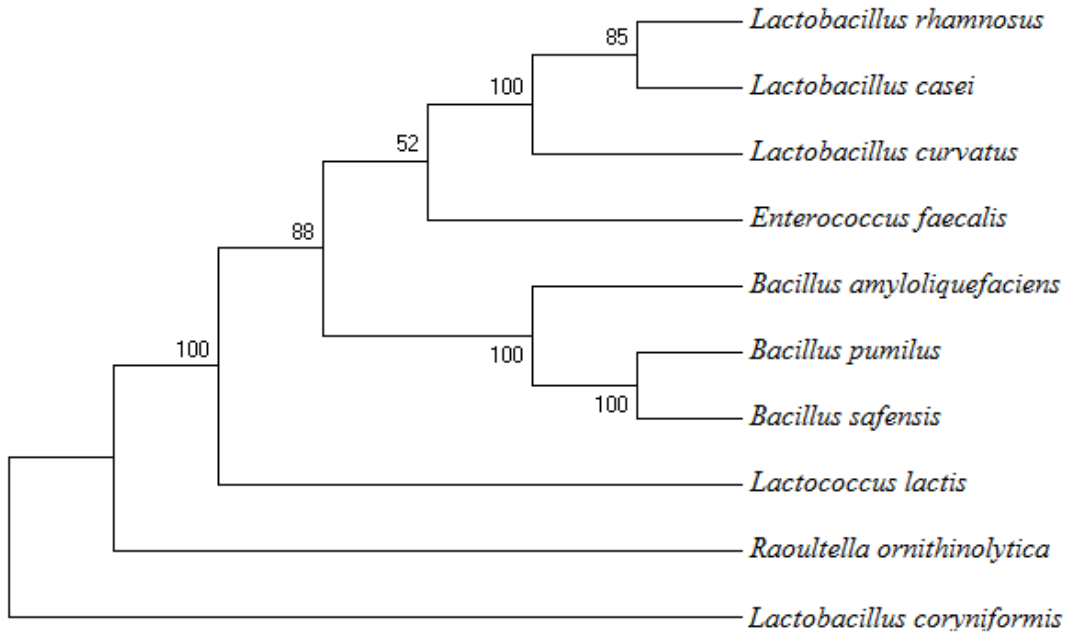
Şekil 4.7. (devam)

Bacillus_pumilus	CAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTC
Bacillus_safensis	CAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTC
Bacillus_amyloliquefaciens	CAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTC
	***** **
Bacillus_pumilus	AGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
Bacillus_safensis	AGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
Bacillus_amyloliquefaciens	AGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
	*****
Bacillus_pumilus	AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACA
Bacillus_safensis	AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACA
Bacillus_amyloliquefaciens	AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT-----
	*****
Bacillus_pumilus	CCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAAC
Bacillus_safensis	CCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTG-----
Bacillus_amyloliquefaciens	-----
Bacillus_pumilus	CTTTA
Bacillus_safensis	-----
Bacillus_amyloliquefaciens	-----

Şekil 4.7. (devam)



16S rRNA genine ait hizalama sonuçları kullanılarak çalışmada izole edilen tüm bakterilerin evrimsel analizi yapılmıştır. Evrimsel yakınlıklarını belirlemek için seç-bağla (bootstrap) yöntemi 1000 tekrarlı kullanılarak Şekil 4.6'da görülen dendogram grafiği oluşturulmuştur.



**Şekil 4.8.** Elde edilen tüm sekans dizilimlerinin dendogram grafiği

\*Ağaç "Likelihood Tree" yöntemi ve "Tamura-Nei Model" düzeltmesi kullanılarak oluşturulmuştur. Rakamlar sec-bağla ("Boot-Strap ve 1000 tekrarlı") değerlerini göstermiştir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Endüstriyel üretim alanında kullanılan mikroorganizmalar substratı iyi kullanabilmeleri, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları büyük boyutlarda üretilibilmeleri ve en önemlisi ekstrem koşullarda aktivite gösterebilmelerinden dolayı önemli bir tercih sebebidir. Tarımsal Biyoteknoloji alanında, stratejik alan olarak değerlendirilmekte, özel şirketler ve hükümetler düzeyinde yapılan çalışmalar destek görmektedir. Biyoteknoloji'nin en hızlı gelişen ve en önemli dallarından olan mikrobiyal biyoteknoloji, ürün oluşturma bazında artan bir ivme göstermektedir. Yaptığımız çalışma da bu konuyu destekler niteliktedir.

