

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNİN ÜRETİMİNDE KONTAMİNASYONA NEDEN
OLAN *BACILLACEAE* VE *ANOXYBACILLACEAE* FAMILİYALARINA AİT
SPOR ÜRETİCİSİ BASİLLERİN QPCR İLE TESPİTİNE YÖNELİK
YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLAR GELİŞTİRİLMESİ

Ayşe Büşra KARAKAYA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2025

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNİN ÜRETİMİNDE KONTAMİNASYONA NEDEN OLAN *BACILLACEAE* VE *ANOXYBACILLACEAE* FAMILYASINA AİT SPOR ÜRETİCİSİ BASİLLERİN QPCR İLE TESPİTİNE YÖNELİK YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLAR GELİŞTİRİLMESİ

Ayşe Büşra KARAKAYA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Tez kapsamında öncelikle süt/süt ürünleri kontaminantı olarak bilinen 65 *Bacillaceae* ve *Anoxybacillaceae* üyesine özgü gen dizileri (16S rRNA, *rpoA*, *rpoB*, *gyrA*, *gyrB*, *spo0A*, *spo0B*, *spoIIIAB*) kullanılarak yeni primer/prob tasarımları yapılmıştır. İlk olarak konvansiyonel PCR'la doğrulanan tasarımlardan 11'i seçilmiş, sonrasında ise hızlı ve hassas tespit amacıyla 7 sporlu basilin genomik DNA'larıyla qRT-PCR optimizasyonları yürütülmüş, iç ve dış grup çaprazlamalar sonucunda internal kontrolle birlikte en uygun 4 primer/prob seti seçilmiştir. Tekli (τ) ve çoklu (ç) qRT-PCR çalışmalarıyla seçilen 7 türün spor ve vejetatif hücrelerinin tespiti moleküler düzeyde gerçekleştirilmiştir. Buna göre *Anoxybacillus*; F81 ($E_T=63$, $E_C=83$) ve DSM 2641 ($E_T=72$, $E_C=80$), *Geobacillus*; DSM 465 ($E_T=120$, $E_C=24$) ve ATCC 43223 ($E_T=118$, $E_C=80$), *Bacillus*; DSM 1971 ($E_T=86$, $E_C=88$), DSM 13 ($E_T=76$, $E_C=105$) ve DSM 7 ($E_T=66$, $E_C=113$) cinsleri için kantitatif analizlerde lineer regresyon eğrileri ve etkinlik (%E) değerleri saptanmış, tespit edilebilirlikleri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sütten vorteks^v/sonikasyon^s yöntemleriyle DNA izolasyonu sonucunda, kit kapsamında kullanılacak vorteksleme ile sırasıyla vejetatif hücre ve spordardan 28-99 ve 30-1255 ng/μL genomik DNA izole edilebilmiş, qRT-PCR'daki üstünlüğü gösterilmiştir. Süt varlığında kültüre dayalı yöntemlerle tespit limitleri tüm temsilci türlerde 10²-10⁹ KOB/mL olarak belirlenirken, vorteks veya sonikasyonla süttten izole DNA'larla yürütülen qRT-PCR'da limitler *Anoxybacillus* için ^v ve ^s, 10⁴-10⁹; *Geobacillus* için ^v, 10³-10⁹ ve ^s, 10⁴-10⁹; *Bacillus* için ^v, 10⁶-10⁹ ile ^s, 10⁵-10⁹ KOB/mL olarak saptanmıştır. Böylece, *Anoxybacillaceae* (*Anoxybacillus*, *Anoxybacteriodes*, *Thermoaerobacillus*, *Geobacillus*, *Parageobacillus*) ve *Bacillaceae* (*Bacillus*) familyası üyelerini özgül olarak tespit edebilecek ticari bir kitin ön-tasarımı gerçekleştirilmiş, süt kontaminantı mikroorganizmaların hassas, hızlı ve güvenilir bir şekilde tespitine yönelik multipleks qRT-PCR temelli yenilikçi bir yaklaşım sunulmuştur.

Ocak 2025, 172 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Bacillaceae*, *Anoxybacillaceae*, familya, süt, kültürel, qRT-PCR, kantifikasyonu

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DEVELOPING INNOVATIVE APPROACHES USING THE QPCR METHOD FOR THE DETECTION OF SPORE-FORMING BACILLI OF THE *BACILLACEAE* AND *ANOXYBACILLACEAE* FAMILIES WHICH CAUSES CONTAMINATION IN THE PROCESS OF MILK AND DAIRY PRODUCTS

Ayşe Büşra KARAKAYA

Ankara University
Graduate Scholl of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Within the scope of the thesis, new primer/probe designs were created using gene sequences (*16S rRNA*, *rpoA*, *rpoB*, *gyrA*, *gyrB*, *spo0A*, *spo0B*, *spoIIIAB*) specific to 65 members of *Bacillaceae* and *Anoxybacillaceae*, known as milk/dairy product contaminants. Eleven designs initially validated by conventional PCR were selected, followed by qRT-PCR optimizations using genomic DNA of seven spore-forming bacilli for rapid and sensitive detection. After internal and external group cross-evaluations, the most suitable four primer/probe sets, including an internal control, were identified. Single (s) and multiplex (m) qRT-PCR analyses successfully detected spores and vegetative cells of seven target species at the molecular level. Quantitative analyses established linear regression curves and efficiency (E%) values for *Anoxybacillus* (F81: E_S=63%, E_M=83%; DSM 2641: E_S=72%, E_M=80%), *Geobacillus* (DSM 465: E_S=120%, E_M=24%; ATCC 43223: E_S=118%, E_M=80%), and *Bacillus* (DSM 1971: E_S=86%, E_M=88%; DSM 13: E_S=76%, E_M=105%; DSM 7: E_S=66%, E_M=113%), with their detectability statistically evaluated. DNA isolation from milk using vortex/sonication yielded 28–99 ng/μL and 30–1255 ng/μL of genomic DNA from vegetative cells and spores, respectively, demonstrating superiority in qRT-PCR. Detection limits with culture-based methods ranged from 10²–10⁹ CFU/mL, while qRT-PCR with vortex/sonication-isolated DNA showed limits of 10⁴–10⁹ (*Anoxybacillus*, ^v and ^s), 10³–10⁹/10⁴–10⁹ (*Geobacillus*, ^{v/s}), and 10⁶–10⁹/10⁵–10⁹ CFU/mL (*Bacillus*, ^{v/s}). This study established a preliminary design for a commercial kit to specifically detect *Anoxybacillaceae* (*Anoxybacillus*, *Anoxybacteriodes*, *Thermoaerobacillus*, *Geobacillus*, *Parageobacillus*) and *Bacillaceae* (*Bacillus*) members, offering an innovative multiplex qRT-PCR-based approach for the rapid, sensitive, and reliable detection of milk contaminants.

January 2025, 172 pages

Keywords: *Bacillaceae*, *Anoxybacillaceae*, family, dairy, culturel, qRT-PCR, quantification

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora öğrenim sürem boyunca, her aşamada, gerek bilgi ve birikimleriyle önümü aydınlatan, gerekse zamanıyla ve her tökezlediğim anda yardım elini uzatmayı bir an olsun bile esirgemeyen, sabırla her anlamda benim yanımda olan saygıdeğer ve kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Doktora tez izleme komitemde yer alan ve tezin ilerleyişi sırasında bana her konuda destek sağlayan, Sayın Prof. Dr. Birgül ÖZCAN'a (Mustafa Kemal Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. İlker BÜYÜK'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Tüm lisansüstü eğitim sürecimde aynı laboratuvarıda çalışma şansı elde ettiğim Sayın Dr. Öğr. Üyesi Başar KARACA'ya, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarındaki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Her konuda türlü desteklerini esirgemeyen aileme,

Bu Doktora tezimi, 119C208 kodlu “Ankara Üniversitesi ile Sentebiolab Biyoteknolojik Ürünler ve Hizmetleri Ar-Ge İmalat İthalat İhracat Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi İş Birliği Sanayi Doktora Projesi”, 2244 Bilim İnsanı Destekleme Programı (TÜBİTAK BİDEB) ve 123N738 kodlu “Süt ve Süt Ürünlerinde Kontaminasyon İndikatörü Olarak Bilinen *Bacillaceae* Ailesine Üye Sporlu Basillerin qRT-PCR ile Tespitine Yönelik Kit Geliştirilmesi” başlıklı 1005 projesi ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK ARDEB),

Saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe Büşra KARAKAYA
Ankara, Ocak 2025

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

ETİK.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	8
2.1 Mikroorganizmaların Süt ve Süt Ürünlerinde Sebep Olduğu Sorunlar	8
2.2 <i>Bacillaceae</i> Ailesi.....	13
2.2.1 <i>Bacillus</i> cinsi	14
2.3 <i>Anoxybacillaceae</i> Ailesi	16
2.3.1 <i>Anoxybacillus</i> cinsi	16
2.3.2 <i>Geobacillus</i> cinsi.....	16
2.4 Süt ve Süt Ürünlerinde Sıklıkla Yer Alan Sporlu Basil Türleri	17
2.5 Spor Kavramı ve Oluşum Mekanizması	18
2.6 Prokaryotlarda Taksonomik Sınıflandırma	23
2.7 Taksonomik Çalışmalarda Moleküler Saat Olarak Kullanılan Genler	24
2.7.1 16S rRNA geni.....	24
2.7.2 DNA bağımlı RNA polimeraz beta alt ünitesi (<i>rpoB</i>)	25
2.7.3 DNA bağımlı RNA polimeraz alfa alt ünitesi (<i>rpoA</i>).....	26
2.7.4 DNA giraz alfa alt ünitesi (<i>gyrA</i>).....	26
2.7.5 DNA giraz beta alt ünitesi (<i>gyrB</i>).....	27
2.7.6 Spor oluşumunda yer alan moleküler düzenleyiciler	28
2.7.6.1 Sporulasyon erken evre regülatörü (<i>spo0A</i>).....	28
2.7.6.2 Sporulasyon erken evre regülatörü (<i>spo0B</i>).....	29
2.7.6.3 Sporulasyon III. Evre regülatörü (<i>spoIIIAB</i>)	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.....	31
3.2 Bakteri Kültürleri ve Gelişim Koşulları.....	32
3.3 Seçilmiş Temsilci Basillerden Yüksek Miktarda Spor Üretimi, Sayımı ve Saflaştırılması.....	34

3.4 Biyoinformatik Çalışmalar	35
3.4.1 Gen bölgelerine özgü DNA dizilerinin hizalanması.....	43
3.4.2 Filogenetik ağaç çizimleri	43
3.4.3 Benzerlik tablolarının oluşturulması	44
3.4.4 Primer ve prob tasarımları	44
3.5 Genomik DNA İzolasyonları	47
3.6 PCR Çalışmaları	47
3.7 Sanger DNA Dizileme Analizleri	48
3.8 qRT-PCR Çalışmaları.....	49
3.8.1 Cinse özgü tasarlanan primer ve prob setlerinin cinsler arası çaprazlanması ve çalışma kapsamında belirlenen 7 basil için hassasiyet değerlerinin belirlenmesi.....	51
3.8.2 Çoklu qRT-PCR reaksiyon çalışmaları	52
3.9 Süte İnoküle Edilen Vejetatif ve Spor Hücrelerinin Geri Kazanılması, DNA izolasyonu ve qRT-PCR Çalışmaları	52
3.9.1 Spor stoklarının süte inoküle edilmesi ve saatlik olarak sayımları	53
3.9.2 Toplanan süt örneklerinden DNA izolasyonu	54
3.9.3 Sütten izole edilen DNA ile qRT-PCR kurulumu	55
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	56
4.1 Spor Üretimi Optimizasyonu	56
4.2 Dizi Hizalamaları.....	60
4.3 Filogenetik Ağaç ve Benzerlik Tabloları.....	61
4.4 Primer ve Prob Tasarımları.....	67
4.5 Konvansiyonel PCR ve Sanger DNA Dizi Analizi Bulguları	68
4.6 qRT-PCR Sonuçları.....	84
4.6.1 qRT-PCR optimizasyonları ve cinsler arası çaprazlamalar	84
4.6.2 Optimize edilen primer/prob setleriyle tekli reaksiyonlardaki tespit limitleri (LOD).....	88
4.6.3 Çoklu reaksiyon çalışmaları ve tespit limitleri	99
4.6.4 Sütten izole edilen DNA'lar ile yapılan qRT-PCR çalışmaları	107
5. TARTIŞMA	126
KAYNAKLAR	138
ÖZGEÇMİŞ.....	171

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
<	Büyüktür
>	Küçüktür
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Santigrad Derece
g	Gram
K ₂ HPO ₄	Potasyum fosfat dibazik
L	Litre
log	Logaritma
mL	Mililitre
ng	Nanogram
NaCl	Sodyum klorür
Tris- HCl	Tris (hidroksimetil) aminomethan hidroklorik asit
U	Ünite
σ	Sigma

Kısaltmalar

<i>A.</i>	<i>Anoxybacillus</i>
ATCC	Amerikan Kültür Koleksiyonu
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BCP	Bromokrezol Moru
BHQ1	Black Hole Quencher 1
BHQ2	Black Hole Quencher 2
Ct	Threshold siklusu
CY5	Cyanine 5
CFR610	Calcoflour Fluorescent red 610
DSM	Alman Kültür Koleksiyonu
DNA	Deoksiribonükleik asit
Dnaz I	Deoksiribonükleaz I
FAM	Fluorescein amidite
<i>G.</i>	<i>Geobacillus</i>
HEX	Hexachlorofluorescein
KOB	Koloni oluşturan birim
rRNA	Ribozomal RNA
sp.	species
subsp.	subspecies
TSA	Triptik Soy Agar
UHT	Yüksek Isıda Muamele

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Bacillus</i> türlerinin faz kontrast mikroskobu görüntüleri.....	15
Şekil 2.2 Sporulasyon	19
Şekil 2.3 Sporulasyon aşamaları	20
Şekil 2.4 Dormant yapıdaki <i>B. subtilis</i> sporunun tabakaları.....	22
Şekil 2.5 Spo0A aktivasyonu	29
Şekil 3.1 <i>rpoA</i> genine ait dizilerin CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) ile hizalanması	43
Şekil 3.2. Tasarlanan primer ve problemlerin CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) analizi sonucu örnek gösterimi (Örnek olarak ArpoA-f/r1, P-ArpoA1 seti gösterilmiştir)....	45
Şekil 3.3 Premier Biosoft'un sunduğu, Beacon Designer arayüzü	45
Şekil 3.4 <i>Anoxybacillus</i> (a) grup 1 ve (b) grup 2 için <i>rpoA</i> gen bölgelerine özgü dizayn edilen primer ve problemlerin gen lokusu üzerinde ilgili bölgenin SnapGene Viewer programı ile gösterimi.....	46
Şekil 3.5 Kullanılan boyaların spektrofotometrik pozisyonları	50
Şekil 4.1 <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223 suşunun farklı sporulasyon besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor sayım sonuçları (log (KOB/mL)).....	56
Şekil 4.2 <i>B. subtilis</i> DSM 1971 suşunun farklı sporulasyon besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor sayım sonuçları (log (KOB/mL)	57
Şekil 4.3 <i>B. licheniformis</i> DSM 13 suşunun farklı sporulasyon besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor sayım sonuçları (log (KOB/mL)	58
Şekil 4.4 <i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7 suşunun farklı sporulasyon besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor sayım sonuçları (log (KOB/mL)).....	59
Şekil 4.5 MEGA 11 (Koichiro vd.2021) yazılımı kullanılarak AgyrAf/r1 seti için gen bölgelerinin hizalanmasına ait bir arayüz ekran görüntüsü örneği.....	60
Şekil 4.6 CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) web tabanlı arayüzü AgyrAf/r1 seti için gen dizilerinin hizalanmasına dair örnek ekran görüntüsü.....	61
Şekil 4.7 Asp0A grubu olarak seçilen sporlu basillerin gen dizileriyle MEGA 11 (Koichiro vd.2021) programında UPGMA algoritması kullanılarak elde edilen ağaç.....	62
Şekil 4.8 GgyrB grubu olarak seçilen sporlu basillerin gen dizileriyle MEGA 11 (Koichiro vd.2021) programında UPGMA algoritması kullanılarak elde edilen ağaç.....	63
Şekil 4.9 BgyrB grubu olarak seçilen sporlu basillerin gen dizileriyle MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) programında UPGMA algoritması kullanılarak elde edilen ağaç.....	63
Şekil 4.10 İnternal kontrol olarak kullanılan, <i>Anoxybacillaceae</i> ve <i>Bacillaceae</i> familya üyelerinin tamamına bağlanan A16SrRNA-f/r1 primerinin konvansiyonel PCR'da temsilci türlerle pozitif çapraz reaksiyon sonuçlarına ait agaroz jel görüntüsü.....	70

Şekil 4.11 Sadece <i>Geobacillus</i> ve <i>Parageobacillus</i> cinsi üyelerinin türlerine bağlanan GgyrB-f/r1 primerinin konvansiyonel PCR’da temsilci türlerle çapraz reaksiyon sonuçlarına ait agaroz jel görüntüleri	71
Şekil 4.12 Sadece <i>Bacillus</i> cinsi üyelerinin türlerine bağlanan BgyrB-f/r1 primerinin konvansiyonel PCR’da temsilci türlerle çapraz reaksiyon sonuçlarına ait agaroz jel görüntüleri	72
Şekil 4.13 Sadece <i>Anoxybacillus</i> , <i>Anoxybacteriodes</i> ve <i>Thermaerobacillus</i> cinsi üyelerinin türlerine bağlanan Aspo0A-f/r2 primerinin konvansiyonel PCR sonuçlarına ait agaroz jel görüntüleri	74
Şekil 4.14 GgyrB-f/r1 primer seti ile <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980’e ait genomik DNA ile yapılan reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürününün Sanger dizileme sonucunda elde edilen kromotogram verilerinin a) UGENE Unipro (Okonechnikov vd. 2012) programı ile düzenlenmesi ve blastxn sonucunun ekran görüntüsü b) web tarayıcısı ile NCBI veritabanında yapılan blastxn sonucu.....	76
Şekil 4.15 Aspo0A-f/r2 primer seti ile <i>A. caldiproteolyticus</i> (<i>Thermaerobacillus caldoproteolyticus</i>) DSM 15730’a ait genomik DNA ile yapılan reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürününün Sanger dizileme sonucunda elde edilen kromotogram verilerinin a) UGENE Unipro (Okonechnikov vd. 2012) programı ile düzenlenmesi ve blastxn sonucunun ekran görüntüsü b) web tarayıcısı ile NCBI veritabanında yapılan blastxn sonucu	78
Şekil 4.16 BgyrB-f/r1 primer seti ile <i>B. subtilis</i> DSM 1971’a ait genomik DNA ile yapılan reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürününün Sanger dizileme sonucunda elde edilen kromotogram verilerinin a) UGENE Unipro (Okonechnikov vd. 2012) programı ile düzenlenmesi ve blastxn sonucunun ekran görüntüsü b) web tarayıcısı ile NCBI veritabanında yapılan blastxn sonucu	80
Şekil 4.17 A16SrRNA-f/r1 primer seti ile <i>B. licheniformis</i> DSM 13’e ait genomik DNA ile yapılan reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürününün Sanger dizileme sonucunda elde edilen kromotogram verilerinin a) UGENE Unipro (Okonechnikov vd. 2012) programı ile düzenlenmesi ve blastxn sonucunun ekran görüntüsü b) web tarayıcısı ile NCBI veritabanında yapılan blastxn sonucu.....	82
Şekil 4.18 Çoklu (multipleks) reaksiyonların CFX Maestro yazılımdan elde edilen amplifikasyon grafikleri	100
Şekil 4.19 Süt ve 7 temsilci tür ile kurulan deney düzeneklerinin fotoğrafları.....	113
Şekil 4.20 “ <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> ” F81 hs. <i>A. ayderensis</i> ’in, vejetatif hücre ve sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 primer-prob setiyle elde edilen Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği	114
Şekil 4.21 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641’in vejetatif hücre ve sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 seti ile elde Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği	116

Şekil 4.22 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465'in sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 primer/prob seti ile elde edilen Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği.....	117
Şekil 4.23 <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223'ün sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 seti ile elde edilen Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği.....	118
Şekil 4.24 <i>B. licheniformis</i> DSM 13'ün sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile elde edilen Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği	120
Şekil 4.25 <i>B. subtilis</i> DSM 1971'in sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile elde edilen Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği.....	121
Şekil 4.26 <i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7'nin sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile elde edilen Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği	123

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Firmicutes filumunun yıllar içerisinde kabul gören isimlendirmeleri	13
Çizelge 3.1 Sporulasyon besiyeri kombinasyonları	31
Çizelge 3.2 Triptik Soy Agar (TSA) Besiyeri içeriği	31
Çizelge 3.3 Bromkrezol Mor (BCP) Agar içeriği	31
Çizelge 3.4 Serum Fizyolojik	32
Çizelge 3.5 %10'luk Sodyum dodesil sülfat çözeltisi	32
Çizelge 3.6 10 mg/mL'lik Lizozim çözeltisi	32
Çizelge 3.7 10 mM Tris-HCl Tamponu	32
Çizelge 3.8 Tez çalışmalarında kullanılan referans suşlar ve gelişim koşulları	33
Çizelge 3.9 Seçilen 7 temsilci referans suş ve izolatlar	34
Çizelge 3.10 Süt ürünleri kontaminantı oldukları bilinen ve tez çalışması kapsamında primer/prob tasarımlarında gen dizi bilgileri kullanılan mezofilik ve termofilik sporlu basiller	36
Çizelge 3.11 Primer/prob tasarımında kullanılan termofilik ve mezofilik sporlu basillerin ilgili 8 gen dizilerine ait Genbank Aksesyon numaraları	39
Çizelge 3.12 Konvansiyonel PCR karışımı	48
Çizelge 3.13 Konvansiyonel PCR koşulları	48
Çizelge 3.14 Taqman problemler için seçilen reporter boya ve quencher çiftleri	49
Çizelge 3.15 qRT-Karışımı	51
Çizelge 3.16 qRT-PCR koşulları	51
Çizelge 4.1 Yüksek hacimde ve yüksek sporulasyon oranlarına sahip besiyerlerinde üretim sonucu elde edilen spor (KOB/mL) konsantrasyonları	59
Çizelge 4.2 Asp0A-f/r ve P-spo0A seti için gen dizilerinin hizalaması sonrası MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) yazılımı ile yapılan Maximum Likelihood Pairwise benzerlik analizi	64
Çizelge 4.3 GgyrB-f/r ve P-GgyrB seti için dizilerinin hizalaması sonrası MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) yazılımı ile yapılan Maximum Likelihood Pairwise benzerlik analizi	65
Çizelge 4.4 BgyrB-f/r ve P-BgyrB seti için dizilerinin hizalaması sonrası MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) yazılımı ile yapılan Maximum Likelihood Pairwise benzerlik analizi	66
Çizelge 4.5 Primer ve prob tasarımlarının sporlu basillerin yakınlık derecelerine göre yapılan kodlandırmaları	67
Çizelge 4.6 Tasarlanan primer setlerine göre ideal PCR koşulları ve cins içi ve cinsler arası yapılan çaprazlamalar ile belirlenen reaksiyon sonuçları	69

Çizelge 4.7 Optimize edilen ve primer/prob setleri ve ideal çalışma koşulları	85
Çizelge 4.8 Seçilen 4 primer ve prob setiyle yapılan cins içi ve cinsler arası qRT-PCR çaprazlama sonuçları.....	87
Çizelge 4.9 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ve “ <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> ” F81 hs. <i>A. ayderensis</i> türlerine ait genomik DNA’larının Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 primer/prob seti ile yapılan reaksiyonlarından elde edilen ortalama Ct değerleri ve standart sapma sonuçları.....	88
Çizelge 4.10 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 ve “ <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> ” F81 hs. <i>A. ayderensis</i> türlerine ait genomik DNA’larının A16S-f/r1, P-A16S1 primer/prob seti ile yapılan reaksiyonlarından elde edilen ortalama Ct değerleri ve standart sapma sonuçları	89
Çizelge 4.11 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ve <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223 türlerine ait genomik DNA’larının GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 primer/prob seti ile yapılan reaksiyonlarından elde edilen ortalama Ct değerleri ve standart sapma sonuçları.....	89
Çizelge 4.12 <i>B. subtilis</i> DSM 1971, <i>B. licheniformis</i> DSM 13 ve <i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7 türlerine ait genomik DNA’larının BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 primer/prob seti ile yapılan reaksiyonlarından elde edilen ortalama Ct değerleri ve standart sapma sonuçları	90
Çizelge 4.13 Tekli reaksiyonların hassasiyet çalışmalarından elde edilen amplifikasyon grafikleri	91
Çizelge 4.14 Tekli reaksiyonların belirlenen primer ve prob setleriyle temsilci türler arasında yürütülen semi kantifikasyon grafikleri	93
Çizelge 4.15 Temsilci türlerin 200 ng/μL-2 fg/μL konsantrasyonlardaki genomik DNA’ları ile yürütülmüş tekli qRT-PCR reaksiyonlarının kalibrasyon grafiği denklem verileri	99
Çizelge 4.16 İdeal olarak belirlenen çoklu reaksiyon koşulları	99
Çizelge 4.17 Çoklu reaksiyonlarda primer ve prob setleriyle temsilci türlerin çalışıldığı semi kantifikasyon grafikleri.....	102
Çizelge 4.18 Temsilci türlerin 200 ng/μl-2 fg/μl konsantrasyonlardaki genomik DNA’ları ile yürütülmüş çoklu qRT-PCR reaksiyonlarının kalibrasyon grafiği denklem verileri	107
Çizelge 4.19 “ <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> ” F81 hs. <i>A. ayderensis</i> için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları	108
Çizelge 4.20 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641 için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları	108
Çizelge 4.21 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları	108
Çizelge 4.22 <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223 için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları	109

Çizelge 4.23 <i>B. licheniformis</i> DSM 13 için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları.....	109
Çizelge 4.24 <i>B. subtilis</i> DSM 1971 için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları.....	109
Çizelge 4.25 <i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7 için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları	110
Çizelge 4.26 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 türüne ait spor stoklarının süte inoküle edilmesi sonrası izole edilen DNA konsantrasyonları, koloni sayım sonuçları ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 seti ile kurulan qRT-PCR reaksiyonundan elde edilen ortalama Ct değerleri	110
Çizelge 4.27 <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223 türüne ait spor stoklarının süte inoküle edilmesi sonrası izole edilen DNA konsantrasyonları, koloni sayım sonuçları ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 seti ile kurulan qRT-PCR reaksiyonundan elde edilen ortalama Ct değerleri.....	111
Çizelge 4.28 “ <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> ” F81 hs. <i>A. ayderensis</i> türüne ait spor stoklarının süte inoküle edilmesi sonrası izole edilen DNA konsantrasyonları, koloni sayım sonuçları ve Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 seti ile kurulan qRT-PCR reaksiyonundan elde edilen ortalama Ct değerleri	111
Çizelge 4.29 <i>B. licheniformis</i> DSM 13 türüne ait spor stoklarının süte inoküle edilmesi sonrası izole edilen DNA konsantrasyonları, koloni sayım sonuçları ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile kurulan qRT-PCR reaksiyonundan elde edilen ortalama Ct değerleri	111
Çizelge 4.30 <i>B. subtilis</i> DSM 1971 türüne ait spor stoklarının süte inoküle edilmesi sonrası izole edilen DNA konsantrasyonları, koloni sayım sonuçları ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile kurulan qRT-PCR reaksiyonundan elde edilen ortalama Ct değerleri	112
Çizelge 4.31 <i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7 türüne ait spor stoklarının süte inoküle edilmesi sonrası izole edilen DNA konsantrasyonları, koloni sayım sonuçları ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile kurulan qRT-PCR reaksiyonundan elde edilen ortalama Ct değerleri	112
Çizelge 4.32 “ <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> ” hs. <i>A. ayderensis</i> F81’in kültürel sayım ve Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her DNA iki izolasyon yöntemi ile kıyaslanması	115
Çizelge 4.33 <i>A. flavithermus</i> DSM 2641’in kültürel sayım ve Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her iki DNA izolasyon yöntemi ile kıyaslanması	116
Çizelge 4.34 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465’in kültürel sayım ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her iki DNA izolasyon yöntemi ile kıyaslanması	118

Çizelge 4.35 <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43222'ün kültürel sayım ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her iki DNA izolasyon yöntemi ile kıyaslanması.....	119
Çizelge 4.36 <i>B. licheniformis</i> DSM 13'ün, kültürel sayım ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her iki DNA izolasyon yöntemi ile kıyaslanması.....	121
Çizelge 4.37 <i>B. subtilis</i> DSM 1971'in kültürel sayım ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her iki DNA izolasyon yöntemi ile kıyaslanması.....	122
Çizelge 4.38 <i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7'nin kültürel sayım ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her iki DNA izolasyon yöntemi ile kıyaslanması.....	124

1. GİRİŞ

Endospor üreten termofilik basillerin içsel termostabilite göstermeleri ve spor oluşturmalarının yanı sıra, biyofilm üretimleriyle de termostabilitelerine katkı sağladıkları bilinmektedir (Flint vd. 2001, Burgess vd. 2010, Marchand vd. 2012). Biyofilm matriksleri, basilleri bir arada tutarak, onları yüzeye sabitlemekte ve hücrelerin doğrudan olumsuz çevre koşulları ile temasını engelleyerek, biyofilmin iç kısımlarındaki hücrelerin dış etkenlerden korunmasına neden olmaktadır (Flint vd. 2001, Burgess vd. 2010). Ayrıca, biyofilmi oluşturan hücreler ürettikleri matriks materyali ile daha içteki hücreler ve sporlar için bir siper oluşturarak, popülasyonun canlı kalabilmesine fırsat tanımaktadırlar (Flint vd. 2001, Burgess vd. 2010, Burgess vd. 2014, Sadiq vd. 2018).