İzolasyonu yapılan *Bacillus* türleri bakterilerinden seçilen ve karakterize edilen üç bakteri Gram (+) katalaz (+), aerob, krem renkli, çubuk şekilli ve hareketli bakterilerdir. Koloni morfolojileri ve morfolojik özelliklerine göre seçilen bakteriler *Bacillus* spp. şeklinde tanımlanmıştır.

Klasik yöntemler ile yapılan çalışmalar karşılaşılan sorunlar moleküler yöntemler giderilmeye başlanmıştır. Bilimsel, endüstriyel ve toplum sağlığı açısından önemli olan gelişmeler için, doğru ve hızlı sonuç alınmasını sağladığından dolayı bu yöntemler tercih sebebidir (Çetinkaya ve Ayhan 2012). Bazı türlere ait 16S rRNA genleri dizi bilgileri ile elde edilen dizi analizi sonucu karşılaştırılınca, 16S rRNA genlerinin türler arasında ne kadar iyi korunduğu görülmüştür. Elde ettiği tüm sonuçlar morfolojik sistematik çalışmalarının genetik temelli çalışmalarla desteklenmesi gerekliliğini düşünmektedir (Aygün 2012).

Yaptığımız bu çalışmada *Bacillus* türlerinden 16S rRNA'sının dizi bilgisi elde edilerek izolasyonu ve tanınması yapılmıştır. Bu amaçla İzole edilen DNA'ların PCR yöntemi ile elde edilen bantların büyüklüğü yaklaşık 1400-1500 bp (Şekil 4.5)'te gösterilmiştir. Jel görüntüsü ile pozitif bant aldığımız örneklerin hizmet alımı ile sekans dizimlerini elde edilmiş ve bu dizimler BLAST programında blastlanarak Genbank'ın arşivlerinden

karşılaştırma yapılmıştır. 3n17-3 kodlu örnek *Bacillus pumilus*, 3n-20 kodlu örnek *Bacillus amyloliquefaciens*, 8n17-1 kodlu örnek ise *Bacillus safensis* %99-100 oranında benzerlik göstermiştir.

Macaristan'da *Phragmites australis* bitkisinin yoğun olarak bulunduğu iki ayrı sulak alandan alınan örneklerle yapılan bir çalışmada örneklerdeki mikrobiyal kominite araştırılmıştır. Yapılan geleneksel morfolojik ve biyokimyasal testler ve 16S rDNA sekans analizi ile 40 *Bacillus* ve akraba ırkı belirlenmiştir (Borsodi *et al.* 2006). Farklı sucul ortamlardan alınan *Bacillus* izolatları ile yapılan bir çalışmada 16S rRNA sekans analizi ile *B. aquaemaris*, *B. badius*, *B. cereus* group, *B. firmus*, *B. halmapalus*, *B. hwajinpoensis*, *B. litoralis*, *B. sporothermodurans* ve *B. vietnamensis* olmak üzere 9 tür teşhis edildi. (Ki *et al.* 2008). Aygün (2012)'nin yaptığı bir çalışmada morfolojik ve biyokimyasal yöntemlere göre cins ve tür düzeyinde teşhis edilmiş *Bacillus* izolatlarının 16S rDNA bölgelerinin sekans analizi ile değerlendirmiştir. Sonucunda *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus subtilis* bakterilerini izole etmiştir. Uraz ve Kaanoğlu (2000)'da yapmış oldukları bir çalışmada, çeşitli yörelerden sağlanan 195 çiğ süt örneğinden toplam 33 *Bacillus* izole etmişlerdir. Bu izole edilen *Bacillus*'lar çeşitli biyolojik testlerle 14 farklı *Bacillus* türü olarak adlandırmışlardır. Sonuç olarak bu *Bacillus* türler *B.brevis*, *B.megaterium*, *B.cereus*, *B.licheniformis*, *B.mycodies*, *B.sphearicus* ve *B.stearothermophilus* türlerini tespit etmişlerdir. Gündüz (2012)'nin Ankara ve çevre illerinde bulunan süt işletmelerinden alınan 50 çiğ süt örneğinden bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada 50 örnekten *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirmiştir. Bu *Bacillus*'ların tür seviyesindeki tanımlamaları BBL Crystal Identification System GramPositive ID Kit ve çeşitli biyokimyasal testler kullanmıştır. Sonucunda 109 tane *Bacillus* izolasyonu gerçekleştirmiş. Bunlar *B.pumilus*, *B.cereus*, *B.lentus*, *B.licheniformis* ve *b.megaterium* olarak adlandırmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar gösterdiğimiz sonuçlarla örtüşmektedir.