Termofilik basiller, yüksek sıcaklıklara maruz kalmalarına karşın, güçlü sıcaklık adaptasyon yetenekleri sayesinde süt ve süt ürünleri, meyve suları ve glukoz şurupları üretiminde kullanılan endüstriyel fermentörlerde, jeotermal termik santrallerde ve kömürle enerji üretilen tesislerde, sıcak su sondaj borularının iç yüzeylerinde kolaylıkla gelişebilmekte, böylelikle hem fermentörlerin biyokorozyonuna hem de bu tür ortamlarda istenmeyen bir mikrobiyal yükün oluşmasına neden olmaktadır (Flint vd. 2001, Nazina vd. 2001, Vieille ve Zeikus 2001). Biyokorozyon, gıda üretim süreçlerinde kullanılan ekipman ve yüzey malzemelerinin kullanım ömrünü kısaltarak ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Flint vd. 2001, Nazina vd. 2001, Vieille ve Zeikus 2001, Burgess vd. 2010, Burgess vd. 2014).

Spor üretici mikroorganizmalar her ortamda bulunmakla birlikte, toprak sedimentleri, toz ve doğal su kaynakları da dahil olmak üzere çok çeşitli çevresel habitatlardan izole edilebilmektedir (Te Giffel vd. 2002). Gıda bileşenlerinde ve gıdalarda karşılaşılan sporlar, ısıya dayanıklılık dereceleri de dahil olmak üzere büyük bir doğal çeşitliliğe sahip olabilirler. Bu türlerin optimal gelişme sıcaklığı sporlarının termal direnci ile ilişkili olmakla birlikte, termofiller genellikle mezofilik türlerden daha yüksek oranda sıcaklığa dirençli sporlar üretebilmektedir (Warth 1978, Gerhardt ve Marquis 1989, Nicholson vd. 2000). Spor direncindeki belirgin farklılıklar sadece farklı türler arasında değil, aynı türe

mensup farklı suşlar arasında da gözlenmektedir (Van Asselt ve Zwietering 2006, Orsburn vd. 2008, Adam vd. 2011, Luu-Thi vd. 2014, Berendsen vd. 2015, Xiao vd. 2015).

Birçok türün sporları 121°C’de sterilizasyonla elimine olmakta fakat, bazı dayanıklı bakteriyel sporlar 150°C gibi yüksek sıcaklıklarda dahi hayatta kalabilmektedirler (Madigan vd. 1997). Sporların sahip oldukları hidrofobik karakterleri, ısıya, kuruma veya dezenfektanlara karşı gösterdikleri doğal dirençleri süt ile temas halinde bulunan ekipmanların yüzeylerine tutunmasına ve temizleme işlemlerinden sağ çıkmalarına neden olmaktadır (Andersson vd. 1995, Simmonds vd. 2003, Ryu ve Beuchat 2005). Genel olarak pastörizasyon, sıcaklığa dayanıklı sporları etkili bir şekilde elimine etmemekle beraber az işlenmiş gıdalardaki spor yükünü yasal sınırlar içerisine çekmekte veya pastörize ürünlerin raf ömrünü uzatmaktadır. Bütün bunlara ek olarak, gıda endüstrisi, yenilmeye hazır gıdalar gibi ürünlerin üretim aşamaları, yeni sistem bileşenlerinin ve işleme teknolojilerinin kullanılması sonucu, yüksek toleransa sahip dirençli spor üreticisi bakterilerle giderek daha fazla karşı karşıya kalmaktadır (Heyndrickx 2011, Lücking vd. 2013). Örneğin, süt tozu, kakao tozu ve jelatin özlerinden izole edilen sıcaklığa dayanıklı spor oluşturan bakterilerin yüksek kontaminasyon riskleri bildirilmiştir (De Clerck vd. 2004, Rückert vd. 2004, Scott vd. 2007, Lima vd. 2011, Witthuhn vd. 2011). Ayrıca baharatlar veya konserve hazır gıda ürünlerinde kullanılan kurutulmuş sebze benzeri bileşenlerde de önemli kontaminasyon kaynakları oluşturdukları, yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir (Oomes vd. 2007, Postollec vd. 2012). Sporları yok etmek için, ultra yüksek sıcaklık (UHT) işlemleri ya da imbibik sterilizasyonu gibi çok daha yüksek sıcaklığa gereksinim duyan yöntemlere ihtiyaç vardır (Den Besten vd. 2018, Eijlander vd. 2019). Ancak bu işlemlerden sonra dahi, ısıl işlemlere dayanıklı sporlar hala canlılıklarını sürdürebilmektedirler (Scheldeman vd. 2006). Ayrıca, uygun koşullarda bu sporların çimlenmesiyle oluşan vejetatif hücrelerin, amilaz, lipaz, proteaz gibi çeşitli ekstraselüler hidrolitik enzim üretim yetenekleri sonucunda ısıl işlem uygulanmış gıdalardaki besin kalitesinin düşmesine ve bozulmalara sebep oldukları bilinmektedir. Örneğin, süt kontaminantı olarak bilinen *Bacillus cereus*’un ürettiği lipaz ve proteazların sütün ekşimesi ve kesilmesine neden olduğu bilinmektedir (Li vd. 2018). Tüm bu durumlar nihai tüketiciler ve gıda endüstrisi için önemli birer sorun haline gelmektedir (Setlow 2014, Eijlander vd. 2019).

Tüm bunlara ek olarak, gıda ile temasta bulunan ekipmanların yüzeyinde, biyofilm olarak bilinen homojen veya heterojen çok hücreli mikrohabitatların oluşumu özellikle süt ve süt ürünleri endüstrisi için önemli diğer bir problemdir. Zira biyofilm yapıları sürekli bir kontaminasyona sebep olarak, sporlar için bir rezervuar işlevi görmektedir (Branda vd. 2001, Faille vd. 2014, McHugh vd. 2017). Yaygın olarak uygulanan pastörizasyon işlemleri yalnızca vejetatif hücreleri ortadan kaldırırken; süt ürünlerinin sporlarla kontamine olması gıda güvenliğini etkilemekte ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Andersson vd. 1995). Süt ve süt ürünleri, mikroorganizmalar için mükemmel gelişme ortamlarıdır. Bu nedenle, kontaminasyonu önleme yöntemleri kullanılmasına karşın nihai ürünlerde sıklıkla mikrobiyal yük gözlenebilmektedir (Scheldeman vd. 2006, Scott vd. 2007, Shaheen vd. 2010). Daha kaliteli ve daha uzun raf ömrüne sahip gıda ürünlerine yönelik artan talep, yeni ambalaj malzemelerinin, teknolojik süreçlerin ve sterilizasyon yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir (Scheldeman vd. 2006, Shaheen vd. 2010). Bu da mikroorganizmaların yeni eradikasyon yöntemlerine uyum sağladıkça dirençlerinin artmasına yol açmaktadır (Scheldeman vd. 2006, Shaheen vd. 2010, Checinska vd. 2015).

Gıda patojenlerinin tespitinde her ne kadar altın standart olan kültüre bağlı teşhis yöntemleri kullanılsa da, bu yöntem 24 ila 48 saat gibi uzun sürelerde yürütülmektedir. Son zamanlarda, gıda kaynaklı patojenlerin tespiti ve tanımlanması için geleneksel yöntemlerin sahip olduğu sınırlamaların üstesinden gelebilmek adına, yüksek duyarlık ve özgüllüğe sahip farklı ve hızlı teşhis yöntemleri geliştirilmiştir (Law vd. 2015). Hızlı tespit yöntemleri, nükleik asit bazlı, biyosensör bazlı ve immünolojik bazlı metotlar olarak kategorize edilmiştir (Zhao vd. 2014). Ayrıca, araştırmacılar hala canlı hücrelerin *in situ* analiz ve ayrımı için hız, duyarlılık, özgüllük ve uygunluk açısından iyileştirmeler içeren yeni yöntemler geliştirmeye devam etmektedirler (Zhao vd. 2014). Hızlı tespit yöntemleri, özellikle gıda endüstrisinde, çiğ ve işlenmiş gıdalardaki patojenlerin varlığını anında tespit edebildikleri için önemlidirler (Law vd. 2015). Bu yöntemler zaman, iş yükü ve maliyetten tasarruf sağlayarak aynı zamanda beşeri kaynaklı hataları azaltabilmektedir (Mandal vd. 2011). Bununla birlikte, bu yeni nesil yöntemlerinde bazı avantajları ve sınırlamaları söz konusudur (Law vd. 2015). Genel olarak, gıdalarda bulunan patojen bakterilerin tespiti için kullanılan teknikler aşağıda listelenmiştir;

- Kültüre bağlı mikrobiyolojik yöntemler (Davis 2014),
- Kültürden bağımsız tespit teknikleri (Janda ve Abbott 2014),
- Farklı türlerde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemlerini içeren nükleik asit dizisine dayalı tespit teknikleri (Thissen vd. 2014, Fraisse vd. 2017, Moriconi vd. 2017),
- Biyokimyasal algılama teknikleri (Singh vd. 2013),
- İmmünolojik algılama teknikleri (Nagaraj vd. 2016)
- Elektriksel ve optik biyosensörleri içeren farklı biyosensör tabanlı yaklaşımlar (Hern ndez vd. 2014, Yoo ve Lee 2016, Shahdordizadeh vd. 2017, Chanda ve Brindha 2018),
- Akış sitometrisi (Depince-Berger vd. 2016, Aebisher vd. 2017),
- Kütle spektroskopisi olan veya olmayan gaz kromatografisi dahil olmak üzere enstrümantal tabanlı tespit teknolojileri (Saptalena vd. 2015),
- Elektrokimyasal  arpışma tekniği (Lee vd. 2016),
- Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) (Cheng ve Sun 2015),
- Raman spektroskopisi dahil olmak üzere farklı spektroskopi yöntemleri (Pahlow vd. 2015),
- Hiperspektral görüntüleme tekniği (Gowen vd. 2015, Rahman vd. 2016),
- Uzun menzilli yüzey plazmonla güçlendirilmiş floresan spektroskopisi (LRSPFS),
- Enzim bağlantılı immünosorbent tahlili (ELISA),
- Endüktif olarak eşleştirilmiş plazma-kütle spektrometrisi (ICP-MS) (Saravanan ve 2021).

Bu tekniklerden günümüzde sıklıkla kullanılan nükleik asit bazlı yöntemler arasında, konvansiyonel PCR ( oklu PCR (multipleks PCR)), gerçek zamanlı nicel PCR (**kantitatif Real-Time PCR= qRT-PCR**), nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon (NASBA- Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP-loop-mediated isothermal amplification) ve mikroarray teknolojisi kullanılmaktadır (Law vd. 2015). Multipleks PCR'ın temel prensibi geleneksel PCR'a benzemekle beraber, standart reaksiyondan farklı olarak tek bir spesifik primer çifti yerine birden fazla primer seti kullanılmasıdır (Law vd. 2015).

Kantitatif RT-PCR tekniği, PCR ürünlerinin tespiti ve görüntülenmesi için kullanılan agaroz jel elektroforezi uygulamasını gerektirmediğinden klasik PCR'den farklılık arz etmektedir (Law vd. 2015). Bu yöntem, spesifik çift etiketli problemler veya **interkalat** boyalar tarafından üretilen floresan sinyali ölçerek, gerçek zamanlı bir şekilde oluşan PCR ürünlerinin oluşumunu sürekli olarak izlenebilmesine olanak sağlamaktadır (Law vd. 2015). qRT-PCR için en yaygın olarak kullanılan floresan sistemleri arasında SYBR green, TaqMan problemleri ve moleküler işaretçiler bulunmaktadır (Law vd. 2015). SYBR green, çift sarmallı DNA (dsDNA) bağlayıcı floresan bir boyadır (Hein vd. 2001). TaqMan problemleri ve moleküler işaretçiler, SYBR green'in yaygın olarak kullanılan alternatifleri olmakla birlikte, çoğunlukla tercih edilen ve çift boya problemleri olarak bilinen TaqMan problemleri, 5' ucunda rapörtör boya ve 3' ucunda söndürme boyası (quencher) olarak bir florofor içeren kalıp zincirlere spesifik nükleotid sekansın tamamlayıcısı olan oligonükleotitlerden oluşmaktadır (Hein vd. 2001, Levin 2004, Patel vd. 2006, Law vd. 2015). Rapörtör ve söndürme boyasının florofor sinyali oluşturması, Taq DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesine bağlıdır (Patel vd. 2006, Law vd. 2015). SYBR Green'in dezavantajı ise özgünlüğünün düşük olması ve tüm çift sarmallı DNA ürünlerine bağlanması ihtimalidir. Bu nedenle herhangi bir PCR ürününü saptamak için kullanılabilirlikle birlikte, spesifik olmayan reaksiyon ürünlerine de (primer dimerleri gibi) bağlanma olasılığı barındırmaktadır (Levin 2004, Madani vd. 2005). TaqMan problemleri ve moleküler işaretleyiciler ise diziyeye özgü problemler olduklarından dolayı primer dimerleri gibi spesifik olmayan ürünlere bağlanma olasılıkları SYBR Green'e göre daha düşük olup, daha yüksek doğrulukta bir sonuç elde edilebilmektedir (Levin 2004). TaqMan tabanlı qRT-PCR'ın SYBR Green veya moleküler işaret tabanlı qRT-PCR'a kıyasla daha spesifik olduğunu gösteren araştırmalar da mevcuttur (Hein vd. 2001, Klerks vd. 2004). Bununla birlikte, tüm bu PCR tabanlı yöntemlerin duyarlılığı, tespit probu veya boya (SYBR Green) seçiminden ziyade esas olarak primerin spesifitesi, dizisi ve erime sıcaklığından etkilenmektedir (Klerks vd. 2004).

Bacillaceae ve *Anoxybacillaceae* ailesine ait cins üyeleri, pek çok habitatta bulunabilmekte, sahip oldukları termal direnç sayesinde yüksek sıcaklıklardan sağ çıkabilmekte, spor ve biyofilm üretebilmektedirler. Tüm bu yeteneklerinden ötürü endüstriyel ortamdaki varlıklarının gideriminin zor olması nedeniyle bu iki familya üyesi

sporlu basiller tez kapsamına dahil edilmişlerdir. İnsan sağlığını doğrudan tehdit etmemelerine karşın, işlenilen ürünlerdeki varlıkları zamanla üssel olarak artmakta ve hücre dışı bakteriyel enzimlerin aktiviteleri sonucunda besin kalitesinin düşmesine ve endüstriyel ekipmanlarda korozyona yol açarak nihai tüketicilere düşük besin değerine sahip ürünlerin sunulmasına neden olmaktadır. Bu durumlar ayrıca üreticiye mali bir yük getirmektedir. Gıda kontaminantı mikroorganizmaların günümüzde hızlı tespitinin yapıldığı alanlara bakıldığında, genellikle ticari qRT-PCR kitlerinin kullanıldığı görülmektedir. Bu ticari kitler içerisinde çoğunlukla birer gıda patojeni olan *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Aspergillus* sp., *Listeria* sp., ve *Campylobacter* sp. gibi tür ve cinsler yer almaktadır. Dünya nüfusu ve gıda sirkülasyonu göz önüne alındığında patojenlerin tespitine yönelik bazı hızlı tanı kitlerinin ticari olarak üretimi yapılsa da üretim aşamasında kullanılan ekipman ve cihazların korozyonuna, gıda güvenliğinin ve ürünün kalitesinin dolaylı olarak düşmesine neden olmakla birlikte doğrudan patojen niteliğini taşımayan diğer sporlu basil kontaminantlarının tespitinin yapılmasını sağlayan kitler gerek literatürde gerekse de patent çalışmaları arasında bulunmamaktadır.

Yukarıda anlatılan bilgiler ışığında, gıda endüstrisinde üreticiye mali yük getiren, besin kalitesi ile raf ömrünü düşüren, süt ve süt ürünlerinin üretildiği ve işlendiği ortamlarda sıklıkla bulunan sporlu basil kontaminantlarının tespitinin, tez kapsamında altın standart olarak bilinen kültüre dayalı tekniklere kıyasla, daha hızlı ve daha güvenilir yapılması amaçlanmış ve *Bacillaceae* ile *Anoxybacillaceae* ailesine ait cinslerin qRT-PCR temelli yaklaşımla varlıklarının tespitine yönelik bir metodoloji geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Yukarıda özetlenen tüm bu bilgiler sonucunda, mevcut literatür ve patent araştırmalarında saptanan bir açığın kapatılması hedeflenerek yola çıkılan bu tez çalışması kapsamında,

- *Bacillaceae* ve *Anoxybacillaceae* ailesine ait cinslerin moleküler taksonomisinde kullanılan gen bölgeleri seçilmiş,
- Süt ve süt endüstrisinde sıklıkla karşılaşılan sporlu basillerin bu gen bölgelerinin hizalamaları yapılmış,
- Her bir gen bölgesi için PCR aşamasında kullanılabilecek muhtemel primer ve prob tasarımları gerçekleştirilmiş,

- Konvansiyonel PCR ve qRT-PCR yöntemi ile cins içi ve cinsler arası çaprazlamalar yapılarak primer/prob spesifiteleri belirlenmiş,
- Seçilen primer ve prob setlerinin uyumu tekli ve çoklu qRT-PCR reaksiyonlarıyla incelenmiş,
- Belirlenmiş 7 temsilci sporlu basilin (*Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641, *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 hs. *Anoxybacillus ayderensis*, *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465, *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 43223, *Bacillus subtilis* 1971, *Bacillus licheniformis* DSM 13, *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7) spor üretim optimizasyonları yapılmış,
- Süt varlığında 7 temsilci türün spor ve vejetatif hücrelerinden cam boncuklarla vortekslleme ve sonikasyon yöntemleriyle genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş,
- Bu iki farklı süttten izolasyon yöntemi, gerek elde edilen DNA miktarları gerekse de qRT-PCR etkinlikleri göz önüne alınarak kıyaslanmış,
- Süt ortamında kültürel ve kültürel olmayan qRT-PCR teknikleriyle tespit limitleri belirlenmiş,
- Tasarlanmış cins bazlı primer/prob çiftlerinin cins içi ve cinsler arası hassasiyetleri ve etkinlik (Efficiency) değerleri saptanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Mikroorganizmaların Süt ve Süt Ürünlerinde Sebep Olduğu Sorunlar

Süt, temel olarak protein, yağ, laktoz, vitamin ve mineralden oluşmaktadır (Nicklas vd. 2009, Čuboň vd. 2012, Keresteš 2016). İçerisindeki proteinler, besinsel olarak gerekli olan ve insanlar için vazgeçilmez bir aminoasit kaynağını oluşturan kazein ve peynir altı suyundan oluşmaktadır (Kubicová vd. 2019). Diğer bir süt bileşen ise birincil bileşen olarak bilinen ve enerji üretiminde büyük bir rol oynayan hidrokarbon yapıdaki laktozdur (Kubicová vd. 2019). Düşük bir kolesterol seviyesi içeren süt yağı ve lesitin ise sütün diğer önemli bileşenleri olarak bilinmektedir (Kubicová vd. 2019).

Beck ve Coad'a (2017) göre, inek sütü içerisinde çoğunlukla kalsiyum, fosfor ve potasyum mineralleri olmakla birlikte, az miktarda demir ve bakır da bulunmaktadır. Sayılan bileşenlere ek olarak, suda ve yağda çözünen vitaminleri de içermektedir. İnek sütünde, A, B1, B2, B6 ve B12 vitaminleri, biyotin ve az miktarda C vitamini de bulunmaktadır (Zeľeňáková vd. 2008). Bu kadar yoğun besin değerine sahip süt ve süt ürünlerindeki zengin içerikli besin maddelerinin bir arada bulunması, doğal olarak mikroorganizmaların bu ortamda gelişmesi için ideal bir zemin oluşturmaktadır (Quigley vd. 2013). Sağlıklı bir hayvandan sağaltımı yapılan süt başlangıçta steril kabul edilmekle birlikte, dış ortamlardaki toprak ve insan kaynaklı çeşitli bulaşı kaynaklarından gelen mikroorganizmalar tarafından kolonize edilebilmektedir (Quigley vd. 2013, Gleeson vd. 2013, Sadiq vd. 2018). Zengin besin değerinin yanı sıra, mikroorganizmalarca kontamine olan süt ve ürünlerinin işlendiği ortamlarda gerekli sıcaklık koşulları da sağlandığında, mikroorganizmalar için mükemmel bir gelişim ortamı oluşmaktadır.

Çiğ süt, sağılan hayvan veya çiftlik emekçileri aracılığıyla uygunsuz sağılma süreçlerinden, çiftlik ortamlarından, çelik tanklar, kaplar ile benzeri süt ekipmanlarından ve bunlara ek olarak, süt ve süt tozu işlenmesinde kullanılan ekipmanlarda halihazırda bulunabilen mikroorganizmalar tarafından kontamine olabilmektedir (Gleeson vd. 2013, Faille vd. 2014, VanderKelen vd. 2016, Sadiq vd. 2018). Bu kontaminasyon kaynakları sonucunda *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*,

Salmonella sp., verotoksijenik *E. coli* (VTEC) gibi patojen bakteriler ve *Bacillus cereus* gibi sporlu basiller süt ve süt ürünleri içerisinde ve işletiminin yapıldığı ortamlarda sıklıkla bulunabilmektedirler (Baylis 2009, Quigley vd. 2013, Law vd. 2015). *Bacillus cereus* gibi sporlu basiller sadece süt ürünlerinin bozulmasına değil aynı zamanda gıda güvenliği sorununa sebep olmaktadır (Stenfors Arnesen vd., 2008, Ehling-Schulz vd. 2011, Quigley vd. 2013). Bu mikroorganizmalar süt kalitesini etkilemekle beraber, ürettikleri lipaz ve proteazlar ile birlikte süt ve süt ürünlerinin ekşiyecek kesilmesine neden olurlar (Li vd. 2018). Tüm bu saptamalar, mikroorganizmalarla kontamine olan süt ve süt ürünlerinin işleme süreçleri esnasında çeşitli uygulamalarla elimine edilmesi gereksinimi ortaya koymaktadır.

Süt sağıldığı anda işlenmesi zor olduğundan, çiğ sütü belirli koşullarda saklayabilmek amacıyla, insanlık tarihi çiğ sütün besin değerini korumak, raf ömrünü uzatmak ve halk sağlığı açısından sorun teşkil eden patojen süt kontaminantlarını uzaklaştırmak ve ortamdaki mikrobiyal yükü azaltmak için ve süt ürünlerine çeşitli ısıl işlemler uygulamıştır. Louis Pasteur'ün 1862 yılının Nisan ayında ilk defa gıdalarda bozulmayı önleyici bir ısıl işlem süreci olan *Pastörizasyonu* keşfetmesine kadar uygulamanın şiddetine ve kullanım amacına bağlı olarak kaynatma yöntemi ve sterilizasyon gibi çeşitli ısıl uygulama süreçleri uygulanmıştır. Sonrasında Nicholas Appert tarafından keşfedilen ve ticari alanda kullanım potansiyeli olan ısıl işlem uygulaması, zamanla gıda endüstrisinde önemli bir teknoloji oluşturmuştur (Karel ve Lund 2003). Isıl işlemin amacı, gıda güvenliğinden ödün vermeden gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmaktır. Bu kapsamda, pastörizasyon ve sterilizasyon gibi çeşitli ısıl uygulama işlemleri, uygulamanın şiddetine ve kullanım amacına göre seçilebilmektedir (Karel ve Lund 2003).

Günümüzde ise gıda güvenliğinden ödün vermeden süt ve süt ürünlerinin raf ömrünü uzatmak için, Termizasyon, Pastörizasyon ve Yüksek Isıl Uygulaması (Ultra Heat Treatment, UHT) işlemleri uygulanmaktadır (Karel ve Lund 2003). **Termizasyon** 57-68°C arası sıcaklıklar kullanılarak sütün 19 saniye boyunca ısıtılması olarak tanımlanmıştır (Lewis ve Heppell 2000). UHT ise, sütün 135-154°C'de ve 1 ila 8 saniye süresince ısıtılmasını içermektedir (Penfield ve Campbel 1990). **Pastörizasyon** tanımı ise, süt ve süt ürünlerinin her bir kısmına eşit olarak uygun ekipman ile spesifik olarak

belirtilen süre/sıcaklık kombinasyonunun uygulanması işlemi olarak bilinmektedir (Food and Drug Administration 2011). Sıklıkla kullanılan pastörizasyon süreci 72°C’de 15 saniyedir ve insanlar için patojen olarak bilinen süt kontaminantlarını elimine ederek mikrobiyal yükü güvenli seviyeye çekmek için yeterlidir (O’Callaghan vd. 2019). Fakat, tüm bu farklı ısı işlem uygulamalara rağmen ortamdan elimine olmayan ısıya dirençli mikroorganizmalar, işlem sonrasında ortamda bulunmaya devam ederek doğrudan insan sağlığını tehdit etmeseler de besin kalitesini düşürerek ve işletme ortamlarında kullanılan ticari ekipmanların ömrünü kısaltarak üreticiye mali yük getirmektedirler.