Filogenetik ağaç farklı biyolojik türler veya ortak atası olduğuna inanılan diğer varlıklar arasındaki evrimsel ilişkileri gösterir. Filogenetik ağaçta iki dalın ayrıldığı her bir düğüm noktası alt soyların ortak atasını temsil etmektedir. Mikroorganizmalar birbirlerine çok benzedikleri için filogenetik ağaçta ayrılmaları oldukça zordur. Bu nedenle mikroorganizmalarda ribozomal RNA'yı kodlayan genlere bakılması (moleküler saat olarak kullanılması) yaygın bir yöntemdir.

Çalışmalarımız sonucu elde edilen sekans dizilimleri öncelikle fasta formatında belgeye dönüştürüldü. Mega 7 programı içinde oluşturulan belge atılarak ClustalW ile diziler sıralandı. Daha sonra 'Likelihood Tree' yöntemi ve "Tamura-Nei Model" düzeltmesi kullanılarak filogenetik ağaçları çizildi. İzole edilen bakterilerin birbirleriyle akrabalık ilişkileri belirlenmiştir.

Goremykin and Hellwig (2006)'in çalışmada yaptıkları gibi sadece align olan 16S rDNA dizisinin (ortalama 1000 baz) kullanılarak "neighbor joining method bootstrap 1000" yöntemi ile oluşturulan filogenetik ağaç, ile mevcut tüm sekans dizisinin kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç arasında gruplandırma bakımından belirgin bir fark yoktur. Çalışmamızda bu metotlar arasında bir fark bulamadığımızdan dolayı sonuçlarımız örtüşmektedir.

Filogenetik analizle belirlenen dendogramda (Şekil 4.8), *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus rhamnosus* bakterileri birbirleri ile yakın ilişkide grup oluştururken; *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* bakterileri birbirleriyle yakın ilişkide ikinci bir grup oluşturmuştur. Diğer taraftan *Lactobacillus cornyformis*, *Raoultella ornithinolytica* ve *Lactococcus lactis* ise bu iki grupta yer alan bakterilerden daha uzak akrabalık ilişkileri ile dendogramda yer almışlardır.

Sonuç olarak çalışmamızda seçtiğimiz, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis* ve *Bacillus amyloliquefaciens*'in birbirleriyle yakın akraba oldukları oluşturulan dendogramda (Şekil 4.7) tespit edilmiştir. Akrabalık derecelerinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

Aynı grupta yer aldıklarından dolayı bunların birçok metabolik ve kimyasal reaksiyonları ve ilgileri aynı olduğu yapılan testlerle belirlenmiştir.