Süt ve ilgili işletmelerdeki kontaminantların izolasyonu ve tanımlanması için kültüre dayalı ve kültüre dayalı olmayan çeşitli tekniklerle yürütülen çok sayıdaki literatür çalışmasında (Flint vd. 2001, Burgess vd. 2010, Burgess vd. 2014), sütün doğal kontaminantı olarak bilinen patojen bakterilerin yanı sıra, termofilik veya fakültatif termofilik spor oluşturan basillerin de bu ortamlarda bulunabildikleri bilinen bir fenomendir (Flint vd. 2001, Burgess vd. 2010, Quigley vd. 2013, Burgess vd. 2014, Liu vd. 2020). Bu sporlar, süt ve süt ürünlerinin işlendiği koşullarda gerçekleşen ısı uygulamalarında içsel direnç mekanizmalarıyla sağ kalarak ve üretim ekipmanları üzerinde biyofilm oluşturarak son ürünün kontamine olmasına da sebep olurlar (Ryu vd. 2021).

Süt ürünlerinden sıklıkla izole edilen bu spor üreticileri genellikle *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus* ve *Paenibacillus* cinsine ait üyelerdir (Xu ve Coté 2003, Fritze 2004, Burgess vd. 2010). Süt ve süt ürünlerinin bozulma sebeplerine yönelik araştırmalarda, *Bacillus subtilis*’in sütün bozulmasına yol açan ve sıcaklığa dayanıklı lipolitik enzimler ürettiği belirlenmiştir (Schmidt-Dannert vd. 1997, Chen vd. 2003). Üstelik bu termostabil enzimler pastörizasyon ve termizasyon işlemleri için kullanılan sıcaklık aralığı olan 60 ila 75°C arasındaki sıcaklıklarda optimum aktivite göstermektedirler (Schmidt-Dannert vd. 1997, Chen vd. 2003).

Firmicutes filumuna ait *Bacillaceae* ve *Anoxybacillaceae* familyaları; endospor üreticisi, aerobik veya fakültatif anaerobik, basil (çubuk) şeklinde, fenotipik açıdan geniş çeşitlilikteki Gram pozitif veya Gram değişken (variable) cinsleri kapsayan kalabalık bir bakteri grubudur (Logan ve De Vos 2011, Chuvochina vd. 2023, Patel vd. 2024). Bu

aileye mensup üyeler, termofilik, psikrofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik habitatlar da dahil olmak üzere doğada çok çeşitli karasal ve sucul ortamlarda yaygın olarak bulunan toprak kaynaklı mikroorganizmalardır (Coorevits vd. 2012, Logan ve De Vos 2015). Yıllar boyunca yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda, özellikle *Bacillaceae* ailesine mensup üyelerin, toprak, sediment ve havada bulunduğu kanıtlanmakla beraber, Kennedy Uzay Merkezi'ndeki temiz odalarda ve hatta insan kanı gibi alışılmadık ortamlarda bulunabildikleri de belirlenmiştir (Bottone 2010, Vaishampayan vd. 2010, Seiler vd. 2013). Ayrıca, *Bacillaceae* ve *Anoxybacillaceae* ailesi üyelerine, tatlı su ve deniz ekosistemleri, çamur, çeşitli insan ve hayvan sistemleri, gıda maddeleri (fermente gıdalar dahil), kompost ve kaplıcalar gibi sistemler ile tuz gölleri gibi ortamlarda da rastlanmıştır (Márquez vd. 2011, Schmidt vd. 2011, Hoyles vd. 2012). Son yıllarda yapılan taksonomik revizyonlarla beraber, *Bacillaceae* ailesine ait termofilik üyelerin birçoğu *Anoxybacillaceae* olarak adlandırılan yeni bir aileye taşınmış olup, üyelerin cins isimlendirmeleri de değişmiştir (Chuvochina vd. 2023, Patel vd. 2024)

Bu sporlu basiller, besin eksikliği başta olmak üzere çeşitli çevresel fiziksel ve kimyasal streslere maruz kaldıklarında spor oluşturma özelliğini sergilerler (Doyle vd. 2015). Mikroorganizmanın zorlu koşullar altında hayatta kalmasını sağlayan bu spor yapıları, kimyasallara (Russell 1990), pH ve sıcaklık değişimlerine (Blocher ve Busta 1983), ozmotik şoka ve ultraviyole ışınlarına (Roberts ve Hitchins 1969) karşı doğal bir direnç göstermektedir. Çevresel koşullar gelişim ve büyüme için uygun hale geldiğinde, sporlar çimlenme olarak bilinen aşamaya geçerek yeniden vejetatif yaşam formuna dönüşürler (Russell 1990).

Bacillaceae ve *Anoxybacillaceae* üyeleri, zorlu endüstriyel işlemlerde yüksek pH ve sıcaklık değerlerine dayanıklı enzimler üretebildiklerinden çok sayıda fayda da sağlamaktadırlar (Sharp vd. 2021). Yüksek talep gören bu enzimatik ürünlerin birçoğu, sporlu basiller kullanılarak yapılan endüstriyel fermantasyon süreçleri sonucunda düşük maliyetle kısa süre içerisinde üretilmektedir. Ayrıca, ilaç, farmakoloji, tarım, ambalajlama ve atık yönetiminde yararlı olabilme potansiyeli taşıyan ve mikrobiyal hücrenin dışına salgıladıkları ekstraselüler maddeler (EPS) de barındırmaktadırlar (Vert vd. 2012). Bu aileye mensup üyelerinin termostabil enzimleri, endüstriden yüksek talep

gören hücresel ürünler ile biyofilm yapılarında bulunan ve biyoteknolojik önem arz eden mikrobiyal hücre dışı maddeleri başta olmak üzere bu faydaları ile oldukça ilgi çeken ve sıklıkla çalışılan bir mikroorganizma grubu olarak bilinirler (Radchenkova vd. 2011).

Tüm bu belirtilen faydalarına karşın, içme suyu boru sistemleri, jeotermal enerji santralleri, sıcak su sondaj boruları ve hatlarının iç yüzeyleri, süt ve süt ürünleriyle temas eden yüzey ve ekipmanlar, meyve suları veya glikoz şuruplarının üretiminde kullanılan paslanmaz çelik fermentörler gibi çeşitli insan yapımı habitatların yaygın kontaminatları oldukları için endüstriyel süreçler için bir o kadar da risk teşkil etmektedirler (Etoa ve Michiels 1988, Flint vd. 2001).

Sporulasyon, spor oluşturan Firmicutes'in olumsuz çevresel koşullara dayanabilmesini, dünyaya ve hatta potansiyel olarak uzaya yayılmasını sağlayan önemli bir hayatta kalma mekanizması olarak bilinir (Setlow 2006, Horneck vd. 2010). Hücre bölünmesiyle doğrudan ilişkili bir süreç olup, çok sayıda regülasyon noktasıyla kontrol edilmektedir (Veening vd. 2009). *Bacillus subtilis* üzerinde yapılan çalışmalar sayesinde sporulasyon sürecinin 500'den fazla genetik determinantla ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Sporulasyon süreciyle alakalı genler Evre 0'dan Evre VI'ya kadar çeşitlendirilen farklı ekspresyon zamanları ile karakterize edilmektedir (Galperin vd. 2012).

Gıda endüstrisinde kullanılan sanitasyon ve temizlik stratejileri, oluşan biyofilm yapısının kontrolü için kullanılan temel giderim süreçlerini kapsamaktadır (Huang vd. 2019). Süt ve süt ürünlerinin üretildiği ve işlendiği ortamlarda kullanılan temizlik prosedürleri içerisinde yer alan "Yerinde Temizlik" (Cleaning-In-Place) işlemleri mikrobiyal yükün azaltılmasına yönelik kullanılan temel bir stratejidir (Peng vd. 2002, Bremer vd. 2006). Bu sanitasyon stratejisi, organik ve inorganik kontaminantları ortamdan uzaklaştırarak, yüzey üzerindeki canlı mikroorganizma oranının %99'a kadar giderilmesini sağlayacak şekilde tasarlanmıştır (Vlková vd. 2008). Yerinde Temizlik sistemlerinin amacı, temizlik için gereken süreyi kısaltarak, deterjan ve dezenfektanların daha uygun konsantrasyonlar ve sıcaklıklarda kullanılmasını ve solüsyonların geri kazanılmasını sağlayarak, maliyeti düşürecek şekilde ekonomik bir optimizasyon prosedürü sunmaktır (Gracia ve Diaz, 2011, Thomas ve Sathian 2014). Fakat bu sürecin en büyük handikaplarından biri,

biyofilm oluşturan hücrelerin (vejetatif ve spor hücreleri) kullanılan bu kimyasallar içerisinde canlılıklarını devam ettirebiliyor olmalarıdır. Örneğin, süt ve süt ürünleri endüstrisinde sıklıkla kullanılan geleneksel yerinde temizlik yöntemleri, oluşan biyofilm yapılarının tamamen giderilmesinde başarılı olamamıştır (Bénézech ve Faille 2018). Geleneksel, güçlü asidik ve bazik formülasyonlar uygulanarak yapılan yerinde temizlik çalışmalarının da *B. cereus*, *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* biyofilmlerini tamamen ortadan kaldırmadığı görülmüştür (Bremer vd. 2006, Kumari ve Sarkar 2014, Karaca vd. 2022b).

Sahip oldukları tüm bu yetenekler sebebiyle, sporlu basiller süt ve süt ürünlerinin üretildiği ve işletildiği ortamlarda hayatta kalabilmekte olup ortamdan uzaklaştırılmaları zorlu bir süreçtir.

2.2 Bacillaceae Ailesi

Firmicutes filumunun isimlendirmesi 2021 yılında değiştirilerek *Bacillota* olmuştur. Firmicutes filumunda homotipik ve heterotipik eş anlamlı olarak kullanılan 9 farklı isimlendirme mevcuttur (Parte vd. 2020). Bunların tamamı Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Firmicutes filumunun yıllar içerisinde kabul gören isimlendirmeleri

İsimlendirme	Eş anlam/ Yayın
<i>Endobacteria</i> (Cavalier-Smith 1998, Cavalier-Smith 2020)	Heterotipik eş anlam, geçerli yayını yok
<i>Eurybacteria</i> (Cavalier-Smith 1998)	Heterotipik eş anlam, geçerli yayını yok
<i>Thermodesulfobiota</i> (Frolov vd. 2023)	Heterotipik eş anlam, ICNP*’de geçerli yayını var
<i>Bacillota</i> (Whitman vd. 2018)	Homotipik eş anlam, geçerli yayını yok
<i>Bacillaeota</i> (Oren ve Garrity 2015a)	Homotipik eş anlam, geçerli yayını yok
<i>Bacillota</i> (Oren ve Garrity 2021)	Homotipik eş anlam, ICNP*’de geçerli yayını var
<i>Halanaerobiaeota</i> (Alsufyani 2018)	Heterotipik eş anlam, geçerli yayını yok

*ICNP: The International Code of Nomenclature of Prokaryotes

Bergey's Manual of *Archaea* and *Bacteria*'da řu ana kadar tanımlanmış tüm aileler ve cinsler yer almaktadır (Rainey vd. 2015). Bu başucu eserinde yer alan *Bacillaceae* ailesine ayrılmış olan bölümünde yapılan tanım; “*Bacillus* ve diğerk 18 cinsi içerisine alan bu aile, 16S rRNA gen dizilerinin filogenetik analizlerine bağılı olarak oluşturulmuştur. oğunluğu, Gram-pozitif hücre duvarı yapısına sahip ve endospor oluşturma özelliğinde, aerobik veya fakültatif anaeorbik kemo-organotrofik çubuklardır” şeklinde-dir (Logan ve De Vos 2011). Ayrıca tanımlama, bu özelliklerinin istisnaları da mevcuttur şeklinde-dir olarak devam etmektedir.

Domain: Bacteria

Alem: Firmicutes

Sınıf: Bacilli

Takım: Bacillales

Aile: *Bacillaceae*

Aile: *Anoxybacillaceae*

Prokaryotik taksonomik sınıflandırma her geçen yıl yeni tür ve cins keşifleriyle güncellenmekte ve yenilenmektedir. Günümüzde tüm genom dizi verilerindeki muazzam artış nedeniyle Chuvochina ve arkadaşları (2023) ile Patel ve arkadaşlarının (2024) yaptıkları güncel çalışmalarla *Bacillaceae* ailesine ait cinslerin taksonomik sınıflandırılmasında büyük değişiklikler yapılmış olup, *Anoxybacillaceae* olarak isimlendirilen ikinci bir aile oluşturularak, termofilik özellikteki *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinsleri bu aile içerisinde yer almıştır. Özellikle cins, tür ve alttür tanımlarının yapıldığı güncel literatür incelendiğinde, Logan ve De Vos (2011)'un oluşturduğu listenin daha da kapsamlı bir hale getirildiğı görölmektedir (Parte vd. 2020, Gupta 2020, Chuvochina vd. 2023, Patel vd. 2024).

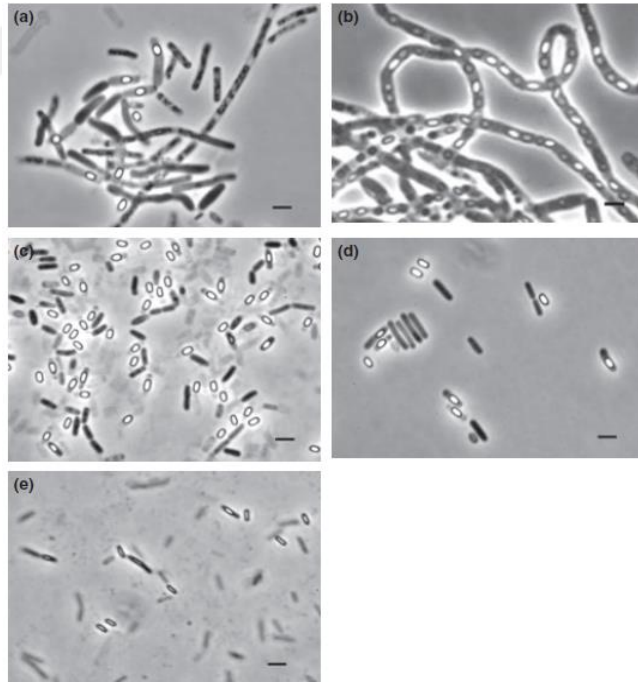
2.2.1 *Bacillus* cinsi

Cohn tarafından ilk defa 1872'de *Bacillus* olarak tanımlanan ve isimlendirilen bu cinsin üyeleri sınıflandırılırken zamanla ciddi düzenlemelere maruz kalmış, cinsle ilişkili birçok filogenetik grup yeniden oluşturulmuştur (Stackebrandt vd. 1994, Logan vd. 2009, Gupta

vd. 2020, Şekil 2.1). Çoğunlukla hücreler çubuk şekilli, düz veya hafif kıvrımlı, tekli veya ikili halde bazı durumlarda zincir oluşturabilen veya uzun filament yapılar halinde bulunabilmektedir (Logan ve De vos 2015). Gram pozitif veya sadece gelişmenin erken safhalarında Gram-pozitif olarak gözlenmektedir (Logan ve De vos 2015).

Özellikle son yıllarda yapılan araştırmalardan biri dikkat çekicidir. Gupta ve arkadaşlarının (2020) gerçekleştirdiği çalışmada, *Bacillaceae* ailesine dahil ve daha öncesinden *Bacillus* cinsine ait çoğu türün sadece taksonomik sınıflandırmaları değişmekle kalmayıp, üyelerin cins sınıflandırmaları da 16S rRNA genleri ve genomik dizileme verilerine göre yeniden revize edilmiştir.

Süt tozlarının ana bakteriyel kontaminantları olarak çoğunlukla *Bacillus* cinsine ait türler bilinse de *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinslerine ait üyeler de önemli birer kontaminant kaynağı olarak tanımlanmaktadır (Sadiq vd. 2018).



(Bar çubuğu 2 µm'yi göstermektedir.)

Şekil 2.1 *Bacillus* türlerinin faz kontrast mikroskobu görüntüleri a) *Bacillus cereus*, b) *Bacillus thuringiensis*, c) *Bacillus licheniformis*, d) *Bacillus subtilis*, e) *Bacillus pumilus* (Logan 2012).

2.3 *Anoxybacillaceae* Ailesi

2023 yılında Chuvochina ve arkadaşlarının artan tüm genom dizi bilgileriyle gerçekleştirdikleri çalışmayla beraber, daha önceden *Bacillaceae* ailesine ait bazı termofilik üyelerin taksonomik sınıflandırması değişmiş ve yeni bir aile olarak kabul edilen *Anoxybacillaceae* ailesi içerisine dahil edilmişlerdir. Chuvochina ve arkadaşlarının (2023) yürüttüğü bu araştırmada, sırasıyla bakteri ve arke genomlarının %58 ve %93'ü yeniden sınıflandırılmıştır (Parks vd. 2018, Rinke vd. 2021, Chuvochina vd. 2023, Patel vd. 2024). Sonrasında ise Patel ve arkadaşlarının (2024) yürüttükleri son taksonomik revizyon çalışmasıyla beraber, pek çok termofilik basil cinsin sınıflandırması değişmiş olup, *Parageobacillus* (Aliyu vd. 2018), *Anoxybacillus* (Pikuta vd. 2000) *Geobacillus* (Nazina vd. 2001) *Saccharococcus* (Nystrand 1984), *Thermolongibacillus* (Cihan vd. 2014b), *Anoxybacteroides* (Patel vd. 2024), *Paranoxybacillus* (Patel vd. 2024) ve *Thermaerobacillus* (Patel vd. 2024) cinslerinin taksonomisi yeni oluşturulan *Anoxybacillaceae* ailesi altında yeniden sınıflandırılmıştır (Chuvochina vd. 2023).

2.3.1 *Anoxybacillus* cinsi

Süt üretiminin ve işletiminin yapıldığı ortamlardan izole edilen diğer bir cins olan *Anoxybacillus*'un Moskova'nın Pushchino yerleşkesinden izole edilen ilk temsilci türü Pikuta ve arkadaşları (2000) tarafından *Anoxybacillus pushchinensis* olarak adlandırılan ve 60°C'lik bir optimum gelişim sıcaklığına gereksinim duyan bir anaerobik termofildir. Cinse ait üyeler, Gram pozitif, çubuk şeklinde, fakültatif aerobik veya anaerobik, katalaz değişken, alkalifilik, alkalitolerant veya nütrofilik, termofilik ve kemoorganotrofik birer spor üreticisi basildir (Pikuta vd. 2000).

2.3.2 *Geobacillus* cinsi

2001 yılında Nazina ve arkadaşları tarafında yapılan cins tanımından bu yana, bu cinse ait üyeler de taksonomik olarak yeniden düzenlenmiştir. *Geobacillus* üyeleri Gram pozitif, çubuk şeklinde, zorunlu termofilik, aerobik veya fakültatif anaerobik, nütrofilik, kemoorganotrofik, katalaz değişken ve endospor üreticisi hücre yapısına sahiptirler

(Nazina vd. 2001). Zaman içerisinde genomik verilerin artışına bağlı olarak *Geobacillus* cinsine ait üyeler taksonomik revizyona uğramış, bir kısmı *Parageobacillus* isimlendirmesi alarak farklı bir cinse taşınmıştır (Aliyu vd. 2018, Patel vd. 2024).

Bu cinsin optimum gelişme sıcaklığı 50°C'nin üzerinde olup, *Geobacillus* cinsine ait türler, sıcak su kaynakları, petrol alanları, derin deniz sedimentleri, şeker rafineleri, süt ve süt ürünlerinin üretildiği fabrikalar gibi yüksek sıcaklık barındıran ortamlardan izole edilebilmiştir (Zarilla ve Perry 1987, Nazina vd. 2001, Marchant vd. 2002, Ronimus vd. 2003, Tai vd. 2004, Takami vd. 2004, Scott vd. 2007).

2.4 Süt ve Süt Ürünlerinde Sıklıkla Yer Alan Sporlu Basil Türleri

90'lı yılların başından bu yana yapılan çalışmalarla özellikle *Bacillus* cinsi başta olmak üzere *Bacillaceae* ve *Anoxybacillaceae* ailelerine ait cinslerin, gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip oldukları bilinmektedir (Montville 1982, Meer vd. 1991, Kalogridou-Vassiliadou 1992, Rosenkvist ve Hansen 1995, Hammer vd. 1995, Jensen 1999, Govan vd. 1999, Heyndrickx ve Scheldeman 2002). İlk olarak, bu basiller her ortamda bulunmaktadır. Bu durum çiğ gıda ve gıda içeriklerinde kullanılan ham maddelerden mevcudiyetlerini ortadan kaldırılmasını zorlaştırmaktadır ve sterilizasyon işlemi sonrasında yapılan doldurma ve paketleme aşamasında kolaylıkla bulaşı meydana gelebilmektedir. İkinci olarak, sterilizasyon ve pastörizasyon aşamalarında kullanılan ısıtma işlemler çoğunlukla vejetatif hücreleri öldürmek için yeterli olmakta fakat spor yapıların giderilmesi için yetersiz kalmaktadır. Son olarak da birçok spor yapısı adhezif özellikte olduğundan, üretim bandının ve üretimde kullanılan çeşitli ekipmanların yüzeylerine tutunmaları sonucu biyofilm yapısının oluşumuna neden olmaktadır (Heyndrickx ve Scheldeman 2002). Süt ve süt ürünleri içerisinde varlığı saptanan *Bacillaceae* ve *Anoxybacillaceae* ailesine mensup üyelerden,

- *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus smithii* gibi birçok ***Bacillus*** türünün (Scheldeman vd. 2002, Te Giffel vd. 2002, Rückert vd. 2004, Scheldeman vd. 2005, Durak vd. 2006, Huck vd. 2007, Ranieri vd. 2009, Reginensi vd. 2011, Postollec vd. 2012, Seale vd. 2012, Dhakal vd. 2013, Di pinto vd. 2013, Lücking

vd. 2013, Zhao vd. 2013, Burgess vd. 2014, Masiello vd. 2014, Buehner vd. 2015, Sadiq vd. 2016a,b, Zain vd. 2016, Flint vd. 2017, Martinez vd. 2017, Júnior vd. 2018a,b, Mugadza ve Buys 2018, Li vd. 2019),

- *Anoxybacillus flavithermus* başta olmak üzere birçok ***Anoxybacillus*** türünün (Reginensi vd. 2011, Postollec vd. 2012, Lücking vd. 2013, Zhao vd. 2013, Burgess vd. 2014, Rückert vd. 2004, Sadiq vd. 2016a, Li vd. 2019)
- *Geobacillus stearothermophilus* başta olmak üzere birçok ***Geobacillus*** türünün (Rückert vd. 2004, Scheldeman vd. 2005, Seale vd. 2012, Lücking vd. 2013, Zhao vd. 2013, Burgess vd. 2014, Buehner vd. 2015, Sadiq vd. 2016a, Li vd. 2019) gerek klasik kültürel gerekse de moleküler tekniklerle süt ve süt ürünlerindeki varlıkları tespit edilmiştir.

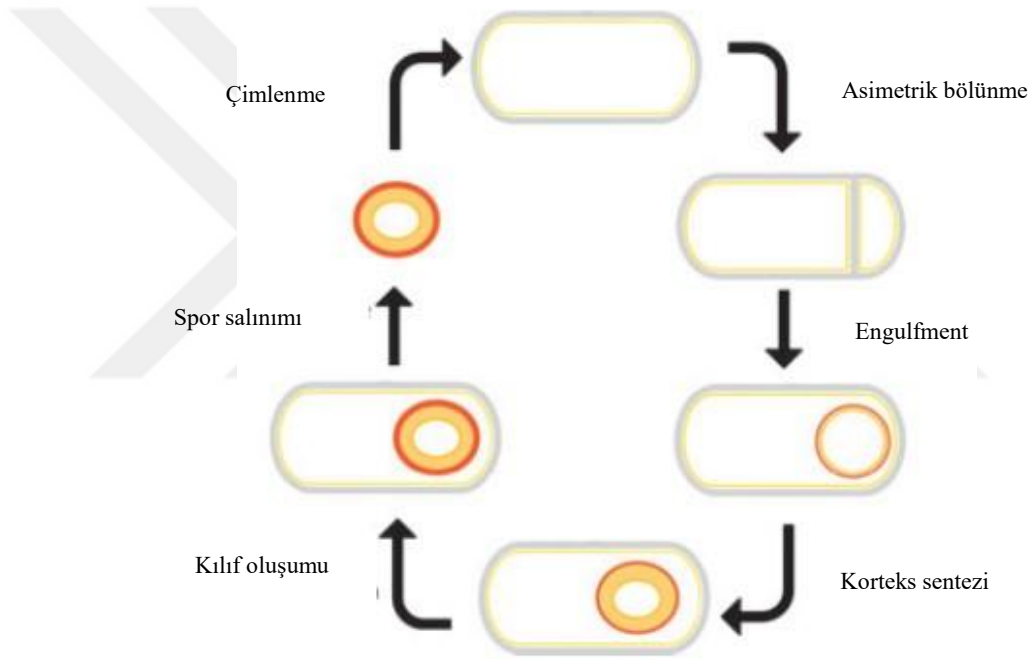
Süt ve süt ürünlerinde mikrobiyolojik ve moleküler biyolojik yöntemlerle sıklıkla tespit edilen *Bacillaceae* ve *Anoxybacillaceae* ailesine ait basillerin özellikle spor ve biyofilm yapısı oluşturma, yüksek ısıya dayanabilme ve süt varlığında iyi gelişebilme karakterleri nedeniyle mevcut literatürde süt kontaminantı olan sporlu basiller olarak kabul edilirler.