*Bacillus pumilus*'un iyi bir ksilanaz, ekzopektinaz, pektinaz, fitaz vb. gibi endüstriyel kullanımı yüksek enzimleri üretmesi, *Bacillus safensis*'in probiyotik özelliği ve bitki büyümesini teşvik eden PGPR bakteri olma özelliği, *Bacillus amyloliquefaciens* ise kök kolonize edici bir biyo-kontrol ajanı olarak bilinmesi tarım, su ürünleri yetiştiriciliği ve bitki kökü patojenleriyle mücadele için kullanılabilir olması ve ayrıca her üç bakterinin PGPR özelliği göstermelerinden dolayı çalışmamızın sonraki aşamalarında bu bakteri izolatlarının biyoteknolojide kullanım imkanı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Ahmetoğlu, N., 2011. *Bacillus cereus* Kg5'in Proteaz Enzimi Üzerine Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Dicle Üniversitesi.
- Adıgüzel, A., İnan, K., şahin, F., Arasoğlu, T., Güllüce, M., Beldüz, O.A., Barış, Ö., 2009. Pasinler Kaplıcasından İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Farklılıkları, *Türk Journal Biologi degisi*, 35(2011) 267-274.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46, 548s.
- Arslan, S., Erginkaya, Z., Özaslan, M., Kılıç, İ.H., Ünal, E., 2013. *Lactobacillus rhamnosus'un* Sünme (Rope) Hastalığı Etkeni Olan *Bacillus* Cinsi Bakteriler Üzerine İnhibitör Etkisinin Unlarda Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi* 43(4):155-164.
- Aygün, H., 2012. Bazı *Bacillus* İzolatlarının 16s rDNA Bölgelerinin Moleküler ve Biyoinformatik Karakterizasyonu. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Dicle Üniversitesi.
- Barış, Ö. 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatası Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Başbülbül, G., Ateşlier, Z. B. B., Bozdoğan, B., Metin, K., Oryaşın, E., & Bıyık, H. H. 2017. Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Termofilik Bakterilerin 16s Rrna Analizi İle Tanılanması. [https://scholar.google.com.tr/scholar?cluster=10081124163165638334&hl=tr&lr=lang\\_tr&as\\_sdt=0,5](https://scholar.google.com.tr/scholar?cluster=10081124163165638334&hl=tr&lr=lang_tr&as_sdt=0,5), (20.01.2017)
- Başkurt, M., 2012. Toprakтан İzole Edilen *Bacillus* Sp. Sus'undan A-Amilaz Üretiminde Etkileyen Fiziksel Faktörlerin Araştırılması. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Uludağ Üniversitesi.
- Borsodi, A. K., Makk J., Rusznya'k A., Vajna B., Taba, G., M a'rialigeti, K. 2007. Phenotypic characterization and molecular taxonomic studies on *Bacillus* and related isolates from Phragmites australis periphyton. *Aquatic Botany*, 86: 243-252.
- Coşkun, A. 2010. Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacillus* Sp. Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi.
- Çetinkaya, E. , Ayhan, K., 2012. Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler, *Science and Engineering Journal* 2(1), 53-62.
- Demeli, M., 2012. Fındık ve Tahıl Ambarlarından *Bacillus* İzolasyonu, Karakterizasyonu ve İzolatların İnsektisidal Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi.
- Ediz, N., Beyatlı, Y., 2005. *Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 03(5), 1-22.
- Ensari, N.Y. , 2002. Moleküler Biyoloji, Dicle Üniversitesi Yayın Evi, 125, Diyarbakır.
- Erbey, Y.İ., 2015. Bazı *Curculonidae* (*Coleoptera*) Familyası Bireylerinin Sindirim Sistemlerindeki Bakteri Florasının İncelenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri, Ahi Evran Üniversitesi

- Goremykin, V. V., Hellwig, F. H., 2006, A New Test Of Phylogenetic Model Fitness Addresses The Issue Of The Basal Angiosperm Phylogeny, Gene, Volume 381, 81-91 Pp.
- Gündüz Teke, S. 2012. Çiğ Sütten İzole Edilen *Bacillus*'ların Adlandırılması ve Biyofilm Varlığının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri, Gazi Üniversitesi.
- Güneş, H.V. , 2003. Güneş Moleküler Hücre Biyolojisi, Kaan Kitabevi, 185 s, Eskişehir
- Kaplan, A. , Güven, R. , Güven, K., 2013. Yeni İzole Edilen *Bacillus licheniformis* Kg9'dan B-Galaktosidazın Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Batman University Journal Of Life Sciences, 3(2), 39-51.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M., 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466p.
- Katı, H., Karaca, B., Gülşen, Ş.H., 2016. Toprakta İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması ve Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 20 (2), 281-290.
- Kaynar, P., 2011. Ülkemiz Peynirleri Üzerine Mikrobiyolojik Araştırmalar, Türk Mikrobiyol Cem Dergisi 41(1):1-8.
- Ki, J.S., Zhang, W., Qian, P.Y. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. Journal of Microbiological Methods, 77: 48–57.
- Kumar, D. , Parshad, R., Gupta, kumar, V., 2014. Application Of A Statistically Enhanced, Novel, Organic Solvent Stable Lipase From *Bacillus safensis* DVL-43, International Journal of Biological Macromolecules, 66, 97-107 s.
- Leloğlu, N. ve Erdoğan, N., 1979. Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 549, Erzurum.
- Lateef, A. , Adelere, I.A., Kana-Hueguim, E.B., Asafa,T.B., Beukes, L.S. 2015. Green Synthesis Of Silver Nanoparticles Using Keratinase Obtained From A Strain of *Bacillus safensis* LAU 13 Int Nano Lett, 5:29–35 s.
- Lateef, A. , Adelere, I., 2015. The Biology And Potential Biotechnological Applications Of *Bacillus Safensis*. Article in Biologia, 70/4: 411—419
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Palme Yayın Evi 942 S, Ankara.
- Öztaş, S, Şengül, A.Z., Solak, M., 1997. Rekombinant DNA Teknolojisi: Temel İlkeler ve Uygulama Alanları (Yardımcı Ders Kitabı). Bilim Teknik Yayınevi, 119 s, Manisa
- Sarıgül, N., 2007. Ege Bölgesindeki Çeşitli Sıcak Su Kaynaklarından *Thermus genusu* Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu ve B-Galaktosidaz Aktivitesinin Saptanması, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi
- Sekin, Y. , Karagöz, N. 2004. Gıda Endüstrisi İçin Temele Esaslar ve Uygulamalar. Literatür Yayınları, 1 s, İstanbul.
- Selen,V., 2006. *Bacillus amyloliquefaciens* İle A-Amilaz Üretiminin Katı Substrat Fermantasyonu İle İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fırat Üniversitesi.
- Sütçüoğlu, N., Korun, J., Gökoğlu, M., Kurtoğlu, M., 2009. Antalya Körfezinde Bulunan İnci İstiridyesi (*Pinctada Radiata*, Leach, 1814)'nden Api 20 Ne Kiti

- Kullanılarak, *Vibrio vulnificus*'un Tanımlanması. Xv. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Antalya.
- Şahin, F., 2003. Yağ Asitleri Profillerine Göre Mikroorganizmaların Tanısı ve Karakterizasyonu (Microbial Identification System). Biyoinformatik Lisansüstü Yaz Okulu-2003, 22-28 Haziran, Erzurum, s147-153.
- Tarakçıoğlu, S., 2016. Erzurum Ilıca Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve *Bacillus Thermoamylovorans* ST-10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Atatürk Üniversitesi
- Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Tepe, Ö., Dursun, A.Y., 2012. *Bacillus pumilus* İle Ekzo Pektinaz Üretiminde Ortam pH'ının Etkisi. Onuncu Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Koç Üniversitesi.
- Teyarachakul, S., Chand, S., and Tang, J., 2007, Estimating The Limits For Statistical Process Control Charts: A Direct Method Improving Upon The Bootstrap, European Journal of Operational Research, Volume 178, Issue 2, 472-481.
- Tewari, A., Singh, P.S. , Singh, R., Kumar, D. , 2012. Comparison Of A New Chromogenic Medium With Standard Media For İsolation And İdentification Of *Bacillus cereus*. Eurasian Journal Of Veterinary Sciences, Konya.
- Thieman, W. J., Palladino, M.A., 2013. Biyoteknolojiye Giriş, Palme yayıncılık, Ankara 2,9,123s.
- Tunail, N., 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara.
- Turgut, T., Erdoğan, A., Atasever, M.,2013. Karın Kaymağı Peynirinden İzole Edilen Laktobasillerin Tanımlanması. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fak Dergisi 18 (2): 209-213.
- Ustaçelebi, Ş., 1999. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş kitapevi, 415 s, Ankara.
- Uraz, G., Kaanoğlu, M., 2000. 33 *Bacillus* İzolatında Kromojenik Sefalosporin Test Yöntemiyle Beta-Laktamaz Enziminin Araştırılması ve Beta-Laktamaz Pozitif İzoların Ampisilin İmipenem'e Karşı Hassasiyetleri, Gıda degisi 25(2) 149-158
- Ünal, M., 2012. Hücre Biyolojisi, Marmara üniversitesi yayınevi, 74 s, İstanbul.
- Yaşınok, Ersayın, A. , Şahin, İffet, F. , Haberal, M., 2008. Zea mays'dan Endofitik ve Ksilanolitik *Bacillus pumilus* Suşlarının İzolasyonu, Tarım Bilimleri Dergisi , 14 (4),374-380.
- Zülal, A., 2001, İnsan Genomu, Tübitak Yayınları, 5-11. ANKARA

## ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında İstanbul'un Bayrampaşa semtinde doğdu. İlkokulu, orta ve lise öğrenimini Kırklareli'nde tamamladı. 2011 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nden Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. 2015 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı.