2.5 Spor Kavramı ve Oluşum Mekanizması

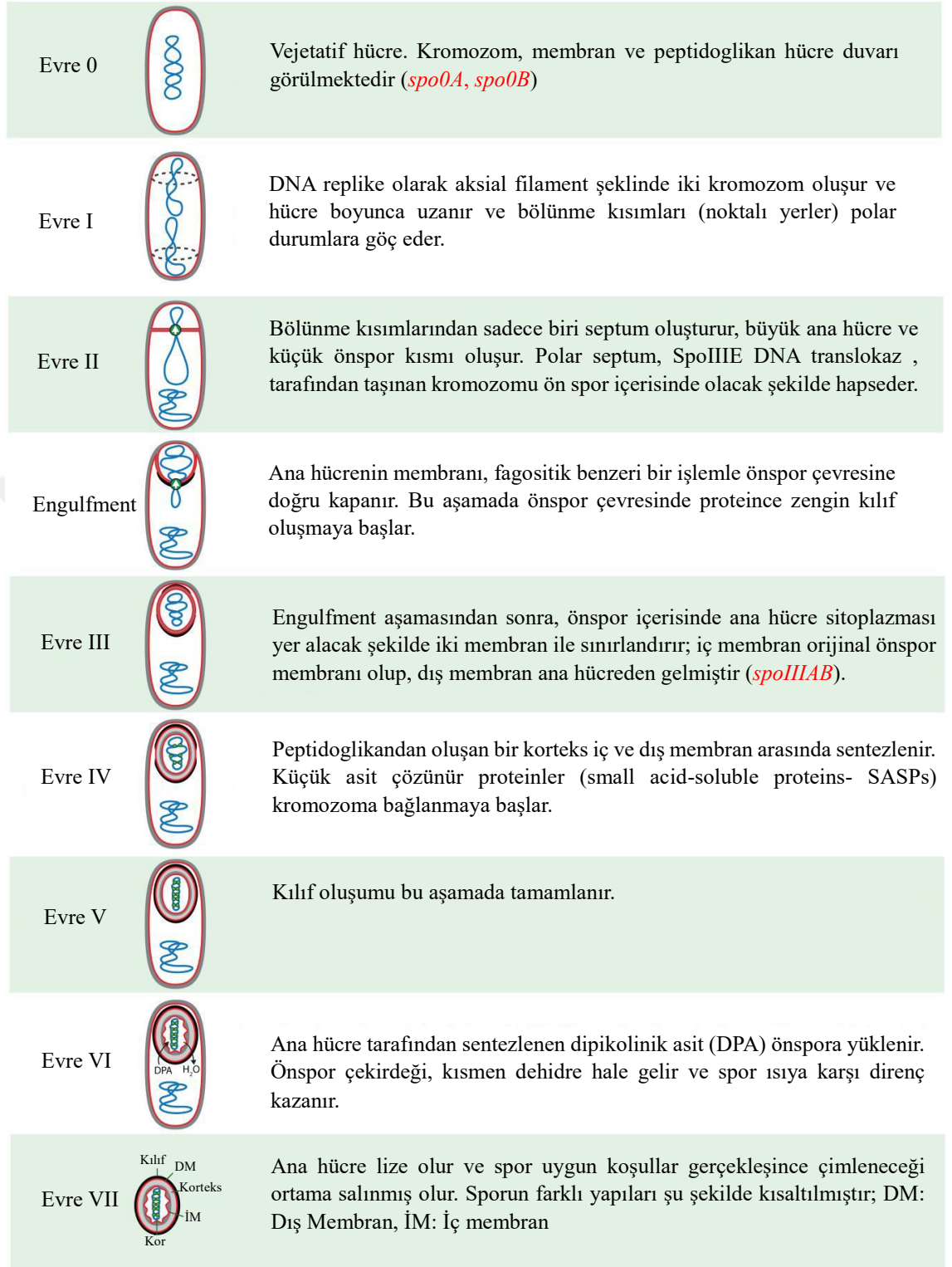
Firmicutes filumunda yer alan birçok cins, gelişmelerine olanak sağlamayan çevre koşullarıyla karşılaştıklarında sporlar oluşturmaktadırlar (Swick vd. 2016, Setlow vd. 2019, Christie ve Setlow 2020). Bu bakteriler, besin kıtlığına morfolojik olarak farklı bir hücre formu olan endospor oluşturarak yanıt vermektedirler (Higgins ve Dworkin 2012). Bu süreç sporulasyon olarak adlandırılmaktadır. Robert Koch (Koch 1876) ve Ferdinand Cohn'un (Cohn 1876) 19. yüzyıldaki yürüttükleri temel çalışmalardan bu yana mikrobiyolojik incelemelerin ana konusu olmuşlardır (Higgins ve Dworkin 2012). Endospor, aşırı sıcaklıklara, kuraklığa, radyasyona ve hatta antibiyotikler de dahil olmak üzere pek çok kimyasal ajana karşı direnç göstererek yıllar boyunca sağ kalabilmektedir (Cortesao vd. 2019, Setlow 2019)

Sporlar, çoğalan hücrelere nazaran mikroskopik açıdan daha farklı görünürler (Higgins ve Dworkin 2012). Bu morfolojik farklılaşma, hücrenin bir kutbuna yakın asimetric bir

bölünme ile başlar ve daha küçük bir hücre olan ön sporun ve daha büyük bir hücre olan ana hücrenin oluşmasıyla sonuçlanır (Higgins ve Dworkin 2012). Sporulasyon sırasında oluşan septum, normal, orta hücre bölünme septumuna benzemekle beraber aynı şekilde oluşmamaktadır. Sporulasyon septumunda iki bölmeyi ayıran daha ince bir peptidoglikan tabakası da oluşmaktadır (Şekil 2.2 ve 2.3, Higgins ve Dworkin 2012). Çok sayıda protein spesifik olarak bu septumda lokalizedir ve bunlardan bazıları septumun yalnızca bir tarafında bulunur. Tamamlanmanın ardından septum bükülmeye başlar ve oluşan küçük önspor tamamen ana hücrenin içerisinde kalır (Şekil 2.2 ve 2.3, Higgins ve Dworkin 2012).



Şekil 2.2 Sporulasyon (Higgins ve Dworkin 2012)



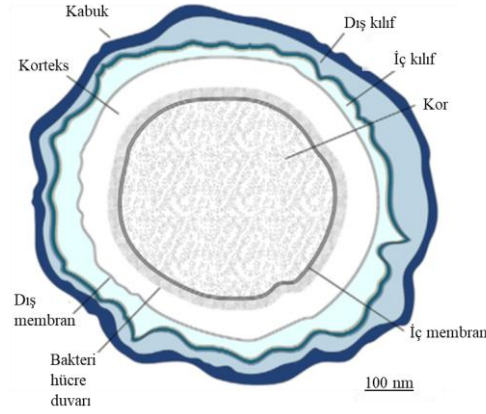
Şekil 2.2 Sporulasyon aşamaları (Riley vd. 2022)

Normal vejetatif hücre büyümesi, spor oluşumu açısından aşama 0 olarak tanımlanmaktadır. Bu aşamayı, vejetatif hücrenin asimetrik hücre bölünmesi geçirerek,

iki bölme oluşturduğu ve daha küçüğü önspor olarak adlandırılan, septum tarafından ayrılan bir aşama olan **Aşama III** takip etmektedir. Hücre DNA'sının bir eksenel filament olarak oluşmasıyla belirlenen aşama I, başlangıçta Ryter (1965) tarafından tanımlanmış olsa da artık bir aşama olarak kabul görmemektedir (Piggot ve Coote 1976, Errington 1990). **Aşama III**'te, prespor ana hücre tarafından yutularak iç ve dış önspor zarları ile sınırlanmış bir hücre olan foresporu oluşturur. **Aşama IV**, iç ve dış önspor zarları arasında bulunan peptidoglikan (PG) tarafından oluşturulan spor korteksini meydana getirirken; b durumu **Aşama V**'te spor kabuğu oluşumunu takip eder. **Aşamalar IV ve V** sırasında, ana hücre ayrıca çok miktarda spor özgül bir molekül olan piridin-2,6-dikarboksilik asit (dipikolinik asit (DPA)) sentezler. Bu, foresporda birikir ve forespor su içeriğinde azalmaya neden olur. Spor olgunlaşması, kabuk malzemesinin daha yoğun görünüm kazandığı **Aşama VI**'da gerçekleşir. Son **Aşama (VII)**, vejetatif hücre lizisini ve olgunlaşmış spor yapısının salınımını gösterir. Olgun spor yapısı, koşullar tekrar vejetatif hücre oluşumu için uygun hale gelene kadar dormant mikroorganizmayı dış etkenlerden korur (Leggett vd. 2012).

Tüm bu karmaşık yolaklardan sonra oluşan spor yapısı, **küçük asit-çözülür proteinlerle** (Small Acid Soluble Proteins-SASP) sıkı bir şekilde paketlenmiş olan kromozomal DNA'yı içerir. Önspor yapısını saran proteinler, kor yapısını çevrelemekte ve peptidoglikan zengin korteks yapısı ise bu membran yapıyı çevrelemektedir (Higgins ve Dworkin 2011). Korteksi çevreleyen spor kılıfının iç ve dış katmanları ana hücre tarafından üretilen 80'den fazla proteine ev sahipliği yapmaktadır (Higgins ve Dworkin 2011). *B. subtilis* dışındaki bazı spor üreticisi türlerde ise spor yapısı ekzosporiyum ve S-tabakası (Örn; *B. anthracis* (Laaberki vd. 2011)) gibi ek yapılarla çevrelenmiştir (Higgins ve Dworkin 2011).

Sporulasyon süreci sonunda oluşan bu sporlar ana hücreden lizis yoluyla ayrılarak ortama salınırlar (Cortesao vd. 2019, Setlow ve Johnson 2019, Setlow 2019).



Şekil 2.3 Dormant yapıdaki *B. subtilis* sporunun tabakaları (Christie ve Setlow 2020)

Sporun direncini ve hayatta kalma stratejisini yüksek oranda etkileyen spor yapısı içerisinde en önemli olan kısımlar aşağıdaki gibi maddelendirilebilir (Şekil 2.5);

- 1- Spor iç katmanlarını birçok kimyasal ve enzimden koruyan dış kılıf yapısı,
- 2- Spor korteksinde bulunan peptidoglikan yapı (kor hücre duvarının dışında bulunmakla beraber, kor yapısı içerisinde bulunan su miktarını bazı türlerde hücrenin %25 gibi düşük bir oranda azalmasını sağlamak ve hücreyi korumaktadır),
- 3- İç membranların düşük geçirgenliği,
- 4- Şelatlanmış dipikolinik asit (DPA) oranının divalent katyonlarla (çoğunlukla Ca^{+2} (CaDPA) iyonları) oranının 1:1 olması,
- 5- Spor DNA'sının düşük moleküler ağırlığa sahip koruyucu proteinlerle paketlenmesi (Christie ve Setlow 2020).

Tüm bu özelliklere sahip spor yapıları, ortam koşulları elverişli hale geldiğinde yeniden metabolik olarak aktive edilir ve hücre çimlenmesi olarak bilinen bir aşamaya geçerek hücre tekrar gelişme döngüsüne geçmek için vejetatif hücre oluşturur (Leggett vd. 2012). Sporların sahip olduğu tüm bu direnç profilleri ile spor oluşumu sırasında geçirdikleri karmaşık moleküler süreçler, geçmişten bugüne dek dikkat çekmektedir. Bu bağlamda tez kapsamında seçilen sporulasyon genlerinin rolleri Bölüm 2.7'de detaylandırılmıştır.

2.6 Prokaryotlarda Taksonomik Sınıflandırma

Mikrobiyolojide tür tanımı ve taksonomik sınıflandırma, genel tür tanımı ve sınıflandırmanın aksine daha karmaşıktır. 80'li yılların ortasından bugüne kadar gerçekleştirilen DNA tabanlı dizi analizleri, özellikle mikrobiyolojik tür tanımlarında büyük değişikliklere neden olmuştur. DNA-DNA hibridizasyon teknolojisinin keşfedilmesinden ve uygulanmasından günümüze kadar tüm genom verilerindeki devasa artış, prokaryotların taksonomik sınıflandırmalarında da büyük değişiklikler oluşturmuştur.

Taksonomi genel olarak sistematik olarak bilinen yapılandırmaların bütünü olup geleneksel olarak üç kısma ayrılmaktadır (Cowan 1968, Staley ve Krieg 1984, Vandamme vd. 1996);

- I. Sınıflandırma; organizmanın benzerliğine göre taksonomik gruplandırmaların yapılması,
- II. İsimlendirme; sınıflandırılan birimlerin etiketlenmesi ve
- III. Bilinmeyen organizmanın teşhisi; organizmanın yapılandırılan sınıflandırma içerisinde yer alıp almadığının belirlenmesi.

Modern biyosistematigi tamamlamak için filogeni ve polifazik yaklaşım olarak bilinen iki farklı klasik ve moleküler taksonomi alanı tanımlanmaktadır. Geçmiş yıllarda, 16S rRNA ve 23S rRNA dizi verileriyle ortaya çıkan filogenetik ilişkilerle yapılan bakteriyel sınıflandırmanın, bakteriler arasındaki doğal ilişkiyi mümkün olduğu kadar doğru bir şekilde yansıtması gerekliliği geçerli bir kuram haline gelmiştir (Woese 1987, Vandamme vd. 1996). Fakat bilimsel süreçte bu durum değişerek, çalışmaların tüm dengeli bir yaklaşımla oluşturulması amacıyla ilk olarak cins bazında evrimsel süreçte korunaklı gen bölgelerinin seçilmesi kabul görmüştür. Artık günümüzde tüm genom dizilemesi ve ANI (Average Nucleotide Identity) değerlerini de kapsayan yeni nesil dizileme teknolojilerine de bağlı olarak, taksonomideki gelişimler de tanımlanma yeni bir türün kriteri olarak altın standart şeklinde kabul edilmektedir.

2.7 Taksonomik Çalışmalarda Moleküler Saat Olarak Kullanılan Genler

2.7.1 16S rRNA geni

Mikrobiyolojide DNA dizi benzerliği, kemotaksonomik, fenotipik, serolojik ve biyokimyasal çalışmalarla birlikte tür tanımlamalarında bir standart olarak kabul görmüştür (Stackebrandt ve Goebel 1994). Bunlardan sıklıkla kullanılan **16S rRNA** gen dizilemesi, bakteri ve arkelerin filogenetik ilişkilerini belirlemede önemli bir araçtır (Stackebrandt ve Goebel 1994).

16S rRNA gen dizisi ilk kez 1985 yılında filogenetik analizlerde kullanılmıştır (Lane vd. 1985). 16S rRNA gen bölgesi, mikroorganizmaların filogenetik özelliklerini belirlemede gerekli olan hiper-değişken bölgeleri ve primer tasarımı için korunmuş bölgeleri içermesi nedeniyle bakteriyel topluluk analizlerinde en sık kullanılan belirteç gen halini almıştır (Tringe ve Hugenholtz 2008).

Tam uzunluktaki bir 16S rRNA gen dizisi, yüksek derecede korunmuş bölgelerle ayrılmış toplam 9 hiper-değişken bölgeden oluşmaktadır (Baker vd. 2003, Wang ve Qian 2009). Ancak, bu diziler oldukça korunmuş olduğu için, yakın ilişkili türler arasında sunduğu çözünürlük sınırlıdır (Stackebrandt ve Goebel 1994). Dolayısıyla %97'den fazla benzerliğe sahip türlerin ayırt edilmesi zor olabilmektedir (Stackebrandt ve Goebel 1994). Bu nedenle, filogenetik analizlerde tam gen dizilerinin kullanılması gerekmekte, aksi takdirde hiper-değişken bölgelerdeki mutasyonlar evrimsel ilişkileri bulanıklaştırarak yanlış yorumlara yol açabilmektedir (Stackebrandt ve Goebel 1994). Ayrıca 16S rRNA gen dizileri, 16S rRNA operonları ve suş içerisindeki rekombinasyonlar nedeniyle yanıltıcı olabilmektedir (Gürtler ve Mayall 2001). Bu sebeple, son yıllarda mikrobiyolojik teşhiste önemli bir standart olarak kabul gören 16S rRNA gen dizilemesi, yerini evrimsel olarak korumuş diğer korunmuş aday genlerin kullanımına da gereksinim duymaktadır.

Geobacillus ve *Bacillus* tip suşlarının ve izolatlarının 16S rRNA gen hizalamaları durumunda, benzerlik %90 ila %100 oranında elde edilmekte ve Zeigler (2005)'in de

belirttiği üzere, *Geobacillus* tip suşları içerisindeki 16S rRNA gen dizi benzerliği %95'ten fazla görülmektedir (Meintanis vd. 2008). 16S rRNA geni modern bakteriyel sınıflandırma için hala bir standart olarak kabul görmesine karşın, yakın akraba olan takson ve suşların ayrımı için sınırlı bir çeşitlilik gösterdiği de bilinmektedir (Nübel vd. 1996). Diğer yandan protein kodlayan genler daha yüksek genetik farklılık göstermekle birlikte, yakın ilişkili cinslerin sınıflandırılmasında kullanılmaktadır (Ko vd. 2003, Bavykin vd. 2004, Konstantinidis ve Tiedje 2005, Zeigler 2005).

2.7.2 DNA bağımlı RNA polimeraz beta alt ünitesi (*rpoB*)

RNA polimeraz, transkripsiyonda görev alan ve tüm canlı organizmalarda gen ifadesini kontrol eden regülatör yolların son hedefi olan önemli bir enzimdir (Borukhov ve Nudler 2003). Bakterilerde RNA polimeraz, mRNA, rRNA ve tRNA'nın sentezlenmesinden sorumlu olmakla beraber, 400 kDa boyutuna sahip bu çekirdek enzim, α -dimer (α_2), β alt ünite, β' alt ünite ve ω alt ünitesi olmak üzere 5 adet alt ünite içermektedir (Adékambi vd. 2009). Bu alt üniteler, bir adet σ alt ünitesinin bağlanmasını izleyen aşamada holoenzim yapısına dönüşerek promotörle transkripsiyonu başlatır (Adékambi vd. 2009). RNA polimerazın katalitik aktivitesinin büyük çoğunluğu ***rpoB*** geni tarafından kodlanan β alt ünitesi ile gerçekleşir (Jin ve Gross 1989).

Bakterilerde *rpoB* geninin varlığı ilk defa Morse ve arkadaşları (1996) tarafından bildirilmiştir. Bu genin, evrimsel süreçteki varlığı, moleküler kronometre olarak potansiyelini gözler önüne sermektedir (Bocchetta vd. 2000). Temel bakteriyel genlerin yanı sıra, *rpoB* geni filogenetik analizler ve teşhiste öne çıkmıştır (Adékambi vd. 2009). Rowland ve arkadaşları (1993) tarafından yapılan klinik mikrobiyolojik çalışmalarda, *rpoB* gen dizisinin moleküler identifikasyonunda kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

rpoB geni, genom benzerliği belirleyicisi olarak güçlü bir aday olma özelliği taşımaktadır. Zira bu gen, RNA polimerazın β alt birimini kodlamakta ve filogenetik ve biyolojik çeşitlilik çalışmaları için 16S rRNA'ya alternatif olarak önerilmektedir (Drancourt ve Raoult 2002, Da Mota vd. 2004). Aynı zamanda bu gen tüm bakterilerde ortaktır,

genomda tek bir kopya olarak bulunur ve 16S rRNA genine benzer şekilde korunmuş ve değişken dizi alanlarından oluşan bir mozaik yapıya sahiptir (Meintanis vd. 2008).

2.7.3 DNA bağımlı RNA polimeraz alfa alt ünitesi (*rpoA*)

16S rRNA geninin taksonomik çalışmada sıklıkla kullanılmasına rağmen, yüksek seviyede korunaklı bölgeler içermesi nedeniyle çok yakın akraba türler arasında ayırım yapılmasının önüne geçmekte ve kullanımı sınırlamaktadır (Stackebrandt vd. 2002). Örneğin *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus oralis*'in 16S rRNA dizi benzerlik oranları (%99) çok yüksek olduğu için bu türler arasındaki ayırımın yapılması için yetersizdir (Suzuki vd. 2005). *rpoA* geni, RNA polimerazın diğer bir alt ünitesi olan α alt ünitesini kodlayan gen bölgesidir. Park ve arkadaşlarının (2010) *Streptococcus* sp. üzerinde *rpoA* gen bölgesini kullanarak yaptıkları taksonomik çalışmanın sonucunda, cins düzeyinde bahsi geçen gen bölgesinin güvenilir teşhis ve filogenetik ayrışmalarda kullanılabileceği belirtilmiş olup, aynı zamanda *Streptococcus* cinsi içerisinde yapılan tür ayrımlarında güçlü bir rol oynadığı kanıtlamıştır.

2.7.4 DNA giraz alfa alt ünitesi (*gyrA*)

İki alt üniteden (*gyrA* ve *gyrB*) oluşan DNA giraz, ATP-bağımlı reaksiyonuyla negatif süper-sarmalların oluşmasını sağlayarak ve DNA replikasyonun başlaması için önemli bir temel oluşturarak, DNA'nın uzamasında kritik bir rol oynar (Gellert vd. 1976, Barnes vd. 2003).

Bir housekeeping geni olan *gyrA*, DNA replikasyonu için temel olan ve tüm bakterilerde mevcut olan DNA giraz alt ünitesi α 'yı (alfa) kodlar (Cozzarelli 1980). *Bacillus* türleriyle yapılan tüm araştırmalarla, 16S rRNA geninden daha fazla filogenetik doğruluk sağladığı gösterilmiştir (Chun ve Bae 2000, Menard vd. 2016). Kısmi dizilemeyle sekansları belirlenen *gyrA* geni *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. subtilis*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, ve *B. vallismortis* dahil olmak üzere 7 farklı *Bacillus* suşunun filogenetik analizlerinin yapılmasında ve tür teşhisinde

kullanılmıştır (Chun ve Bae 2000). *gyrA* gen dizileri ayrıca *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens*'in tanımlanmasında ve bu iki yakın türün *rpoB* genine nazaran daha iyi bir şekilde ayrılmasını sağlamıştır (Chun ve Bae 2000). Ayrıca toprak ve domates fidesi köklerinden elde edilen örneklerde, *B. subtilis* türünün izolatlar arasındaki tür içerisindeki ayrımını ve dağılımını sağlamada *gyrA* kullanılarak başarı elde edilmiştir (Stefanic ve Mandic-Mulec 2009, Oslizlo vd. 2015, Liu vd. 2022).

2.7.5 DNA giraz beta alt ünitesi (*gyrB*)

DNA girazın diğer bir alt ünitesi olan giraz β altünitesini kodlayan ***gyrB*** geni çoğunlukla filogenetik belirteç olarak kullanılmaktadır (Tourova vd. 2010). Bazı bakteri gruplarında yapılan araştırmalarla *gyrB* geninde gerçekleşen baz çifti değişim oranının, DNA-DNA hibridizasyon oranıyla korelasyon gösterdiği (Suzuki vd. 2001, Wang vd. 2007) ve yatay gen transfer oranının ribozomal genlerle benzer olduğu açığa çıkarılmıştır (Kasai vd. 1998). *gyrB* dizilerinden tespit edilen evrim hızının, 16S rRNA gen dizilerinden tespit edilen hızdan daha fazla olduğu da kanıtlanmıştır (Yamamoto ve Harayama 1995).

gyrB gen dizilerinde kullanılan benzerlik analizleriyle, *Pseudomonas*, (Yamamoto ve Harayama 1995 ve 1998) *Bacillus* (Yamada vd. 1999), *Acinetobacter* (Yamamoto ve Harayama 1996) ve *Gordonia* (Kang vd. 2009) gibi pek çok cinse ait suşların başarıyla ayrımı sağlanmıştır (Tourova vd. 2010). Tüm bu çalışmalarla elde edilen sonuçlar, *gyrB* geninin, tür bazında yapılan filogenetik ve taksonomik araştırmalarda, filogenetik ilişkilerin aydınlatılmasında bir belirteç olarak kullanılması için uygun olduğunu göstermektedir (Yamamoto ve Harayama 1996 ve 1998, Yamamoto vd. 1999, Kasai vd. 2000, Niemann vd. 2000, Fukushima vd. 2002, Yanez vd. 2003, La Duc vd. 2004, Wang vd. 2007).

rpoB, *gyrA* ve *gyrB* benzeri housekeeping genleri, mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi için ideal adaylardır zira 16S rRNA geninden çok daha net bir şekilde filogenetik ayrımın yapılmasını sağlarlar (Chun ve Bae 2000, Kasai vd. 2000, Yamamoto vd. 2000, Hurtle vd. 2004, Stefanic ve Mandic-Mulec 2009, Stefanic vd. 2012 ve 2015, Levican vd. 2013, Menard vd. 2016). Birçok çalışma bakteriyel komünitelerdeki çeşitlilik analizlerinde

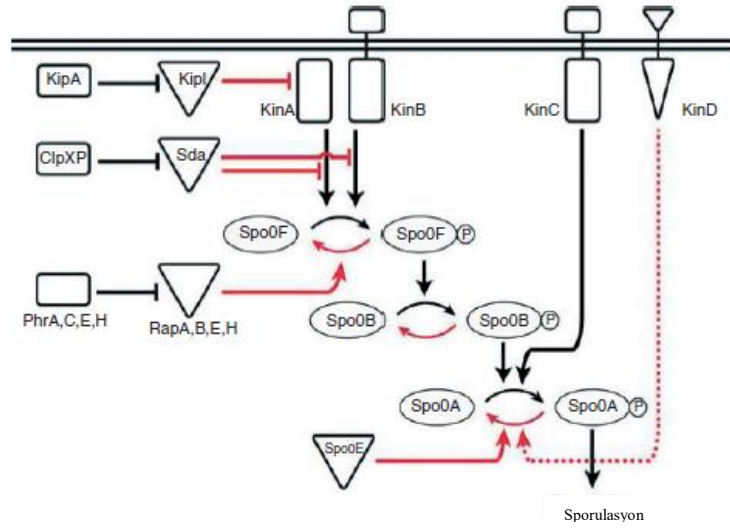
rpoB ve *gyrB* genilerini moleküler belirteç olarak kullanarak ve hedef bölge dizilemesi yaparak analiz etmişlerdir (Liu vd. 2022). Sonuçlar, bahsi geçen tüm bu housekeeping gen dizilerinin, bakteriyel komünitelerin belirlenmesinde 16S rRNA genine oranla daha doğru sonuçlar verdiğini göstermiştir (Vos vd. 2012, Poirier vd. 2018, Ogier vd. 2019).

2.7.6 Spor oluşumunda yer alan moleküler düzenleyiciler

2.7.6.1 Sporulasyon erken evre regülatörü (*spo0A*)

Sporulasyon başlangıcı, transkripsiyonun hem aktivatörü hem de baskılayıcısı görevi gören DNA bağlayıcı bir protein olan **Spo0A** tarafından yönetilir (Fawcett vd. 2000, Setlow 2007). Spo0A, fosforilasyon yoluyla aktive edilir (Hamon ve Lazazzera 2001) ve sporulasyon süreci başlamış olur. Fosforilasyon seviyesinin farklı durumlarında, biyofilm gelişminden (düşük seviyelerde fosforilasyon) sporulasyona (yüksek seviyelerde fosforilasyon) kadar bir dizi fizyolojik sonucu kapsar (Higgins ve Dworkin 2012, Şekil 2.6).

Spo0A~P ayrıca σ^F ve σ^E gibi forespor ve ana hücrenin doğrudan transkripsiyonunda rol oynayan spesifik regülatör proteinleri ifade eden genlerin ve operonların (*spoIIA*, *spoIIE*, *spoIIG*) transkripsiyonlarını direkt olarak kontrol etmektedir (Stragier ve Losick 1996). Spo0A ayrıca geçiş durumu regülatörü olarak görev yapan *abrB* geninin indirekt olarak baskılanmasını sağlayan belirli genlerin transkripsiyonunu da sağlamaktadır (Strauch vd. 1990, Fawcett vd. 2000).



Şekil 2.4 Spo0A aktivasyonu (Higgins ve Dworkin 2012)

Spo0A'nın fosforilasyonu, çeşitli kinazlar ve birçok ara faktörden oluşan bir fosforelay tarafından kontrol edilir. Şekil 2.5'te Spo0A fosforilasyonunu engelleyen etkileşimler ve fosforilasyona yol açan etkileşimler gösterilmiştir. Fosforelay'ın başlangıcında, KinA ve KinB kinazları henüz bilinmeyen sinyallere yanıt vererek otofosforilasyon yapar ve daha sonra fosfatı Spo0F'ye aktarır. Spo0F, fosfatı Spo0B'ye, ardından Spo0B'de Spo0A'ya iletir. Üçüncü bir kinaz olan KinC, fosforelay (yani Spo0F ve Spo0B'yi) atlayarak doğrudan Spo0A üzerine etki eder. Bir dizi fosfataz (RapA, B, E, H ve Spo0E) ve kinaz inhibitörü (Sda ve KipI) Spo0A fosforilasyonunu doğrudan veya dolaylı olarak engeller. Bu inhibitörler kendi içerisinde ayrı düzenlemelere tabii olduğu için yer verilmemiştir. KinD'nin Spo0A fosforilasyonuna karşı çalıştığı gösterilmiş, ancak bu düzenlemenin hangi adımda gerçekleştiği henüz belirlenememiştir (Kesikli çizgi, Şekil 2.5). Bu etkileşimler ağı, nihayetinde Spo0A'nın fosforilasyon durumunu temsil etmektedir (Higgins ve Dworkin 2012).

2.7.6.2 Sporulasyon erken evre regülatörü (*spo0B*)

Spo0A transkripsiyon faktörünün fosforillenmesiyle başlayan fosforil grubu aktarımı (phosphorelay), düzenleyici fosfotransferaz olan **Spo0B**'nin kritik bir rol almasıyla sporulasyon sürecini devam ettirir (Bird vd. 1993, Hoch 1993).

Mattoo ve arkadaşlarının (2008) *Bacillus anthracis* üzerinde yaptığı çalışmalarda, bakterinin hayatta kalma ve sporulasyonu üzerinde kritik bir rol oynadığı belirlenmiştir. Sporulasyon başlangıcında yer alan diğer genlerle birlikte kritik bir öneme sahip olan bu gen bölgesi, *Firmicutes* ailesi için bir moleküler saat adayı olarak da kullanılmaktadır (Wunderlin vd. 2013).

2.7.6.3 Sporulasyon III. Evre regülatörü (*spoIIIAB*)

Sporulasyon sürecinde, ilk olarak asimetric bir septum oluşarak, daha sonra spor haline gelecek bir ön spor ve bu kısmın gelişimine katkıda bulunan fakat sonradan yok olan bir ana hücre olmak üzere bakteri hücresi ikiye bölünür (Zeytuni vd. 2018). Bu aşamada, en az 9 protein görev alarak, önspor ve ana hücreyi birbirinden ayıran membran oluşumunu sağlar (Crawshaw vd. 2014). Ana hücrede tek bir *spoIIIA* operonu tarafından kodlanan bu proteinler (SpoIIIAA-AH) sigma faktörü σ^E ile kontrol edilmektedir (Illing ve Errington 1991, Guillot ve Moran 2007). *spoIIIAB* mutantıyla yapılan çalışmalarda, sporulasyon aşamasında gerçekleşen gen ekspresyonunun eksik olmasından kaynaklı içe doğru çökmüş yapıda sporların oluştuğu gözlenmiştir (Camp ve Losick 2009, Doan vd. 2009) olup, diğer dört kanal proteini olan SpoIIAD, SpoIIAE, SpoIIAF ve SpoIIAG ile beraber kompleks bir yapı içerisinde bulunmasına karşın, yürütülen tahmini yapısal analizlerde korunaklı bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir (Zeytuni vd. 2018). Zeytuni ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2018), SpoIIAB katlanmasıyla V-ATPaz'ın C altünitesindeki yapının benzerliğine dikkat çekilmiş olup, bu durumun ve hatta bakteriyel salgı sistemi ile enerji üretiminde görev alan hücresel mekanizmalar arasında yer alan moleküler görevlendirmede bir paylaşım dikkat çekilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Sporulasyon için belirlenen besiyeri içerikleri ve kombinasyonları (Çizelge 3.1) Karakaya (2019)'da daha önce anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1 Sporulasyon besiyeri kombinasyonları (Karakaya 2019)

TBL	DSM 1X	DSM 2X
TBL+ Glukoz	DSM 1X+ Glukoz	DSM 2X+ Glukoz
TBL+ Glukoz + L- glutamik asit	DSM 1X+ Glukoz+ L- glutamik asit	DSM 2X+ Glukoz+ L- glutamik asit

Çizelge 3.2 Triptik Soy Agar (TSA) Besiyeri içeriği

Triptik Soy Agar	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Kazein pepton (Trypton)	17 g	Merck 1.07213
Soya pepton	3 g	Fluka 70178
(D+) Glukoz monohidrat	2,5 g	Merck 1.08342
K ₂ HPO ₄	2,5 g	Sigma P8281
NaCl	5 g	Merck 1.06404
Agar	30 g	Condalab 1802
Distile su	1000 mL	
pH=7,3± 0,2		
İçerik 121 °C'de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.3 Bromkrezol Mor (BCP) Agar içeriği

BCP Agar	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Kazein pepton (Trypton)	5 g	Merck 1.07213
Maya özütü	3 g	Merck 1.03753
(D+) Glukoz monohidrat	2,5 g	Merck 1.08342
Süt tozu	2,5 g	Condalab 0230
Nişasta	5 g	Sigma 9005-84-9
Agar	30 g	Condalab 1802
Bromkrezol moru çözeltisi (%4)	1 mL	
Distile su	1000 mL	
pH=7,3± 0,2		
Bromkrezol Çözeltisi	g/L	
Bromkrezol moru	4 g	Merck 1.030250
%95'lik etanol	100 mL	Merck 1.00983
İçerik 121 °C'de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.4 Serum Fizyolojik

Serum Fizyolojik	100 mL (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
NaCl	0,85 g	Merck 1.06404
dH ₂ O	100 mL	
pH=7,0±0,2		
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.5 %10'luk Sodyum dodesil sülfat çözeltisi

%10 Sodyum dodesil sülfat	g/mL (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
Sodyum dodesil sülfat	10 g	Sigma L4390
dH ₂ O	100 mL	

Çizelge 3.6 10 mg/mL'lik Lizozim çözeltisi

10 mg/mL'lik Lizozim	10 mL (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
Lizozim	0,01 g	Sigma L6876
10 mM Tris- HCl	10 mL	

Çizelge 3.7 10 mM Tris-HCl Tamponu

10 mM Tris-HCl	100 mL	Kimyasal Marka ve Kodları
Trisma Base	0,12 g	Sigma T6066
dH ₂ O	100 mL	
pH=8,0±0,2		
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

3.2 Bakteri Kültürleri ve Gelişim Koşulları

Çalışma kapsamında referans türler ve izolatlar Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında bulunan -80°C stok kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Kültür koleksiyonundan, toplam 22 adet fakültatif termofilik ve mezofilik bakteri (*Bacillus* ve diğer cinsler) seçilerek, ideal gelişme sıcaklıkları olan 37°C'de geliştirilmiştir. Termofiller arasından ise toplam 24 adet bakteri belirlenerek (başta *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* olmakla beraber diğer cinslerin de dahil

olduğu) ideal koşullarda (Çizelge 3.8) geliştirilmiştir. İlerleyen çalışmalarda iç ve dış grup çaprazlamalarda kullanılmak üzere bakteri koleksiyonu geniş çeşitlilikte tutulmuştur. Dış grup olarak seçilen bakteriler, iki aileye özgü (*Bacillaceae* ve *Anoxybacillaceae*) tasarlanan primer- prob çiftlerinin farklı cinslere ait türlere bağlanmama özgüllüklerinin teyidi açısından çalışma kapsamına alınmışlardır. Tez çalışmaları devam ederken özellikle *Anoxybacillus* cinsi başta olmak üzere seçilen üç cins, kendi içerisinde taksonomik revizyonlara uğramış olup, tüm bakterilerin yeni taksonomik isimlendirmeleri parantez içinde belirtilerek Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8 Tez çalışmalarında kullanılan referans suşlar ve gelişim koşulları

İsimlendirme	Koleksiyon Kodu	Gelişme Koşulları (Besiyeri, pH, Sıcaklık)
<i>Anoxybacillus suryakundensis</i>	DSM 27374	TSA, 7,00 ±0,20, 55°C
<i>Anoxybacillus mongoliensis</i>	DSM 19169	
<i>Anoxybacillus tepidamans</i> (<i>Anoxybacteriodes tepidamans</i>)	DSM 16325	
<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> (hs. <i>Anoxybacillus ayderensis</i>)	DSM 14988	
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	NCIMB 13933	
<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i>	NCIMB 13971	
<i>Anoxybacillus ayderensis</i>	NCIMB 13972	
<i>Anoxybacillus kaynarcensis</i>	DSM 21706	
<i>Anoxybacillus amylolyticus</i> (<i>Anoxybacteriodes amylolyticum</i>)	DSM 15939	
<i>Anoxybacillus caldiproteolyticus</i> (<i>Thermaerobacillus caldoproteolyticus</i>)	DSM 15730	
<i>Anoxybacillus thermarum</i>	DSM 17141	
<i>Anoxybacillus voinovskiensis</i> (<i>Anoxybacteriodes voinovskiense</i>)	DSM 17075	
<i>Anoxybacillus rupiensis</i> (<i>Anoxybacteriodes rupiense</i>)	DSM 17127	
<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> hs. <i>A. ayderensis</i>	F81	
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	DSM 2641	
<i>Geobacillus toebii</i> (<i>Parageobacillus toebii</i>)	DSM 14590	
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	DSM 7263	
<i>Geobacillus vulcanii</i>	DSM 13174	

Çizelge 3.8 Tez çalışmalarında kullanılan referans suşlar ve gelişim koşulları (devamı)

İsimlendirme	Koleksiyon Kodu	Gelişme Koşulları (Besiyeri, pH, Sıcaklık)
<i>Geobacillus thermoglucosidans</i> (<i>Parageobacillus thermoglucosidans</i>)	DSM 2542	TSA, 7,00 ±0,20, 55°C
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	DSM 5366	
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	DSM 465	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 12980	
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 1971	TSA, 7,00 ±0,20, 37°C
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 13	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DSM 7	
<i>Bacillus halodurans</i> (<i>Halalkalibacterium halodurans</i>)	DSM 497	
<i>Bacillus clausii enterogermina</i> (<i>Shouchella clausii</i>)	-	
Dış grup patojenler ve diğer termofiller		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	TSA, 7,00 ±0,20, 37°C
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 26555	
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	DSM 10633	TSA, 7,00 ±0,20, 55°C
<i>Aeribacillus pallidus</i>	DSM 3670	

3.3 Seçilmiş Temsilci Basillerden Yüksek Miktarda Spor Üretimi, Sayımı ve Saflaştırılması

Çalışmada termofilik ve mezofilik basillerin tespitine yönelik yaklaşımların geliştirilmesi amaçlandığından, spordan DNA izolasyon çalışmaları için kullanılacak 3 adet cins ve 7 adet temsilci tür seçilmiştir (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9 Seçilen 7 temsilci referans suş ve izolatlar

Bakteri İsmi	Koleksiyon Numarası
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	DSM 2641 ^T
<i>Anoxybacillus kamchatkensis subsp. assacharedens</i> (hs. <i>Anoxybacillus ayderensis</i>)	F81
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	DSM 465 ^T
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 43223 ^T
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 1971 ^T
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 13 ^T
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DSM 7 ^T

Karakaya (2019)'da yer alan spor üretim optimizasyon koşulları kullanılarak, *G. stearothermophilus* ATCC 43223^T, *B. subtilis* DSM 1971^T, *B. licheniformis* DSM 13^T ve *B. amyloliquefaciens* DSM 7^T'in spor üretimlerinin gerçekleştiği ideal besiyeri içerikleri öncelikle 5 mL hacimlerde belirlenmiştir. Diğer seçilen temsilci termofilik 3 tür için ise Karakaya (2019)'da yer alan optimum besiyeri koşulları temel alınmıştır. Sonrasında her bir bakteri için belirlenen ideal besiyeri içeriği erinde 500 mL hacimde hazırlanarak yüksek hacimde spor üretimi gerçekleştirilmiştir. Karakaya (2019)'da yer alan spor toplama ve saflaştırma aşamaları gerçekleştirilmiş ve bunlara ek olarak *Bacillus* cinsine ait sporların saflaştırılması için 80°C'de sıcak su banyosunda 15 dakika süresince (Ceuppens vd. 2010, Hussain vd. 2020) ısıyla muamele sonrası, spor stokları elde edilmiştir. Elde edilen spor stokları 100 µL'lik hacimlere bölünerek, ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4 Biyoinformatik Çalışmalar

Tez çalışması kapsamında *Bacillaceae* ve *Anoxybacillaceae* ailesine ait üyelerin güncel bilgileri <https://lpsn.dsmz.de> sitesindeki uluslararası taksonomik sınıflandırma sisteminden faydalanarak ve Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'den elde edilmiştir (Logan ve De Vos 2009, Parte vd. 2020). Sonrasında, tüm tür adlarını kapsayan bu listelerden, *Anoxybacillaceae* ailesine ait *Anoxybacillus*, *Anoxybacteoides*, *Paranoxybacillus*, *Thermoeribacillus*, *Geobacillus* ve *Parageobacillus* cinsine ait olanların tamamı ile *Bacillaceae* ailesinden *Bacillus* cinsine ait olanların ise çok sayıda tür barındırması nedeniyle sadece süt ve süt ürünlerinden izole edilen türler çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm tür adları binomiyal bakteri isimlendirmesindeki güncel bilgiler dikkate alınarak Çizelge 3.10'da sunulmuştur. Buna göre *Anoxybacillaceae* familyasından 51 sayıdaki türün 8 genine ait diziler ile *Bacillaceae* familyasına ait 14 sayıdaki türün 8'er gen dizisi olmak üzere toplam 65 sayıdaki türün genleri primer/prob tasarımları için çalışma kapsamına dahil edilmiştir.

Her iki aileye ait cinslerin tüm genomun dizi verileri Database of the National Center for Biotechnology Foundation (NCBI) sitesinden temin edilmiştir (Wheeler vd. 2007).

Çalışma kapsamında kullanılan tüm genom veya gen dizilerinin sahip olduğu GenBank aksesyon kodlamaları Çizelge 3.11’de sunulmuştur.

Çizelge 3.10 Süt ürünleri kontaminantı oldukları bilinen ve tez çalışması kapsamında primer/prob tasarımlarında gen dizi bilgileri kullanılan mezofilik ve termofilik sporlu basiller

Tür ve Alt Türler	Güncel Taksonomik İsimlendirmeleri	IJSEM Dışındaki Tür Makalesi	IJSEM Tür Validasyon Makalesi	Kültür Koleksiyon Numaraları
<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>	<i>Anoxybacteriodes amylolyticum</i> (Patel vd. 2024)	Poli vd. 2006, Patel vd. 2024	Euzeby 2006b, Patel vd. 2024	DSM 15939, MR3C
<i>Anoxybacillus ayderensis</i>	-	Dulger vd. 2004	Euzeby 2005c	AB04
<i>Anoxybacillus bogrovensis</i>	-	Atanassova vd. 2008	Euzeby 2009a	DSM 17956; NBIMCC 8427
<i>Anoxybacillus caldiproteolyticus</i>	<i>Thermaerobacillus caldiproteolyticus</i> (Patel vd. 2024)	Coorevits vd. 2012	Euzeby 2012b, Patel vd. 2024	R-35652, U458
<i>Anoxybacillus calidus</i>	<i>Paranoxybacillus calidus</i> (Cihan vd. 2014, Patel vd. 2024)	Cihan vd. 2014	Oren ve Garrity 2014a	C161ab; DSM 25220
<i>Anoxybacillus contaminans</i>	<i>Anoxybacteriodes contaminans</i> (Patel vd. 2024)	De Clerck 2004	Euzeby 2004c, Patel vd. 2024	DSM 15866; LMG 21881
<i>Anoxybacillus eryuanensis</i>	-	Zhang vd. 2011	Euzeby 2011b	E-112; KCTC 13720
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	-	Pikuta vd. 2000	Anonymous 2001a	DSM 2641; WK1
<i>Anoxybacillus flavithermus subsp. flavithermus</i>	-	Dai vd. 2011	Euzeby 2011d	
<i>Anoxybacillus geothermalis</i>	Hs. <i>Anoxybacterioides rupiensis</i> (Inan Bektas vd. 2024, Patel vd. 2024)	Filippidou vd. 2016	Oren ve Garrity 2016, Patel vd. 2024	ATCC BAA-2555
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	-	Belduz vd. 2003	Euzeby 2004a	G2
<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i>	Hs. <i>A. ayderensis</i> (Inan Bektas vd. 2022)	Kevbrin vd. 2005, Inan Bektas vd. 2022	Euzeby 2006a	JW/VK-KG4
<i>Anoxybacillus kamchatkensis subsp. asaccharedens</i>	Gul-Guven vd. 2008, Hs. <i>A. ayderensis</i> (Inan Bektas vd. 2022)	Inan Bektas vd. 2022	-	CIP 109280; KG8
<i>Anoxybacillus karvacharensis</i>	Hs. <i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> (Inan Bektas vd. 2022)	Panosyan vd. 2021	Oren ve Garrity 2022	K1
<i>Anoxybacillus kaynarcensis</i>	-	Inan vd. 2013	Euzeby 2013	D1021
<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i>	-	Dulger vd. 2004	Euzeby 2005c	NCIMB 13971
<i>Anoxybacillus kualawohkensis</i>	-	-	-	KW12
<i>Anoxybacillus mongoliensis</i>	-	Namsaraev vd. 2010	Euzeby 2011c	DSM 19169; T4
<i>Anoxybacillus pushchinensis</i>	<i>Anoxybacillus pushchinoensis corrig.</i>	Pikuta vd. 2010	Anonymous 2001a	K1
<i>Anoxybacillus rupiensis</i>	<i>Anoxybacterioides rupiense</i> (Patel vd. 2024)	Derekova vd. 2007	Euzeby 2008, Patel vd. 2024	DSM 17127
<i>Anoxybacillus salavatliensis</i>	Hs. <i>Anoxybacillus gonensis</i> (Belduz vd. 2003, Inan Bektas vd. 2023)	Cihan vd. 2011a	Euzeby 2011a	A343; DSM 22626
<i>Anoxybacillus sediminis</i>	<i>Brevibacillus sedimenti</i> (Patel vd. 2024)	Khan vd. 2018	Oren ve Garrity 2019b, Patel vd. 2024	YIM, PCH 117
<i>Anoxybacillus suryakundensis</i>	-			JS1, DSM 27374
<i>Anoxybacillus tengchongensis</i>	-	Zhang vd. 2011	Euzeby 2011b	DSM 23211; T-11
<i>Anoxybacillus tepidamans</i>	<i>Anoxybacterioides tepidamans</i> (Patel vd. 2024)	Coorevits vd. 2012	Euzeby 2012b, Patel vd. 2024	DSM 16325; R-35643
<i>Anoxybacillus thermanum</i>	-	Poli vd. 2009	Euzeby 2011d	AF/04
<i>Anoxybacillus vitaminiphilus</i>	<i>Paranoxybacillus vitaminiphilus</i> (Patel vd. 2024)	Zhang vd. 2013	Oren ve Garrity 2014b, Patel vd. 2024	3nP4; CGMCC 1.8979
<i>Anoxybacillus voinovskiensis</i>	<i>Anoxybacterioides voinovskienne</i> (Patel vd. 2024)	Yumoto vd. 2004	Yumoto vd. 2004, Patel vd. 2024	JCM 12111

(IJSEM: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Hs: Heterotipik sinomim)

Çizelge 3.10 Süt ürünleri kontaminantı oldukları bilinen ve tez çalışması kapsamında primer/prob tasarımlarında gen dizi bilgileri kullanılan mezofilik ve termofilik sporlu basiller (devamı)

Tür ve Alt Tür	Güncel Taksonomik İsimlendirmeleri	IJSEM Dışındaki Tür Makalesi	IJSEM Tür Validasyon Makalesi	Kültür Koleksiyon Numaraları
<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i>	<i>Saccharococcus caldxylosilyticus</i> (Ahmad vd. 2000 Patel vd. 2024)	Fortina vd. 2001	Anonymous 2002	DSM 12041; NBRC 107762
<i>Geobacillus debilis</i>	<i>Caldibacillus debilis</i> (Banat vd. 2004, Coorevits vd. 2012)	Banat vd. 2004	Euzeby 2005a	DSM 16016; GB1; R-35653
<i>Geobacillus galactosidasius</i>	<i>Parageobacillus galactosidasius</i> (Poli vd. 2012, Najar vd. 2020)	Poli vd. 2011	Euzeby 2012a	CF1B; DSM 18751
<i>Geobacillus gargensis</i>	<i>Hs.Geobacillus thermocatenulatus</i> (Golovacheva vd. 1991, Nazina vd. 2001)	Nazina vd. 2004	Euzeby 2005a	DSM 15378; Ga; VKM B-2300
<i>Geobacillus icigianus</i>	-	Bryanskaya vd. 2015	Oren ve Garrity 2015c	G1w1
<i>Geobacillus jurassicus</i>	-	Nazina vd. 2005	-	DS1; NBRC 107829
<i>Geobacillus kaue</i>	-	Çağlayan ve Bilgin 2011	-	NB
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	-	Nazina vd.2001	Anonymous 2001b	BGSC 90A1; NBRC 102445
<i>Geobacillus lituanicus</i>	-	Kuisiene vd. 2004	Euzeby 2005a	DSM 15325; N-3; VKM B-2294
<i>Geobacillus mahadia</i>	-	Mohtar vd. 2016	-	Geo-05
<i>Geobacillus pallidus</i>	<i>Aeribacillus pallidus</i> (Minana-Galbis vd.2010)	Banat vd. 2004	Euzeby 2005a	DSM 3670; KCTC3564
<i>Geobacillus proteiniphilus</i>	-	Semenova vd. 2019	Oren ve Garrity 2020	1017
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	-	Nazina vd. 2001	Anonymous 2001b	ATCC7953; BGSC 9A20
<i>Geobacillus subterraneus</i>	-	Nazina vd. 2001	Anonymous 2001b	CPW16
<i>Geobacillus thermantarcticus</i>	<i>Parageobacillus thermantarcticus</i> (Aliyu vd. 2018)	Coorevits vd. 2012	Aliyu vd.2018	M1; R-35644
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	<i>Geobacillus gargensis</i> (Nazina vd. 2004)	Nazina vd. 2004	Anonymous 2001b	BGSC 93A1
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	-	Nazina vd. 2001	Anonymous 2001b	BGSC 94A1; KCTC3902
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> (Aliyu vd. 2018)	Nazina vd. 2001	Anonymous 2001b	BGSC 95A1
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	-	Nazina vd. 2001	Anonymous 2001b	BGSC 96A1; ARTRW1
<i>Geobacillus toebii</i>	<i>Parageobacillus toebii</i> (Sung vd. 2002, Aliyu vd. 2016)	Sung vd. 2002	Anonymous 2003	1017, NEB718
<i>Geobacillus uralicus</i>	-	Popova vd. 2002	-	K2
<i>Geobacillus uzenensis</i>	-	Nazina vd. 2001	Anonymous 2001b	U; BGSC 92A1
<i>Geobacillus vulcani</i>	-	Nazina vd. 2004	Euzeby 2005a	3s-1; PSS1
<i>Geobacillus yumthangensis</i>	<i>Parageobacillus yumthangensis</i> (Najar vd. 2018, Najar vd. 2020)	Najar vd. 2020	Oren ve Garrity 2019a	AYN2
<i>Geobacillus zalihae</i>	-	Rahman vd. 2007	-	T1; SURF-189

(IJSEM: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Hs: Heterotipik sinomim)

Çizelge 3.10 Süt ürünleri kontaminantı oldukları bilinen ve tez çalışması kapsamında primer/prob tasarımlarında gen dizi bilgileri kullanılan mezofilik ve termofilik sporlu basiller (devamı)

Tür ve Alttür	Güncel Taksonomik İsimlendirmeleri	IJSEM Dışındaki Tür Makalesi	IJSEM Tür Validasyon Makalesi	Kültür Koleksiyon Numaraları
<i>Bacillus aerophilus</i>	-	Shivaji vd.2006	Euzeby 2006c	28K; 232
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	Priest vd.1987	-	BCRC 11601; DSM 7
<i>Bacillus badius</i>	<i>Pseudobacillus badius</i> (Verma vd.2019)	Batchelor 1919	Verma vd.2024	DSM 23; NBPM-293
<i>Bacillus cereus</i>	-	Frankland ve Frankland 1887	Skerman vd.1980	CCM 2010; BC33
<i>Bacillus firmus</i>	<i>Cytobacillus firmus</i> (Patel ve Gupta 2020)	Werner 1933	Patel ve Gupta 2020	JCM 2512; NCTC 10335
<i>Bacillus invictae</i>	<i>Bacillus altitudinis</i> (Shivaji vd. 2006)	Branquinho vd.2014	Oren ve Garrity 2015b	BiFFUP1
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	Chester 1901	Skerman vd. 1980	ATCC 14580
<i>Bacillus mycoides</i>	-	Flügge 1886	Skerman vd.1980	ATCC 6462; DSM 2048
<i>Bacillus safensis</i>	-	Satomi vd. 2006	Euzeby vd.2006d	FO-36b
<i>Bacillus smithii</i>	-	Nakamura vd. 1988	-	DSM 4216; JCM 9076
<i>Bacillus sonorensis</i>	-	Palmisano vd. 2001	Anonymous vd. 2001c	NBRC 101234
<i>Bacillus subtilis</i>	-	Cohn 1875	Skerman vd.1980	DSM 10
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	Berliner 1915	Skerman vd.1980	ATCC 10792
<i>Bacillus pumilus</i>	-	Gottheil 1901	Skerman vd. 1980	ATCC 7061; NCTC 10337

(IJSEM: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Hs: Heterotipik sinomim)

Çizelge 3.11 Primer/prob tasarımında kullanılan termofilik ve mezofilik sporlu basillerin ilgili 8 gen dizilerine ait Genbank Aksesyon numaraları

İsimlendirme	Kültür Koleksiyon Numarası	16S rRNA	<i>rpoA</i>	<i>rpoB</i>	<i>spo0A</i>	<i>spo0B</i>	<i>spoIIAB</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>
<i>Anoxybacillus ayderensis</i>	AB04	NR_024837.1	NR_024837.1 [45371..46315]	NR_024837.1 [19612..23172]	NZ_JXTG01000002.1 [319649..320428]	JXTG01000002.1 [115439..115987]	JXTG01000002.1 [302487..302999]	NZ_JXTG01000033.1 [2060..4513]	NZ_JXTG01000033.1 [4584..6506]
<i>Anoxybacillus calidus</i>	C161ab; DSM 25220	FJ430012.2	NZ_JACDUU010000013.1 [46012..>46120]	NZ_JACDUU010000013.1 [19854..23414]	NZ_JACDUU010000001.1 [200122..200895]	-	NZ_JACDUU010000001.1 [181987..182499]	NZ_JACDUU010000009.1 [120581..123046]	NZ_JACDUU010000009.1 [118562..120478]
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	DSM 2641; WK1	AF004589.1	NC_011567.1 [133850..134794]	NC_011567.1 [108086..111646]	NC_011567.1 [962372..963151]	NC_011567.1 [728126..728671]	NC_011567.1 [945214..945726]	NC_011567.1 [6528..8978]	NC_011567.1 [4539..6455]
<i>Anoxybacillus gonensis</i>	G2	AY122325.1	NZ_CP012152.1 [132951..133895]	NZ_CP012152.1 [107192..110752]	NZ_CP012152.1 [1863382..1864161]	NZ_CP012152.1 [2071351..2071899]	NZ_CP012152.1 [1880802..1881314]	NZ_CP012152.1 [6128..8587]	NZ_CP012152.1 [4135..6057]
<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> hs. <i>Anoxybacillus ayderensis</i>	JW/VK-KG4;G10	AF510985.1	CP025535.1 [1149245..1150189]	CP025535.1 [1172389..1175949]	CP025535.1 [2301874..2302653]	-	CP025535.1 [2284719..2285231]	CP025535.1 [1280098..1282557]	CP025535.1 [1282628..1284550]
<i>Anoxybacillus karvacharensis</i>	K1	MK418417.1	NZ_MQAD01000038.1 [9506..10450]	NZ_MQAD01000038.1 [32643..36203]	MQAD01000005.1 [637310..638089]	-	MQAD01000005.1 [654738..655250]	NZ_MQAD01000010.1 [1375..3825]	NZ_MQAD01000010.1 [3898..5814]
<i>Anoxybacillus mongoliensis</i>	DSM 19169; T4	EF654664.1	NZ_JACHEQ010000016.1 [9542..>10350]	NZ_JACHEQ010000006.1 [16187..16399]	NZ_JACHEQ010000014.1 [36552..37280]	-	NZ_JACHEQ010000014.1 [53983..54495]	NZ_JACHEQ010000006.1 [166992..169445]	NZ_JACHEQ010000006.1 [165003..166919]
<i>Anoxybacillus pushchinensis</i>	K1	NR_037100.1	NZ_FOJQ01000013.1 [45236..46180]	NZ_FOJQ01000013.1 [19472..23032]	NZ_FOJQ01000005.1 [1434..2216]	-	NZ_FOJQ01000005.1 [18893..19405]	NZ_FOJQ01000022.1 [1590..4043]	NZ_FOJQ01000022.1 [4115..6037]
<i>Anoxybacillus suryakundensis</i>	JS1; DSM 27374 [†]	KC958552.1	NZ_LIOK01000031.1 [9840..>10639]	NZ_LIOK01000023.1 [8758..12318]	NZ_LIOK01000006.1 [32604..33383]	-	NZ_LIOK01000006.1 [50036..50548]	NZ_LIOK01000005.1 [179047..181500]	NZ_LIOK01000005.1 [177058..178974]
<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i>	NCIMB 13971	ON331912.1	NZ_JALLIW010000014.1 [45057..46001]	JF279474.1	NZ_JALLIW010000004.1 [29..808]	-	NZ_JALLIW010000004.1 [17456..17968]	NZ_JALLIW010000074.1 [1220..3670]	NZ_JALLIW010000074.1 [3743..5659]
<i>Anoxybacillus tengchongensis</i>	DSM 23211; T-11	FJ438370.1	X	NZ_JACHES010000016.1 [19422..22982]	NZ_JACHES010000001.1 [155523..156251]	-	NZ_JACHES010000001.1 [138308..138820]	NZ_JACHES010000003.1 [297323..299776]	NZ_JACHES010000003.1 [295334..297250]
<i>Anoxybacillus thermarum</i>	AF/04;	JF292514.1	NZ_JXTH01000010.1 [45685..46629]	NZ_JXTH01000010.1 [19926..23486]	NZ_JXTH01000003.1 [83700..84479]	-	NZ_JXTH01000003.1 [66538..67050]	NZ_JXTH01000005.1 [1531..3990]	NZ_JXTH01000005.1 [4061..5983]
<i>Anoxybacillus salavatliensis</i>	A343; DSM 22626	EU326496.2	NZ_JANGZY010000014.1 [45064..46008]	NZ_JANGZY010000014.1 [19304..22864]	NZ_JANGZY010000004.1 [17947..18726]	-	NZ_JANGZY010000004.1 [35370..35882]	NZ_JANGZY010000001.1 [1232..3691]	NZ_JANGZY010000001.1 [3762..5684]
<i>Anoxybacteriodes amylolyticus</i>	DSM 15939; MR3C	NR_042225.1	CP015438.1 [46930..47874]	JF279467.1	CP015438.1 [2470230..2471009]	-	CP015438.1 [1223276..1224790]	CP015438.1 [184352..186817]	CP015438.1 [186889..188820]
<i>Anoxybacteriodes tepidamans</i>	R-35643; DSM 16325	FN428691.1	NZ_JACHEP010000021.1 [10432..11376]	NZ_JACHEP010000021.1 [33877..37440]	NZ_JACHEP010000013.1 [65031..65810]	-	NZ_JACHEP010000013.1 [47125..47637]	NZ_JACHEP010000003.1 [184052..186523]	NZ_JACHEP010000003.1 [182055..183971]

Çizelge 3.11 Primer/prob tasarımında kullanılan termofilik ve mezofilik sporlu basillerin ilgili 8 gen dizilerine ait Genbank Aksesyon numaraları (devamı)

İsmlendirme	Kültür Koleksiyon Numarası	16S rRNA	<i>rpoA</i>	<i>rpoB</i>	<i>spo0A</i>	<i>spo0B</i>	<i>spoIIIAB</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>
<i>Anoxybacteriodes rupeensis</i>	DSM 17127	AJ879076.1	NZ_JACIDF010000013.1 [19320..>20131]	NZ_JACIDF010000013.1 [43087..46650]	NZ_JACIDF010000002.1 [316813..317592]	-	NZ_JACIDF010000002.1 [335330..335842]	NZ_JACIDF010000007.1 [2106..4577]	NZ_JACIDF010000007.1 [4818..6734]
<i>Anoxybacteriodes voynovskiensis</i>	JCM 12111	MT760344.1	-	BMNP01000022.1 [19837..23394]	BMNP01000029.1 [30584..31363]	BMNP01000009.1 [71015..71557]	BMNP01000005.1 [10380..10892]	BMNP01000007.1 [1459..3924]	BMNP01000007.1 [3996..5918]
<i>Brevibacillus sedimenti</i>	YIM; PCH 117	MG661737.1	NZ_CP064048.1 [1339188..1340132]	NZ_CP064048.1 [1312323..1315862]	NZ_CP064048.1 [2827486..2828274]	-	NZ_CP064048.1 [2806710..2807228]	NZ_CP064048.1 [1132978..1135476]	NZ_CP064048.1 [1128900..1130825]
<i>Caldibacillus debilis</i>	R-35653; DSM 16016; GB1	FN428699.1	AZRV01000008.1 [4362..5306]	NZ_KB912893.1 [20497..24066]	NZ_KB912887.1 [26976..27767]	-	NZ_KB912887.1 [9015..9530]	NZ_KB912886.1 [2137..4584]	NZ_KB912886.1 [4656..6581]
<i>Geobacillus icigianus</i>	GIw1	MK622844.1	NZ_JPYA01000125.1 [11283..12227]	NZ_JPYA01000125.1 [34647..38219]	NZ_JPYA01000158.1 [263..1081]	NZ_JPYA01000105.1 [14208..14753]	X	NZ_JPYA0100010.1 [1764..4226]	NZ_JPYA0100010.1 [4563..6476]
<i>Geobacillus jurassicus</i>	DS1; NBRC 107829	AY312404.1	NZ_BCQG01000036.1 [26575..27519]	NZ_BCQG01000036.1 [430..4002]	NZ_BCQG01000031.1 [40965..41783]	NZ_BCQG01000032.1 [165..713]	NZ_BCQG01000051.1 [6984..7496]	NZ_BCQG01000011.1 [1355..3829]	NZ_BCQG01000011.1 [3974..5890]
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	BGSC 90A1; NBRC 102445	AY608934.1	NZ_CP038860.1 [739381..740325]	NZ_CP038860.1 [713516..717088]	NZ_CP038860.1 [3015741..3016559]	NZ_CP038860.1 [3223209..3223757]	NZ_CP038860.1 [3033946..3034458]	NZ_CP038860.1 [606247..608703]	NZ_CP038860.1 [604180..606096]
<i>Geobacillus lituanicus</i>	N-3	AY044055.1	CP017692.1 [2207814..2208758]	CP017692.1 [2181765..2185337]	CP017692.1 [972451..973230]	-	CP017692.1 [990481..990993]	CP017692.1 [2061887..2064364]	CP017692.1 [2059811..2061733]
<i>Geobacillus proteiniphilus</i>	1017	GU459251.2	NZ_MQMG01000017.1 [10895..11839]	NZ_MQMG01000017.1 [34137..37709]	NZ_MQMG01000041.1 [14471..15289]	NZ_MQMG01000001.1 [108134..108682]	NZ_MQMG01000041.1 [32670..33182]	NZ_MQMG01000002.1 [144936..147413]	NZ_MQMG01000002.1 [142866..144782]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	BGSC 9A20; ATCC 7953	AY608928.1	NZ_JALS01000094.1 [10384..11328]	NZ_JALS01000094.1 [33760..37332]	NZ_JALS01000056.1 [45310..46089]	NZ_JALS01000013.1 [6534..7094]	NZ_JALS01000056.1 [27547..28059]	NZ_JALS01000012.1 [1863..4346]	NZ_JALS01000012.1 [4500..6416]
<i>Geobacillus subterraneus</i>	CPW16	NZ_CP051162.1 [607368..608924]	NZ_CP051162.1 [595712..596656]	NZ_CP051162.1 [567759..571331]	NZ_CP051162.1 [2872990..2873808]	NZ_CP051162.1 [3082242..3082802]	NZ_CP051162.1 [2891119..2891631]	NZ_CP051162.1 [456936..459404]	NZ_CP051162.1 [454867..456783]
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	BGSC 93A1	AY608935.1	NZ_NEWK01000002.1 [1726591..1727535]	NZ_NEWK01000002.1 [1749828..1753400]	NEWK01000001.1 [1247121..1247900]	-	NEWK01000001.1 [1229219..1229731]	NEWK01000001.1 [11060..13516]	NEWK01000001.1 [13667..15589]
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	BGSC 94A1; KCTC3902	AY608960.1	NZ_CP017694.1 [1700232..1701176]	NZ_CP017694.1 [1723720..1727292]	NZ_CP017694.1 [2960104..2960937]	NZ_CP017694.1 [2717657..2718217]	NZ_CP017694.1 [2942296..2942808]	NZ_CP017694.1 [1831055..1833523]	NZ_CP017694.1 [1833676..1835592]

Çizelge 3.11 Primer/prob tasarımında kullanılan termofilik ve mezofilik sporlu basillerin ilgili 8 gen dizilerine ait Genbank Aksesyon numaraları (devamı)

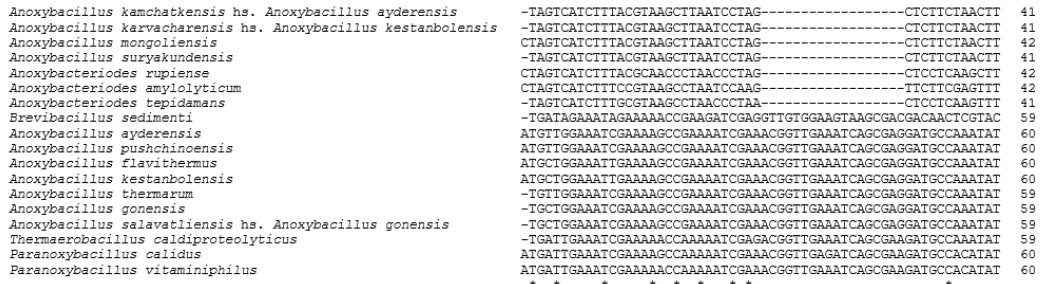
İsimlendirme	Kültür Koleksiyon Numarası	16S rRNA	<i>rpoA</i>	<i>rpoB</i>	<i>spo0A</i>	<i>spo0B</i>	<i>spoIIAB</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	BGSC 96A1; ARTRW1	AY608936.1	NZ_CP042251.1 [142246..143190]	NZ_CP042251.1 [116381..119953]	NZ_CP042251.1 [2474630..2475448]	NZ_CP042251.1 [2683647..2684195]	NZ_CP042251.1 [2492834..2493346]	NZ_CP042251.1 [6427..8883]	NZ_CP042251.1 [4360..6276]
<i>Geobacillus uzenensis</i>	U; BGSC 92A1	AF276304.1	NZ_NEWL0100000 9.1 [332311..333255]	NZ_NEWL0100000 9.1 [355746..359318]	NZ_NEWL01000002.1 [499060..499878]	NZ_NEWL01000002.1 [298505..299065]	NZ_NEWL01000002.1 [481239..481751]	NZ_NEWL01000010.1 [76352..78820]	NZ_NEWL01000010.1 [78975..80891]
<i>Geobacillus vulcani</i>	3S-1; PSS1	AJ293805.1	NZ_JPOI01000001.1 [797220..798164]	NZ_JPOI01000001.1 [820518..824090]	NZ_JPOI01000001.1 [2073608..2074429]	NZ_JPOI01000001.1 [1851390..1851938]	NZ_JPOI01000001.1 [2055696..2056208]	NZ_JPOI01000001.1 [928733..931210]	NZ_JPOI01000001.1 [931361..933277]
<i>Geobacillus zalihae</i>	TI; SURF-189	AY166603.1	NZ_CP061470.1 [2834655..2835599]	NZ_CP061470.1 [2808787..2812362]	NZ_CP061470.1 [1618726..1619544]	NZ_CP061470.1 [1826055..1826603]	NZ_CP061470.1 [1636922..1637434]	NZ_CP061470.1 [2700420..2702876]	NZ_CP061470.1 [2698353..2700269]
<i>Geobacillus kaue</i>	NB	AF411066.1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geobacillus mahadia</i>	Geo-05	KY744705.1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geobacillus uralicus</i>	K2	AY079151.1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Parageobacillus toebii</i>	1017; NEB718	AF326278.1	NZ_CP070511.1 [336398..337342]	NZ_CP070511.1 [359716..363273]	NZ_CP070511.1 [1536820..1537599]	NZ_CP070511.1 [1324441..1324980]	NZ_CP070511.1 [1519173..1519685]	NZ_CP070511.1 [474796..477273]	NZ_CP070511.1 [477336..479252]
<i>Parageobacillus caldoxylosilyticus</i>	NBRC 107762; DSM 12041	AB682661.1	NZ_JACICX010000 020.1 [10163..11025]	NZ_JACICX010000 020.1 [33383..36952]	NZ_JACICX010000012.1 [6966..47745]	BAWO01000002.1 [9217..9759]	NZ_JACICX01000001 2.1 [29374..29886]	NZ_JACICX010000002.1 [235104..237590]	NZ_JACICX010000002.1 [233124..235040]
<i>Parageobacillus yumthangensis</i>	AYN2	MG603320.1	NWUZ01000001.1 [318989..319933]	NWUZ01000001.1 [342307..345864]	NWUZ01000001.1 [2452341..2453120]	-	NWUZ01000001.1 [2472226..2472738]	NWUZ01000001.1 [439409..441886]	NWUZ01000001.1 [441949..443871]
<i>Parageobacillus thermantarcticus</i>	R-35644T; M1	FN428692.1	NZ_FOJS01000018. 1 [45701..46645]	NZ_FOJS01000018. 1 [19795..23367]	NZ_FOJS01000008.1 [37406..38185]	-	NZ_FOJS01000008.1 [55313..55825]	NZ_FOJS01000062.1 [6824..9289]	NZ_FOJS01000062.1 [4844..6760]
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i>	BGSC 95A1; DSM 2542	AY608981.1	NZ_CP012712.1 [469723..470667]	NZ_CP012712.1 [493004..496576]	NZ_CP012712.1 [3340099..3340878]	NZ_CP012712.1 [3540785..3541324]	NZ_CP012712.1 [3358023..3358535]	NZ_CP012712.1 [605876..608350]	NZ_CP012712.1 [608412..610328]
<i>Parageobacillus galactosidasius</i>	CF1B; DSM 18751	NR_108140.1	NZ_NDYL0100000 1.1 [145829..146773]	NZ_NDYL0100000 1.1 [119900..123457]	NDYL01000002.1 [926767..927546]	-	NDYL01000002.1 [944682..945194]	NZ_NDYL01000002.1 [1997855..2000332]	NZ_NDYL01000002.1 [1995876..1997792]
<i>Paranoxybacillus calidus</i>	C161ab; DSM 25220	FJ430012.2	NZ_JACDUU01000 0013.1 [46012..>46120]	NZ_JACDUU01000 0013.1 [19854..23414]	NZ_JACDUU010000001.1 [200122..200895]	-	NZ_JACDUU0100000 01.1 [181987..182499]	NZ_JACDUU010000009.1 [120581..123046]	NZ_JACDUU010000009.1 [118562..120478]
<i>Paranoxybacillus vitaminiphilus</i>	3nP CGMCC 1.8979; 3nP4	FJ474084.1	NZ_QLMH0100001 6.1 [46678..47622]	NZ_QLMH0100001 6.1 [20519..24082]	NZ_QLMH01000002.1 [284738..285517]	-	NZ_QLMH01000002.1 [303233..303745]	NZ_QLMH01000004.1 [244523..246994]	NZ_QLMH01000004.1 [242505..244421]
<i>Thermoaerobacillus caldoproteolyticus</i>	R-35652; U458	NR_116989.1	NZ_CP064060.1 [3277699..3278643]	NZ_CP064060.1 [3251486..3255052]	NZ_CP064060.1 [2009437..2010219]	NZ_CP064060.1 [2250572..2251111]	NZ_CP064060.1 [2027294..2027806]	NZ_CP064060.1 [3136653..3139121]	NZ_CP064060.1 [3134633..3136549]

Çizelge 3.11 Primer/prob tasarımında kullanılan termofilik ve mezofilik sporlu basillerin ilgili 8 gen dizilerine ait Genbank Aksesyon numaraları (devamı)

İsimlendirme	Kültür Koleksiyon Numarası	16S rRNA	<i>rpoA</i>	<i>rpoB</i>	<i>spo0A</i>	<i>spo0B</i>	<i>spoIIIAB</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>
<i>Bacillus aerophilus</i>	28K; 232	MN845151.1	NZ_CP026008.1 [1599225..1600169]	NZ_CP026008.1 [1572178..1575759]	NZ_CP026008.1 [3621241..3622044]	NZ_CP026008.1 [121022..121615]	NZ_CP026008.1 [3639371..3639886]	NZ_CP026008.1 [1453739..1456243]	NZ_CP026008.1 [1451589..1453505]
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BCRC 11601; DSM 7	EF433406.1	NC_014551.1 [150015..150959]	NC_014551.1 [122979..126560]	NC_014551.1 [2386310..2387110]	NC_014551.1 [2642663..2643241]	NC_014551.1 [2404435..2404950]	NC_014551.1 [7010..9469]	NC_014551.1 [4877..6793]
<i>Bacillus invictae</i> (<i>Bacillus altitudinis</i>)	Bi. FFUP; GR-8	JX183147.2	NZ_CP009108.1 [1117731..1118675]	NZ_CP009108.1 [1090685..1094266]	NZ_CP009108.1 [3123632..3124435]	NZ_CP009108.1 [3378714..3379307]	NZ_CP009108.1 [3141762..3142277]	NZ_CP009108.1 [972202..974715]	NZ_CP009108.1 [970052..971968]
<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580; DSM 13	MF461332.1	NC_006322.1 [146848..147792]	NC_006322.1 [120755..124336]	NC_006322.1 [2511884..2512684]	NC_006322.1 [2807183..2807761]	NC_006322.1 [2530185..2530700]	NC_006322.1 [6900..9368]	NC_006322.1 [4796..6709]
<i>Bacillus mycoides</i>	6462; DSM 2048	AF155956.1	NZ_CP093291.1 [1950690..1951634]	NZ_CP093291.1 [1924768..1928301]	NZ_CP093291.1 [581921..582715]	NZ_CP093291.1 [822320..822868]	NZ_CP093291.1 [600959..601474]	NZ_CP093291.1 [1817093..1819564]	NZ_CP093291.1 [1815082..1817004]
<i>Bacillus safensis</i>	FO-036b; PgKB20	AF234854.2	NZ_CP043404.1 [1395754..1396698]	NZ_CP043404.1 [1420165..1423746]	NZ_CP043404.1 [3073902..3074705]	NZ_CP043404.1 [2830087..2830680]	NZ_CP043404.1 [3055848..3056363]	NZ_CP043404.1 [1539920..1542424]	NZ_CP043404.1 [1542657..1544573]
<i>Bacillus smithii</i>	JCM 9076; DSM 4216	LC379073.1	NZ_CP012024.1 [151357..152301]	NZ_CP012024.1 [125093..128650]	NZ_CP012024.1 [2185270..2186058]	NZ_CP012024.1 [2385871..2386422]	NZ_CP012024.1 [2204170..2204682]	NZ_CP012024.1 [7005..9470]	NZ_CP012024.1 [4978..6903]
<i>Bacillus sonorensis</i>	NBRC 101234; SRCM101395	KT989851.1	NZ_CP021920.1 [152567..153511]	NZ_CP021920.1 [126448..130029]	NZ_CP021920.1 [1846854..1847654]	NZ_CP021920.1 [1452364..1452954]	NZ_CP021920.1 [1828825..1829340]	NZ_CP021920.1 [6606..9080]	NZ_CP021920.1 [4502..6415]
<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010; BC33	DQ207729.2	NZ_CP072774.1 [139550..140494]	NZ_CP072774.1 [113629..117162]	NZ_CP072774.1 [4064923..4065717]	NZ_CP072774.1 [4309777..4310325]	NZ_CP072774.1 [4083991..4084506]	NZ_CP072774.1 [6195..8666]	NZ_CP072774.1 [4184..6106]
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10; str. 168	MN640967.1	NC_000964.3 [148931..149875]	NC_000964.3 [121919..12550]	NC_000964.3 [2518023..2518826]	NC_000964.3 [2853981..2854559]	NC_000964.3 [2536181..2536696]	NC_000964.3 [6994..9459]	NC_000964.3 [4867..6783]
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792	AF290545.1	NZ_CM000753.1 [73129..74073]	NZ_CM000753.1 [96460..99993]	NZ_CM000753.1 [3879527..3880321]	NZ_CM000753.1 [4122903..4123451]	NZ_CM000753.1 [3898592..3899107]	NZ_CM000753.1 [5087864..5090335]	NZ_CM000753.1 [5090424..5092346]
<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061; NCTC10337	JQ424887.1	NZ_LT906438.1 [152133..153077]	NZ_LT906438.1 [125085..128666]	NZ_LT906438.1 [2185149..2185952]	NZ_LT906438.1 [2476651..2477235]	NZ_LT906438.1 [2203279..2203794]	NZ_LT906438.1 [6638..9139]	NZ_LT906438.1 [4489..6405]
<i>Pseudobacillus badius</i>	DSM 23; NBPM-293	LT549007.1	NZ_CP082363.1 [140149..141093]	NZ_CP082363.1 [114333..117887]	NZ_CP082363.1 [2378039..2378827]	NZ_CP082363.1 [2668646..2669191]	NZ_CP082363.1 [2396817..2397329]	NZ_CP082363.1 [6401..8887]	NZ_CP082363.1 [4339..6264]
<i>Cytobacillus firmus</i>	JCM2512; NCTC10335	D78314.1	-	UFTC01000001.1 [129914..133468]	UFTC01000001.1 [3367136..3367924]	UFTC01000001.1 [3592007..3592558]	-	UFTC01000001.1 [6691..9216]	UFTC01000001.1 [4627..6549]

3.4.1 Gen bölgelerine özgü DNA dizilerinin hizalanması

Çalışma için seçilen *16S rRNA*, *rpoA*, *rpoB*, *spo0A*, *spo0B*, *spoIIIAB*, *gyrA* ve *gyrB* genleri, süt ve süt ürünlerinde tespit edilen türlerden belirlenerek taranmış olup, ilgili gen lokuslarının aksesyon numaraları Çizelge 3.11’de daha önce sunulmuştur. NCBI veri tabanından elde edilen ve her gen bölgesine özgü diziler, her cins için, MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) ve CLUSTAL W web tabanlı arayüzü (Sievers vd. 2011 <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> Son Erişim Tarihi: Kasım 2024) kullanılarak hizalama yapılmıştır (Şekil 3.1). Eldeki veri setlerinden yola çıkılarak CLUSTAL W analizi kullanılarak tüm veriler .mas, .clustal_num ve .docx versiyonlarıyla kaydedilip depolanmıştır.



```
Anoxybacillus kamchatkensis hs. Anoxybacillus ayderensis -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Anoxybacillus karvacharensis hs. Anoxybacillus kestanbolensis -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Anoxybacillus mongoliensis -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 42
Anoxybacillus suryakundensis -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Anoxybacteriodes rupiense -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 42
Anoxybacteriodes amyolyticum -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 42
Anoxybacteriodes tepidamans -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Brevibacillus sedimenti -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Anoxybacillus ayderensis -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Anoxybacillus pushchinoensis -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Anoxybacillus flavithermus -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Anoxybacillus kestanbolensis -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Anoxybacillus thermarum -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Anoxybacillus gonensis -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Anoxybacillus salavatliensis hs. Anoxybacillus gonensis -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Thermaerobacillus caldiproteolyticus -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Paranoxybacillus calidus -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
Paranoxybacillus vitaminiphilus -TAGTCATCCTTACGTAAGCCTTAATCCTAG-----CTCTTCTAAGTT 41
```

Şekil 3.1 *rpoA* genine ait dizilerin CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) ile hizalanması

3.4.2 Filogenetik ağaç çizimleri

MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) ve CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) ile yürütülen dizi hizalama işlemleri sonucunda seçilen türlerin gene özgü olarak kendi içerisinde iki veya üçerli grup olacak şekilde kladlar oluşturdıkları gözlenmiştir. Bu bilgiler neticesinde primer-prob tasarımlarının da gerektiğinde bir gen bölgesine ait birden fazla primer seti kullanılarak yapılması mecburiyeti doğmuştur. Bu aşamadan sonra hizalamalar belirlenen gruplar bazında yeniden yapılarak ve tekrar MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) yazılımı kullanılarak filogenetik ağaç çizimine gidilmiştir. Dosyalar .mas, .mtsx ve .mdsx versiyonlarıyla kaydedilip depolanmıştır.

3.4.3 Benzerlik tablolarının oluşturulması

Belirlenen gen bölgelerine özgü olarak çizilen filogenetik ağaçlar, benzerlik oranlarının belirlenmesi için MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) programı yardımıyla benzerlik dendogramlarını gösteren matrisler oluşturulmuştur. Maximum likelihood özelliği seçilerek yapılarak pairwise distance matrisiyle yüzde (%) benzerlik oranları belirlenmiştir. Her bir dosya Excel’de düzenlenerek depolanmıştır. Söz konusu tüm işlemler (hizalama analizleri, filogenetik ağaç ve pairwise distance analizleri), her 8 gen bölgesi (16S rRNA, *rpoA*, *rpoB*, *spo0A*, *spo0B*, *spoIIIAB*, *gyrA*, *gyrB*, Çizelge 3.11) üzerinden yeniden düzenlenmiştir. Bu aşamadan sonra primer- prob tasarımlarına geçilmiştir.

3.4.4 Primer ve prob tasarımları

Bölüm 3.4.1’de CLUSTAL W’nin web arayüzü kullanılarak yürütülen dizi hizalamaları üzerinden farklı aday bölgeler seçilerek primer ve prob tasarımları öncelikle manuel olarak yapılmıştır. Her bir gen için tasarlanacak primer-prob bölgeleri daha önce bahsedildiği üzere cinslerin iki veya üç gruba ayrılmasından dolayı ikişer veya üçer set olarak yapıldığından, primer-prob tasarımında özellikle CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) analizlerinde yer alan benzer bölgelerin yoğunlukları göz önünde bulundurulmuştur (Şekil 3.2).

ArpoA-f1 primer 5' CGTGGATATGGTACAACTTTGG 3'

Anoxybacillus ayderensis GGCAAAATTCGTCGTTGAACCACTTGAGCGTGGATATGGTACAACTTTGGTAACTCCTTA 120

Anoxybacillus pushchinoensis GGCAAAATTCGTCGTTGAACCACTTGAGCGTGGATATGGTACAACTTTGGTAACTCCTTA 120

Anoxybacillus flavithermus GGCAAAATTCGTCGTTGAACCACTTGAGCGTGGATATGGTACAACTTTGGTAACTCCTTA 120

Anoxybacillus kestanbolensis GGCAAAATTCGTCGTTGAACCACTTGAGCGTGGATATGGTACAACTTTGGTAACTCCTTA 120

Anoxybacillus gonensis GGCAAAATTCGTCGTTGAACCACTTGAGCGTGGATATGGTACAACTTTGGTAACTCCTTA 119

Anoxybacillus salavatliensis hs. Anoxybacillus gonensis GGCAAAATTCGTCGTTGAACCACTTGAGCGTGGATATGGTACAACTTTGGTAACTCCTTA 119

Thermoaerobacillus caldiproteolyticus GGCAAAATTCGTCGTTGAACCACTTGAGCGTGGATATGGTACAACTTTGGTAACTCCTTA 119

Paranoxybacillus vitaminiphilus GGCAAAATTCGTCGTTGAACCGCTTGAGCGTGGATATGGTACAACTTTGGTAACTCCTTA 120

P- ArpoA1 Probe 5' CGTATCCTGTTATCCTCACTCCCT 3' 5'GGT

Anoxybacillus ayderensis CSTGATCCTGTTATCCTCACTCCCTGGTGCCGCTGTAACATCTGTTCAAATAGATSGT 180

Anoxybacillus pushchinoensis CSTGATCCTGTTATCCTCACTCCCTGGTGCCGCTGTAACATCTGTTCAAATAGATSGT 180

Anoxybacillus flavithermus CSTGATCCTGTTATCCTCACTCCCTGGTGCCGCTGTAACATCTGTTCAAATAGATSGT 180

Anoxybacillus kestanbolensis CSTGATCCTGTTATCCTCACTCCCTGGTGCCGCTGTAACATCTGTTCAAATAGATSGT 180

Anoxybacillus gonensis CSTGATCCTGTTATCCTCACTCCCTGGTGCCGCTGTAACATCTGTTCAAATAGATSGT 179

Anoxybacillus salavatliensis hs. Anoxybacillus gonensis CSTGATCCTGTTATCCTCACTCCCTGGTGCCGCTGTAACATCTGTTCAAATAGATSGT 179

Thermoaerobacillus caldiproteolyticus CSTGATCCTGTTATCCTCACTCCCTGGTGCCGCTGTAACATCTGTTCAAATAGATSGT 179

Paranoxybacillus vitaminiphilus CSTGATCCTGTTATCCTCACTCCCTGGTGCCGCTGTAACATCTGTTCAAATAGATSGT 180

ArpoA1 Reverse primer GTATTGCACGAGTTTTC 3' (5'-3' complements zincir dizisindeki hali)

Anoxybacillus ayderensis GTATTGCACGAGTTTTCACAAATTGATGGCGTCGTGGAAGATGTAACACGATCATTTTA 240

Anoxybacillus pushchinoensis GTATTGCACGAGTTTTCACAAATTGATGGCGTCGTGGAAGATGTAACACGATCATTTTA 240

Anoxybacillus flavithermus GTATTGCACGAGTTTTCACAAATTGATGGCGTCGTGGAAGATGTAACACGATCATTTTA 240

Anoxybacillus kestanbolensis GTATTGCACGAGTTTTCACAAATTGATGGCGTCGTGGAAGATGTAACACGATCATTTTA 240

Anoxybacillus gonensis GTATTGCACGAGTTTTCACAAATTGATGGCGTCGTGGAAGATGTAACACGATCATTTTA 239

Anoxybacillus salavatliensis hs. Anoxybacillus gonensis GTATTGCACGAGTTTTCACAAATTGATGGCGTCGTGGAAGATGTAACACGATCATTTTA 239

Thermoaerobacillus caldiproteolyticus GTATTGCACGAGTTTTCACAAATTGATGGCGTCGTGGAAGATGTAACACGATCATTTTA 239

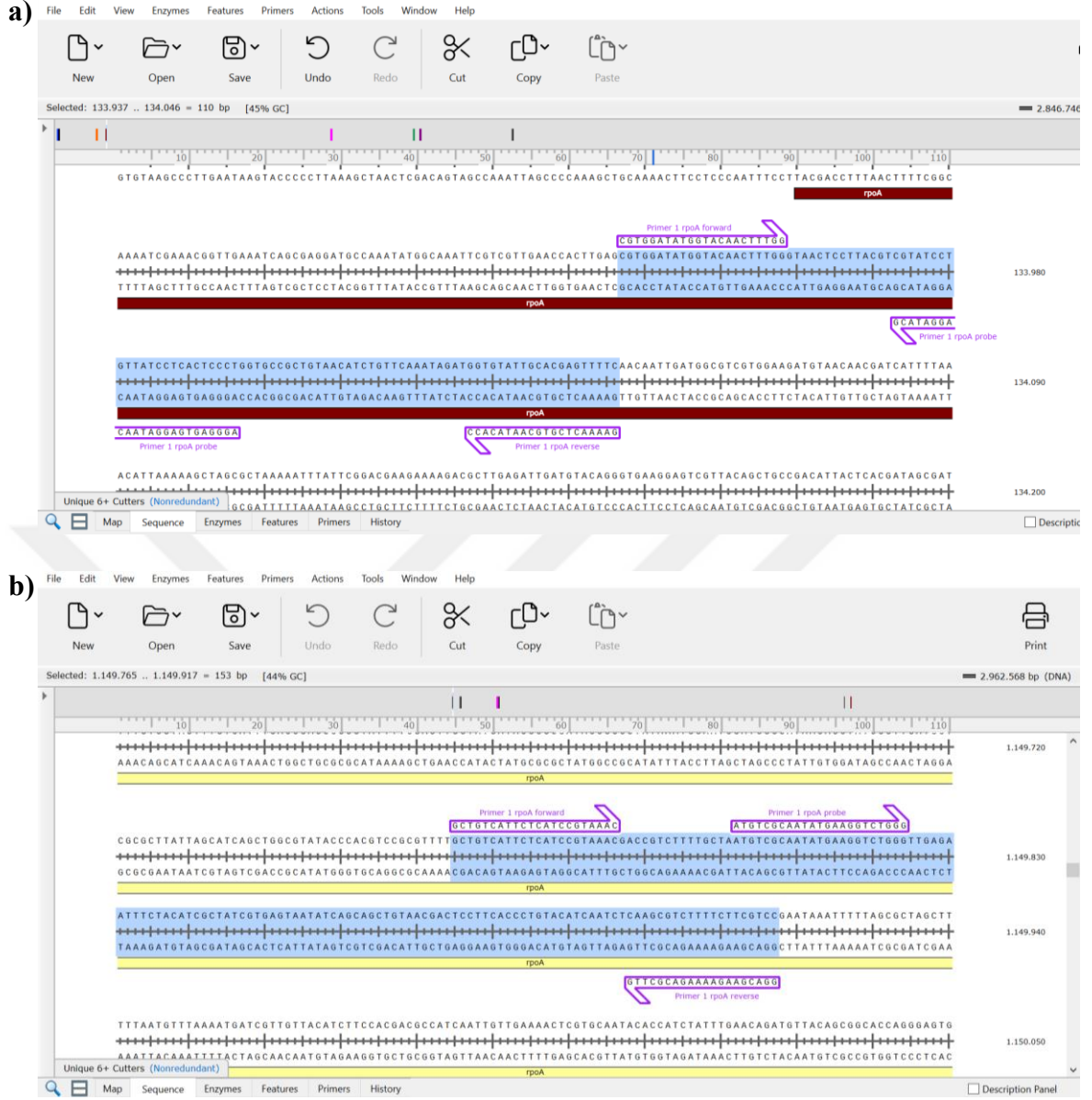
Paranoxybacillus vitaminiphilus GTATTGCACGAGTTTTCACAAATTGATGGCGTCGTGGAAGATGTAACACGATCATTTTA 240

Şekil 3.2. Tasarlanan primer ve problemlerin CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) analizi sonucu örnek gösterimi (Örnek olarak ArpoA-f/r1, P-ArpoA1 seti gösterilmiştir)

Şekil 3.2’de bir örneği görülmekte olan hizalama sonuçlarına göre ön taramalarda en yüksek benzerlik gösteren bölgelerden uygun ΔG değerlerine sahip olan primer ve prob çiftleri tasarlanmıştır. Bu amaçla web tabanlı bir yazılım olan Premier Biosoft’un sunduğu Beacon Designer kullanılmıştır (Şekil 3.3, https://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/index.html Son Erişim Tarihi: Kasım 2024, Premier Biosoft Interpairs, Palo Alto, CA). Primer ve prob çiftlerinin gen üzerindeki yerlerinin belirlenmesi ve ürün boyutunun 300 baz çiftini geçmemesi için tasarımlar SnapGene Viewer yazılımı ile de kontrol edilmiştir (Şekil 3.4).

The screenshot shows the Beacon Designer software interface. At the top, there's a logo for "Beacon Designer Free Edition" and "PREMIER Biosoft International". Below the logo, there are two tabs: "Oligo Analysis" and "Sequence Analysis". The "Assay Type" section has two radio buttons: "TaqMan®" (selected) and "SYBR®Green". There are input fields for "Name:", "Description:", and "Type:". The "Sense Primer:" field contains the sequence "5' TTGCCCTAGTGAGATTGCT 3'". The "Anti-sense Primer:" field contains the sequence "5' AAGACGGTCGTTACGGATG 3'". The "Probe:" field contains the sequence "5' ATCTGTCCACACGTCGATCGTTAAT 3'". To the right of these fields, there are checkboxes for "20 bp", "20 bp", and "25 bp". The "Reaction Conditions:" section has input fields for "Nucleic Acid Concentration:" (0.25 nM), "Mono Ion Concentration:" (50 mM), "Free Mg++ Concentration:" (5 mM), and "Total Na+ Concentration:" (332.84 mM). At the bottom, there are two buttons: "Restore Default" and "Analyze".

Şekil 3.3 Premier Biosoft’un sunduğu, Beacon Designer arayüzü



Şekil 3.4 *Anoxybacillus* (a) grup 1 ve (b) grup 2 için *rpoA* gen bölgelerine özgü dizayn edilen primer ve problemlerin gen lokusu üzerinde ilgili bölgenin SnapGene Viewer programı ile gösterimi

3.5 Genomik DNA İzolasyonları

Thermo Scientific (K0512) Genomic DNA purification kiti kullanılarak aktif bakteri kültürlerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Yaklaşık 18 saat süresince optimum (Çizelge 3.8 ve 3.9) inkübasyon koşullarında geliştirilen bakteriler 0,03-0,04 mg ağırlığına sahip olacak şekilde steril bir mikrofüj tüpü içerisine toplanmış, üzerlerine 10 mg/mL konsantrasyonuna sahip 200 µL hacminde lizozim enzimi eklenerek, 37°C'de 30 dakika süresince inkübe edilmiştir. Süre sonunda ise belirtilen kitin protokolü uygulanmıştır. Elde edilen genomik DNA'ların son konsantrasyonu 200 ng/µL olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışma süresince ana stok DNA'lar -20°C'de, 200 ng/µL olacak şekilde ayarlanan ara stok DNA'lar ise +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.6 PCR Çalışmaları

Bu aşamada, qRT-PCR analizine geçilmeden önce tasarlanan primer-prob çiftlerinden ilkin primer setlerinin doğrulaması konvansiyonel PCR ile yapılmıştır. Bu kısımdaki en kritik hususlardan biri, cins bazlı tasarım sebebiyle hizalamalar primer setlerinde bulunan dejenere baz sayısının bazen birden fazla olması ve qRT-PCR çalışmalarına özgü olarak prob ile birlikte bir set olarak tasarlanmış olmasıdır. Bu nedenle, bağlanma doğruluğunun teyidi amacıyla qRT-PCR analizleri öncesi bu çalışmalar yapılmış olup, cins içi ve cinsler arası yürütülmüş çaprazlamalar sonrasında gen bölgesi ve prob seçimleri bu şekilde yapılmıştır.

Konvansiyonel PCR çalışmaları, üreticinin (Thermo Scientific Taq DNA polymerase (recombinant) EP0402) tavsiye ettiği hacim ve konsantrasyon değerlerinde yürütülmüş olup, gerektiğinde primerlerin bağlanma spesifitelerini tespit edebilmek amacıyla hacim ve son konsantrasyon değerleri modifiye edilmiştir (Çizelge 3.12). Reaksiyon koşullarında ise yine üreticinin tavsiye ettiği koşullar uygulanmış olup, dimer-dimer, cross dimer ve self dimer yapıları için ΔG° değerlerini gerçeğe yakın bir oranda sunan Beacon Designer'ın önerdiği sıcaklıklar baz alınmıştır. Buna göre, her bir sıcaklık 2 derece artırılarak yine her bir primer setine özgü en az 4 sıcaklık değeri seçilmiş ve

böylece sıcaklık gradiyenti uygulanarak (50-60°C aralığı) primerlerin ideal bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.12 Konvansiyonel PCR karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim ve Konsantrasyonlar	
	Üreticinin Tavsiye Ettiği Hacim	Test Edilen
10X Taq Buffer	5 µL	2,5 µL
dNTP mix (10 mM)	1 µL	0,5 µL
Forward primer (10µM)	0,1-1 µM	0,5-1 µL
Reverse primer (10µM)	0,1-1 µM	0,5-1 µL
25 mM MgCl ₂	1-4 µM	2 µL
Kalıp DNA	10 pg-1 µg	0,5 µL (200 ng)
Taq polymerase (EP0402)	1,25 U	0,25 µL
dH ₂ O	Son hacim 50 µL olacak şekilde su eklenir	Son hacim 25 µL olacak şekilde su eklenir (17,25-18,25 µL)

Çizelge 3.13 Konvansiyonel PCR koşulları

Başlangıç denatürasyonu	95°C 1 dakika	35 döngü
Denatürasyon	95°C 30 saniye	
Bağlanma	Gradient (50-60°C) 30 saniye	
Uzama	72°C 1 dakika	
Son Uzama	72°C 5 dakika	

Bu reaksiyonlar cins içi ve cinsler arası çaprazlama reaksiyonlarının sayısını ve hassasiyetini arttırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tüm konvansiyonel PCR sonuçları ışığında ise 8 farklı gen bölgesi için yapılan tasarımlar kendi gruplandırmaları içerisinde taranarak, agaroz jel elektroforezinde ampikon varlığı ve istenilen büyüklüklere sahip olup olmadığına bakılmıştır. Nihai olarak 3 gen bölgesi ve iç kontrol için kullanılacak 1 gen bölgesi seçilebilmiştir.

3.7 Sanger DNA Dizileme Analizleri

In silico çalışmaların dezavantajlarından birisi de dizi ve hizalama bilgilerinin doğru olduğu kabul edilmesine karşın, deneysel çalışmalarda aynı sonuçların elde edilememesi olasılığıdır. Bunu elimine edebilmek ve yapılan çalışmaların doğruluğunu teyit edilebilmek adına, tüm PCR çalışmaları sonunda seçilen primer setleriyle her bir temsilci

olarak seçilen cinse ait ve pozitif sonuç veren PCR ürünleri seçilerek, BigDye Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Kat. No: 4337455) kullanılarak saflaştırılmış olup, hizmet alım yoluyla (İntergen) “forward ve reverse primerler” çift okuma olacak şekilde kapiler elektroforez yöntemiyle, ABI 3130 cihazında Sanger DNA dizileme analizi yapılmıştır. Böylece istenilen hedef gen bölgelerini çoğaltabildikleri, elde edilen ampikon dizilerinin NCBI veri tabanında taranması sonucu teyit edilebilmiştir.

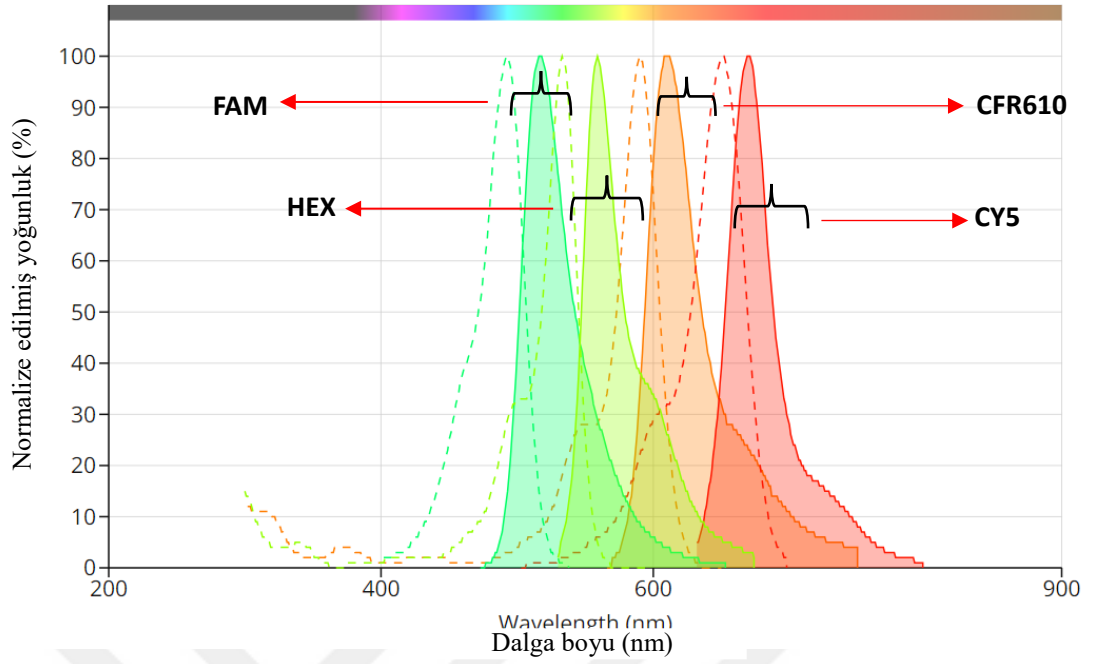
3.8 qRT-PCR Çalışmaları

İlerleyen aşamalarda multipleks (çoklu reaksiyon) qRT-PCR çalışmaları amaçlandığından, problarda kullanılan floresan boyalarda frekans çakışması olmaması amacıyla her bir temsilci gruba ve internal kontrol grubuna, farklı kanallara sahip boya çeşitleri ve uyumlu oldukları quencher (sönümleyici) molekülleri seçilmiştir (Çizelge 3.14 ve Şekil 3.6). Çizelge 3.15’te seçilen kanalların dalga boyları ve cinse özgü boyları verilmiştir. Prob üretimleri, belirlenen kanallar ve quencher moleküller seçilerek hizmet alımı yoluyla (Sentebiolab Biyoteknoloji A. Ş.) temin edilmiştir.

Çizelge 3.14 Taqman problar için seçilen reporter boya ve quencher çiftleri

Kodlamalar	5’ ucu	3’ ucu	Dalga Boyu (nm)	
			Eksitasyon Maksimum	Emisyon Maksimum
<i>Aspo0A</i>	FAM	BHQ1	<u>492 nm</u>	<u>517 nm</u>
<i>GgyrB</i>	HEX	BHQ1	<u>530 nm</u>	<u>556 nm</u>
<i>BgyrB</i>	CY5	BHQ2	<u>650 nm</u>	<u>670 nm</u>
İnternal Kontrol (16S rRNA)	CFR610	BHQ2	<u>590 nm</u>	<u>610 nm</u>

(*Aspo0A*=*Anoxybacillus*, *GgyrB*=*Geobacillus*, *BgyrB*=*Bacillus* cinsleri)



Şekil 3.5 Kullanılan boyaların spektrofotometrik pozisyonları (Yeşil- FAM; Açık yeşil- HEX; Turuncu-CFR 610; Kırmızı- CY5)

Temin edilen Taqman problemlerin öncelikle çalıştıkları kontrol edilmiştir. Ayrıca farklı enzimler [Vazyme enzim L/N 7E571K1 (QT225-01) ve Vazyme buffer L/N 7E571K1 (T225-01-AB) seti, Solid Biodyne SolisFast Probe qPCR Mix with UNG (Kat. No: 28-21-00001) ve iTaq Universal Probes Supermix (Kat. No: 1725131)] ve farklı sıcaklıklar (56-60°C) kullanılarak yapılan ön denemeler sonucunda, izole edilen genomik DNA'lar ile birlikte en iyi sonuç veren enzimin iTaq Universal Probes Supermix (Kat. No: 1725131 BioRad, Çizelge 3.15 ve 3.16) olduğu saptanarak bundan sonraki tüm qRT-PCR çalışmalarında bu enzim kullanılmıştır.

Çizelge 3.15 qRT-Karışımı (iTaq Universal Probes Supermix (Kat. No: 1725131))

İçerik	Hacim	Son Konsantrasyon	Kullanılan Hacim ve Konsantrasyon
iTaq Universal Probes Supermix (2X)	5 µL	1X	5 µL (2X)
Forward ve Reverse Primerler	Değişken	150-900 nM (Her bir primer için)	1 µL (5 µM- her bir primer için)
Fluorojenik Probe	Değişken	150-250 nM	1 µL (2,5 µM)
DNA	Değişken	50ng- 5pg	1 µL (200 ng)
Nükleaz içermeyen su	Son hacmi 10 µL olacak şekilde su eklenir	-	1 µL
Toplam reaksiyon hacmi	10 µL	-	10 µL

qRT-PCR optimizasyon aşaması, reaksiyon koşulları ve bağlanma/uzama sıcaklığı değiştirilerek gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.16). Gerektiği durumlarda ise primer/prob konsantrasyonu değişikliğine gidilerek (Çizelge 3.15), primer-prob çiftlerinin en uygun çalıştığı reaksiyon koşulları ve karışımı belirlenmiştir.

Çizelge 3.16 qRT-PCR koşulları (iTaq Universal Probes Supermix (Kat. No: 1725131))

Polimeraz Aktivasyonu ve Başlangıç Denatürasyonu	95°C 5 dakika	
Denatürasyon	95°C 5 saniye	39 döngü
Bağlanma/Uzama ve Okuma	Gradyent (56-60°C) 30 saniye	

3.8.1 Cinse özgü tasarlanan primer ve prob setlerinin cinsler arası çaprazlanması ve çalışma kapsamında belirlenen 7 basil için hassasiyet değerlerinin belirlenmesi

Belirlenen primer ve prob setlerinin, ilk olarak iç ve dış grup çaprazlamaları gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada kendi cinsi içerisinde çaprazlanan primer ve prob setleri, cins dışında kalan diğer bakteriler ile de çaprazlanmıştır. Bu çaprazlamalar sonucunda, bazı setler için prob dizileri yeniden tasarlanarak, kendi grubu dışında en az pozitif sonuç veren primer ve prob setleri tespit edilerek, hassasiyet değerlerinin belirlenmesi aşamasına geçilmiştir.

Belirlenen primer ve prob setlerinin hassasiyet (LOD- Limit of Detection-Tespit Limiti) değerlerinin tespiti amacıyla, çalışma kapsamında temcisi olarak seçilen 7 türün genomik DNA'ları, 200 ng/μL, 20 ng/μL, 2 ng/μL, 200 pg/μL, 20 pg/μL, 2 pg/μL, 200 fg/μL, 20 fg/μL ve 2 fg/μL (ng=nanogram, pg=picogram, fg=femtogram) konsantrasyonlara sahip olacak şekilde bir seri dilüsyon halinde hazırlanmış, en az 3 paralel olacak şekilde reaksiyonlar kurulmuştur. Reaksiyon bitiminde elde edilen Ct (threshold) değerlerinin ortalaması alınmış, standart eğrileri çizilerek, kantitatif analizler Microsoft Office Excel programı kullanılarak etkinlik (efficiency-E) ve eğim (slope) değerleri hedeflenen güvenilirlik aralığında hesaplanmıştır.

3.8.2 Çoklu qRT-PCR reaksiyon çalışmaları

Her bir temsilci cins için belirlenen primer-prob setleri ve reaksiyonun sağlığını kontrolü için seçilen internal (iç) kontrol primer-prob seti ile birlikte çoklu reaksiyonların optimizasyonları yapılmıştır (Çizelge 3.15 ve 3.16). Bu aşamada, öncelikli, 4 farklı primer ve prob setinin farklı kombinasyonlarda ve ortak bağlanma sıcaklıklarında uygunlukları denenmiş olup, kullanılan enzimin çalışma koşulların da göz önünde bulundurularak, çoklu reaksiyon kurulumuna gidilmiştir. Tekli reaksiyonlarda yapılan işlemlere benzer şekilde, her bir cinse ait primer ve prob setlerinin birlikte en uygun çalıştığı koşulları ve ortamı belirlemek adına, reaksiyon karışımı ve reaksiyon sıcaklığı optimizasyonu yapılmıştır.

3.9 Süte İnoküle Edilen Vejetatif ve Spor Hücrelerinin Geri Kazanılması, DNA izolasyonu ve qRT-PCR Çalışmaları

Çalışma kapsamında belirlenen 7 basilden (Çizelge 3.9) elde edilen spor stokları 121°C'de 5 dakika süresince otoklavlanarak steril edilen ticari süt içerisine bir seri dilüsyon olacak şekilde (10^1 - 10^{10} KOB/mL) inoküle edilmiştir. Her bir dilüsyon faktöründen 500 μL hacimde 3 paralel örnek alınarak: bir paraleli sonraki aşamalarda DNA ekstraksiyonu için kullanılmış, ikinci paraleli de -20°C'ye kaldırılarak yedek olarak saklanmıştır. Geriye kalan üçüncü paralel ise TSA ve BCP besiyerlerine damla ve yayma plak yöntemleri kullanılarak inoküle edilmiş ve petriler bakterilere uygun optimum

sıcaklıklarda (mezofiller ve fakültatif termofiller için 37°C, termofiller için 55°C) bir gece süresince inkübe edilmiştir. Süre bitiminde petrilere gelişen koloniler sayılarak, logaritma 10 tabanında spor konsantrasyonları belirlenmiştir.

Vejetatif hücrelerin eldesi için sporulasyonun en asgari düzeyde olması ve kolonilerin toplanabilmesi adına 7 basıldan en az 5 paralel olmak üzere TSA'ya çizgi ekim yöntemiyle inokülasyonu yapılmış, 12 saat süresince her bir bakteri uygun optimum sıcaklıkla inkübe edildikten sonra gelişen koloniler %0,85 NaCl içeren steril serum fizyolojik solüsyon içerisine toplanmıştır. Toplanan pelet bir kez steril serum fizyolojik solüsyon ile yıkanmış ve santrifüj (6000 g 15 dakika) ile çöktürülen pelet tekrar serum fizyolojik içerisinde süspanse edilerek, karışımdan steril süt içerisine bir seri dilüsyon yapılmıştır. Aynı işlemler tekrarlanarak örnek toplanması ve koloni sayımları sonrası vejetatif hücrelerin konsantrasyonları belirlenmiştir. Tüm örnekler kullanılana kadar – 20°C'de saklanmıştır.

3.9.1 Spor stoklarının süte inoküle edilmesi ve saatlik olarak sayımları

Bölüm 3.2'de üretilen spor stoklarından, nihai hacim 100 mL olacak şekilde, steril süt içerisine son konsantrasyonu 10^3 KOB/mL olan 7 farklı spor stoğu ayrı ayrı aşılanmıştır. Sonrasında her bir bakteri sporu optimum gelişme sıcaklıklarına uygun koşullarda (fakültatif termofiller için 37°C, termofiller için 55°C) 170 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince, inokülasyonun ilk yapıldığı 0. saat dahil olmak üzere, 6, 12, 18 ve 24. saatlerde deney düzeneği içerisinden toplam 1'er mL hacimde olacak şekilde örnek alınmış, DNA izolasyonu için 500 µL hacimlerde tüplere bölüştürülerek - 20°C'de muhafaza edilmiştir. Örnek alımlarının yapıldığı zaman dilimlerinde, damla ve yayma plaka yöntemleri kullanılarak TSA (Çizelge 3.2) ve BCP (Çizelge 3.3) besiyerlerine, hem toplam koloni sayısını belirlemek amacıyla hem de vejetatif hücreleri elimine ederek spor hücrelerinin koloni sayımlarını yapabilmek adına termofiller için 100°C'de 15 dakika süresince kaynatılan, *Bacillus*'lar için ise 80°C'de sıcak su banyosunda 15 dakika süresince (Ceuppens vd. 2010, Hussain vd. 2019) muamele edilen örneklerden ayrı ayrı inokülasyon yapılmış, petrilere bakteri türlerinin optimum gelişme sıcaklıklarında 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır.

3.9.2 Toplanan süt örneklerinden DNA izolasyonu

Rueckert ve arkadaşlarının (2005a, 2005b ve 2006) yürüttüğü süttten hücre toplama ve DNA izolasyon yöntemleri bu aşamada kullanılmış olup, yöntemin geçerliliği Karaca ve arkadaşlarının (2022) yaptığı çalışma kapsamında da teyit edilmiştir.

DNaz I uygulaması sonrası sonikasyon ve cam boncukla vorteksleme olacak şekilde 2 farklı DNA izolasyon yöntemi denenmiştir (Xu ve Marco 2022). İlk olarak toplanan örneklerden iki paralel hazırlanarak DNaz I (Sigma- DN25-10MG) ile muamele edilmiştir. Son konsantrasyonu 200 Kunitz DNaz I içerecek şekilde 1 mL hacmindeki örnekler, enzim aktivasyonu için 37°C'de 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Bu aşama sonrasında, 1 mL'lik örneğe 200 µL hacminde 1,2 M trisodyum-sitrat çözeltisi ve 200 µL hacminde n-decane (Merck Kat. No. 820383-0250) ilave edilerek hafifçe vortekslenmiştir. Örnekler 16.100 g'de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek, oluşan koagulant yapısını içeren süpernatant mikropipet ucu yardımıyla dikkatlice ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu işlemten sonra tüpler tekrar 16.000 g'de 2 dakika boyunca santrifüjlenerek, oluşan süpernatant pipetle uzaklaştırılmıştır. Pelet 1 mL hacminde steril nükleaz, DNaz ve RNaz içermeyen distile su içerisinde süspanse edildikten sonra, DNaz I enzim inaktivasyonu için 80°C'de 10 dakika boyunca sıcak su banyosunda inkübe edilmiştir (Zheng vd. 2017). 1 mm çapındaki steril cam boncuklardan her bir tüpe, 50 mg ağırlığında olacak şekilde süspansiyon üzerine eklenmiştir. Sonikasyonla izolasyon için, hazırlanan örnekler, 120 W (60 amplitude) ve 20 kHz'e (0,8 siklus) ayarlanmış 1 mm çapında çelik ve otoklavlanabilir özellikteki proba, vejetatif hücreler için 125 saniye, spor hücreleri için ise 360 saniye süresince ultrasonikasyona (Dr. Hielscher marka UP200H model sonikatör) uğratılmıştır. Cam boncukla vorteksleme yöntemi için de aynı gramajda cam boncuk içeren diğer paralel örnekler ise aynı süreler kullanılarak yüksek hızda vortekse tabii tutulmuştur.

Süre bitiminde tüm örnekler tekrar 16.000 g'de 2 dakika boyunca santrifüjlenerek, genomik DNA'nın bulunduğu süpernatant steril bir mikrofüj içerisine alınmıştır. Mevcut genomik DNA konsantrasyonu (ng/µL) ve saflık kontrolleri 260, 280 ve 230 nm'deki absorbansları dikkate alınarak; A260/230 ve A260/A280 oranları NanoDrop

Spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific Nanodrop On/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, Seri no. AZY1811504) kullanılarak belirlenmiştir. Süpernatant qRT-PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.9.3 Sütten izole edilen DNA ile qRT-PCR kurulumu

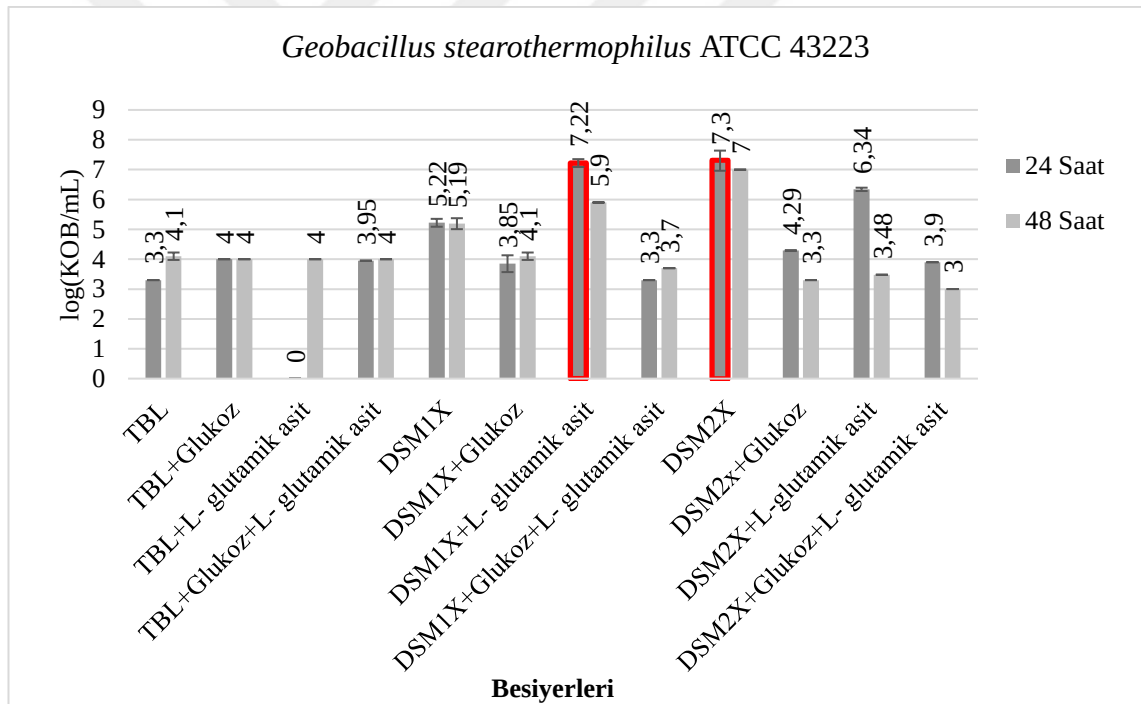
Bölüm 3.8’de yapılan ve optimize edilen qRT-PCR koşulları kullanılarak, Bölüm 3.9.1 ve 3.9.2’de izole edilen DNA’lar ile birlikte qRT-PCR düzenekleri kurulmuştur. Bu aşamada, KOB/mL cinsinden DNA konsantrasyonları belirlenen DNA örnekleri kullanıldığından dolayı, primer ve prob çiftlerinin cins spesifik olacak şekilde KOB/mL biriminden ölçüm hassasiyetlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Vejetatif, spor ve saatlik örneklem alımlarından yapılan inokülasyon sonucu tüm KOB/mL sonuçları logaritma 10 tabanında hesaplanmış, iki farklı izolasyon yöntemiyle (sonikasyon ve vorteksleme) elde edilen DNA’lar ile kurulan qRT-PCR analizleri sonucu Ct değerleri kullanılarak Microsoft Office Excel programında toplu kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Her bir grafik için en uygun matematiksel modellemeler (kübik ve lineer, gerektiği durumlarda her ikisi) Microsoft Office Excel programında belirlenmiş olup, qRT-PCR verilerine karşılık gelebilecek teorik sayımlar (KOB/mL) ise her bir grafiğe uygun olarak yapılan modellemedeki denklemler hesaplanarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Spor Üretimi Optimizasyonu

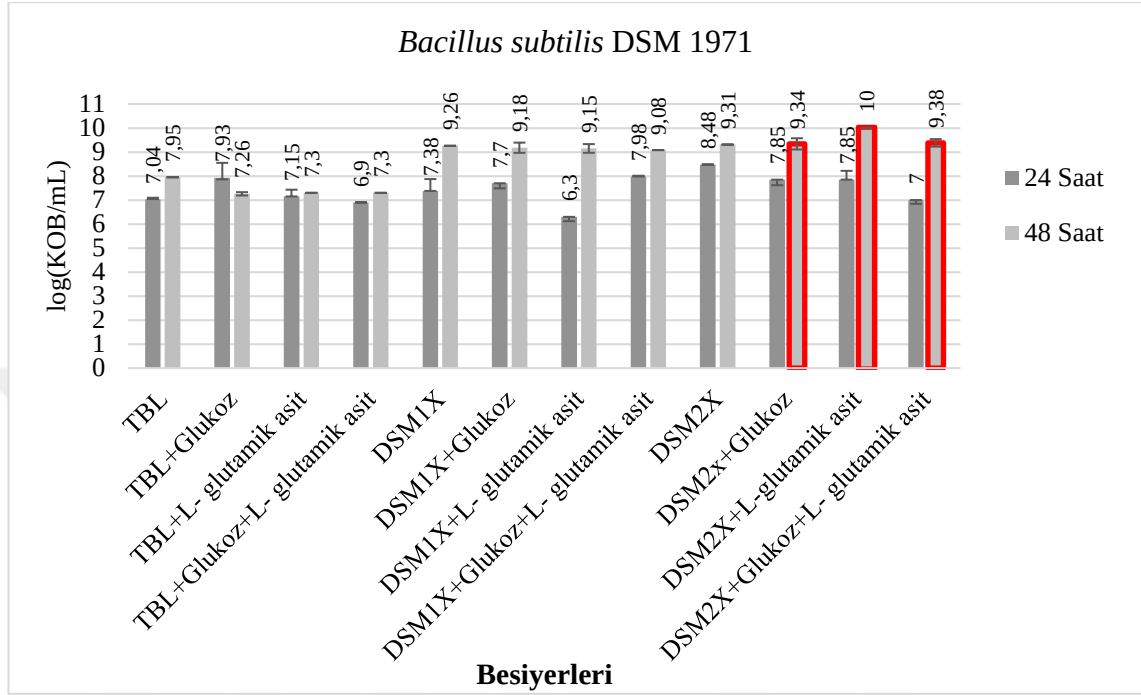
A. flavithermus DSM 2641, *A. kamchatkensis* subsp. *assacharedens* F81 ve *G. thermodenitrificans* DSM 465'in spor üretimleri 55°C'de ve 120 rpm'de önceki çalışmalardaki bulgulara göre gerçekleştirilmiş olup (Karakaya 2019), *G. stearothermophilus* ATCC 43223 için 55°C'de, *B. subtilis* DSM 1971, *B. licheniformis* DSM 13 ve *B. amyloliquefaciens* DSM 7 ise yeni belirlenen için 37°C ve 120 rpm'de ki optimum koşullarda spor üretimleri yapılmıştır. Bu dört basil için saptanan spor üretim besiyerleri Şekil 4.1-4.4 arasında verilmiştir.



Şekil 4.1 *G. stearothermophilus* ATCC 43223 suşunun farklı sporulasyon besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor sayım sonuçları (log (KOB/mL))

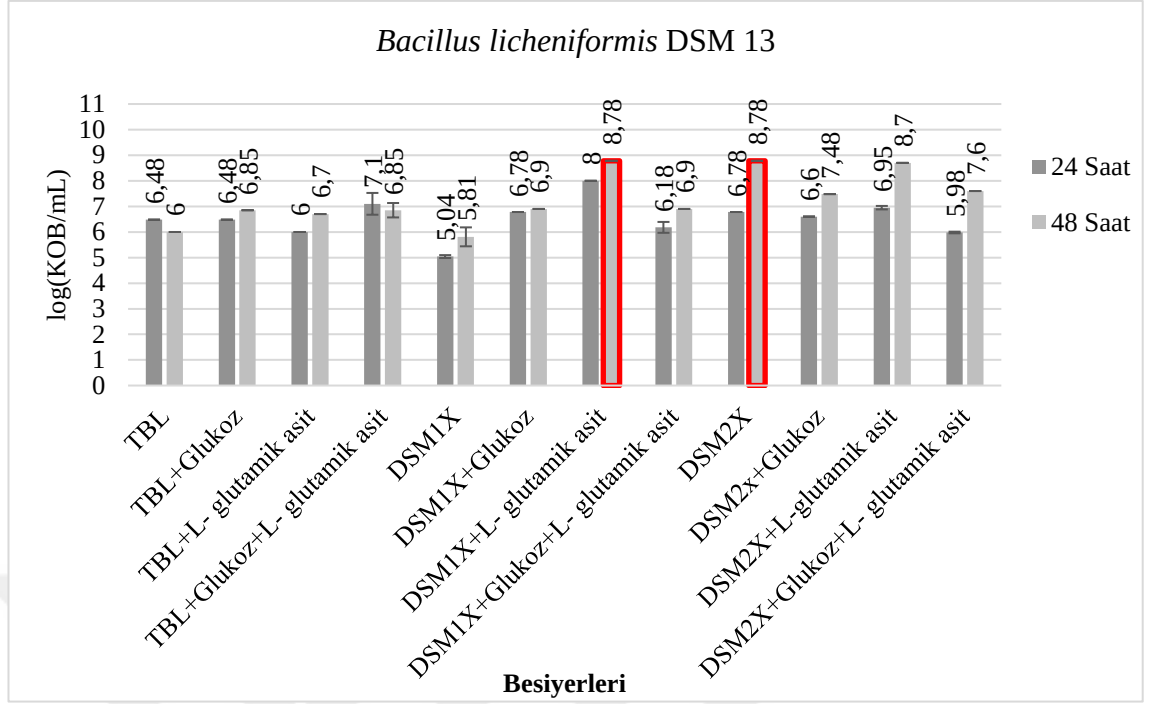
ATCC 43223 referans suşunun 24 saat sonunda en yüksek sporulasyon miktarının, DSM1X+ L-glutamik asit ve DSM2X kombinasyonlara sahip besiyerlerinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.1, Tek Yönlü Varyans Analizi, Wilcoxon testi, GraphPad Prism (Versiyon 10.4.0)). 48 saat sonunda ise diğer besiyeri kombinasyonlarında sporulasyon

oranında düşüş gözlemlendiğinden istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. ATCC 43223'ün spor üretimi için bu sonuçlara göre DSM2X besiyeri seçilmiştir.



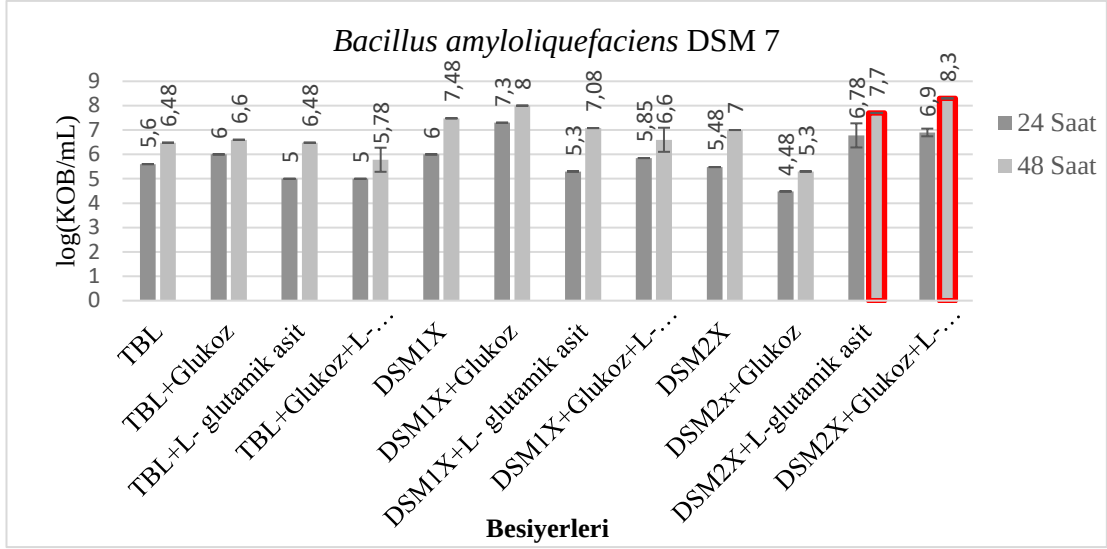
Şekil 4.2 *B. subtilis* DSM 1971 suşunun farklı sporulasyon besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor sayım sonuçları (log (KOB/mL))

DSM 1971 referans suşunun 48 saat sonunda oluşturduğu en yüksek sporulasyon miktarının DSM2X, DSM2X+Glukoz, DSM2X+L-glutamik asit ve DSM2X+Glukoz+L-glutamik asit besiyeri kombinasyonlarında ve 24. saatte gösterdiği belirlenmiş (Şekil 4.2) ve en yüksek sporulasyon miktarını DSM2X besiyerinde oluşturduğu görülmüştür (Tek yönlü varyans analizi, Welch testi $p<0,05$, Wilcoxon testi $p<0,05$, Mann Whitney $p=0,5296$, GraphPad Prism (Versiyon 10.4.0)). Bu nedenle DSM 2X +L- glutamik asit besiyerinde *B. subtilis* spor üretimi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.3 *B. licheniformis* DSM 13 suşunun farklı sporulasyon besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor sayım sonuçları (log (KOB/mL))

DSM 13 referans suşunun 48 saat sonunda en yüksek sporulasyonu, DSM1X+ L- glutamik asit ve DSM2X kombinasyonlarında gösterdiği belirlenmiş olup (Şekil 4.3, Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch $p=0,033$, GraphPad Prism (Versiyon 10.4.0)), istatistiki olarak da anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.4 *B. amyloliquefaciens* DSM 7 suşunun farklı sporulasyon besiyerlerinde 24-48 saat sonunda oluşturduğu spor sayım sonuçları (log (KOB/mL))

DSM 7 referans suşunun 48 saat sonunda en yüksek sporulasyonu, DSM2X+ L-glutamik asit ve DSM2X+Glukoz+L-glutamik asit kombinasyonlara sahip besiyerlerinde gösterdiği belirlenmiş olup (Şekil 4.4, Tek Yönlü Varyans Analizi, Welch $p=0,033$, GraphPad Prism (Versiyon 10.4.0)), istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.1 Yüksek hacimde ve yüksek sporulasyon oranlarına sahip besiyerlerinde üretim sonucu elde edilen spor (KOB/mL) konsantrasyonları

Bakteri Adı	Spor Üretimi İçin Seçilen Besiyeri	Spor Miktarı
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465	TBL + L-glutamik asit ve DSM1X	10^{10} KOB/mL
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223	DSM1X+ L-glutamik asit ve DSM2X	10^8 KOB/mL
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641	DSM2X	10^5 KOB/mL
<i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> F81 hs. <i>A. ayderensis</i>	TBL + L-glutamik asit	10^9 KOB/mL
<i>B. subtilis</i> DSM 1971	DSM2X+L-glutamik asit ve DSM2X+Glukoz+L-glutamik asit	10^9 KOB/mL
<i>B. licheniformis</i> DSM 13	DSM1X+ L-glutamik asit ve DSM2X	10^{11} KOB/mL
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7	DSM2X+ L-glutamik asit ve DSM2X+Glukoz+L-glutamik asit	10^8 KOB/mL

Tüm bakterilerin belirlenen optimum besiyerleri ve koşullarda 500 mL hacimde spor üretimleri gerçekleştirilmiş olup, spor saflaştırma basamakları (Karakaya 2019) uygulandıktan sonra saf spor stokları ileriki aşamalarda kullanılabilecek kadar -20°C 'de

muhafaza edilmiştir. Çizelge 4.1’de tüm bakterilerin spor üretim koşulları ve elde edilen spor stoğu konsantrasyonları verilmiştir. Sadece *A. flavithermus* DSM 2641 türü yüksek hacimli besiyeri kullanılarak yapılan üretimde hedeflenen konsantrasyonlara çıkmamış olup, elde edilen spor stoğu sadece saatlik deney kurulumu aşaması için kullanılabilmiştir.

4.2 Dizi Hizalamaları

Bölüm 2.5 başlığı altında detaylı olarak kuramsal temelleri incelenen ve belirlenen gen bölgeleri, evrimsel süreçte korunmuş olmalarından dolayı seçilen 8 gen (*16S rRNA*, *rpoA*, *rpoB*, *gyrA*, *gyrB*, *spo0A*, *spo0B* ve *spoIIIAB*) bölgesine ait dizi hizalamaları yapılmıştır. Tüm veriler çok uzun olduğundan doğrudan tez yazımına dahil edilmemiş ancak bir MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) ve CLUSTAL W hizalaması bir örnek olarak Şekil 4.5 ve 4.6 sunulmuştur. Diğer dizilerin hizalamaları da benzer şekilde çalışılarak, yedeklenip saklanmıştır.



Şekil 4.5 MEGA 11 (Koichiro vd.2021) yazılımı kullanılarak AgyrAf/r1 seti için gen bölgelerinin hizalanmasına ait bir arayüz ekran görüntüsü örneği.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
Anoxybacillus karvacharensis hs. Anoxybacillus kestanbolensis -----TATTCTTCTT 10
Anoxybacillus kestanbolensis -----CTATTCTTCTT 11
Anoxybacillus thermarum -----T---ATCTCTCTTGCAATTGTT 19
Anoxybacillus kamchatkensis hs. Anoxybacillus ayderensis -----CT---ACTCTTCTTGCAATTGTT 20
Anoxybacillus salavatliensis hs. Anoxybacillus gonensis -----CT---ACTCTTCTTGCAATTGTT 20
Anoxybacillus ayderensis -----CTACTCTCTTGCA 14
Anoxybacillus pushchinoensis -----CTACTCTCTTGCA 14
Anoxybacteriodes rupiense -----T---AGTCTTCTGCTATCCT 19
Anoxybacteriodes amylolyticum -----TT---ATCCTTCTGCTACTGCTTT 20
Anoxybacteriodes volnovskiense -----TT---ATGCTTCTCTCGGCTTT 20
Brevibacillus sedimenti -----AATACTACATCAAGGATCGGAATACGGGCAAGTCTACACCAACCATTCCTC 52
Anoxybacillus gonensis -----ATGCTGSAACGCTGTAAGAAAGAAATAAGTA--TTAGTCAAGAAATGCGTG 46
Anoxybacillus flavithermus -----ATGCTGSAACGCTGTAAGAAAGAAATAAGTA--TTAGTCAAGAAATGCGTG 46
Anoxybacillus tengchongensis -----ATGCTGSAAGAGTAAGGAAGTGAAGTA--TTAGTCAAGAAATGCGTG 46
Anoxybacillus mongoliensis -----TGCTCTGAAGAGTAAGGAAGTGAAGTA--TTAGTCAAGAAATGCGTG 45
Anoxybacillus suryakundensis -----TGCTCTGAAGAGTAAGGAAGTGAAGTA--TTAGTCAAGAAATGCGTG 45
Paranoxybacillus calidus -----TGTCGGAAATCAAAATTTACGAATTAGAGAAGTCAATA--TTAGTCAAGAAATGCGTG 57
Paranoxybacillus vitaminiphilus -----TGTCGGAAATCAAAATTTACGAATTAGAGAAGTCAATA--TTAGTCAAGAAATGCGTG 57
Thermarobacillus caldiproteolyticus -----ATGTCAGAACCAATACCATTACGAATTCGAGAAGTGAATA--TTAGTCAAGAAATGCGTG 58
Anoxybacteriodes tepidamans -----ATGTCAGAAACCAGAATTCACGAATTCGAGAAGTGAATA--TTAGTCAAGAAATGCGTG 58
```

Şekil 4.6 CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) web tabanlı arayüzü AgyrAf/r1 seti için gen dizilerinin hizalanmasına dair örnek ekran görüntüsü

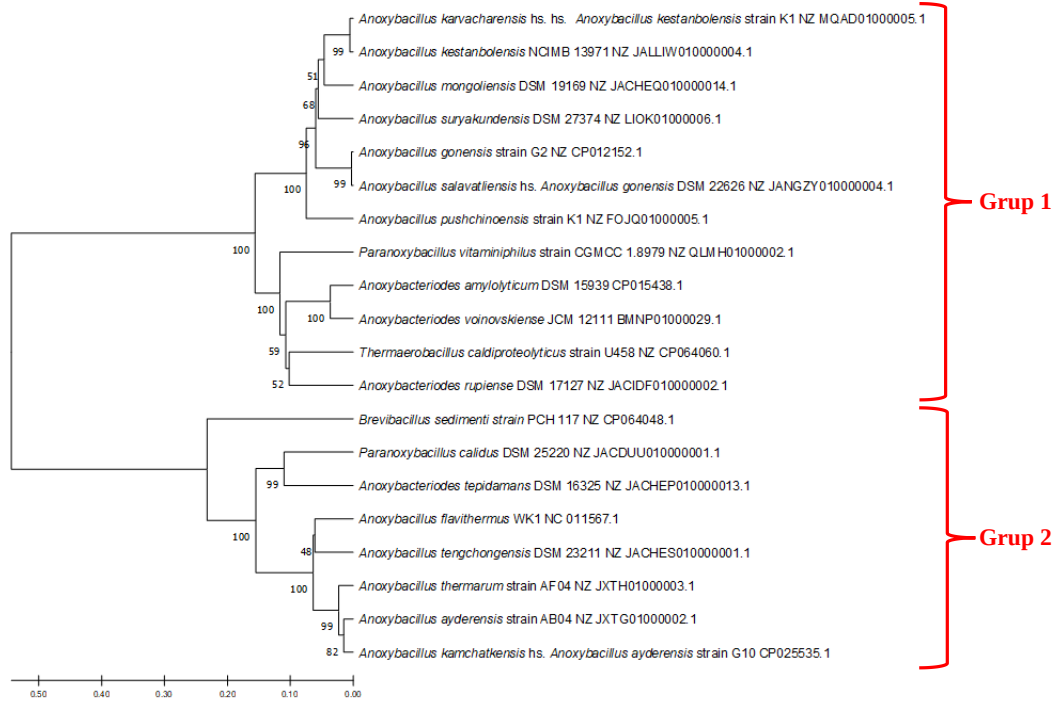
Çalışma kapsamına alınan bu 8 gen (*16S rRNA*, *rpoA*, *rpoB*, *gyrA*, *gyrB*, *spo0A*, *spo0B* ve *spoIIIAB*), süt ve süt ürünleri içerisinde bulunan sporlu basillere özgü olarak (Çizelge 3.10) hizalanarak, Bölüm 4.4'te ki tasarımlar bu hizalamalarda yer alan benzerlik bölgeleri dikkate alınarak yapılmıştır.

4.3 Filogenetik Ağaç ve Benzerlik Tabloları

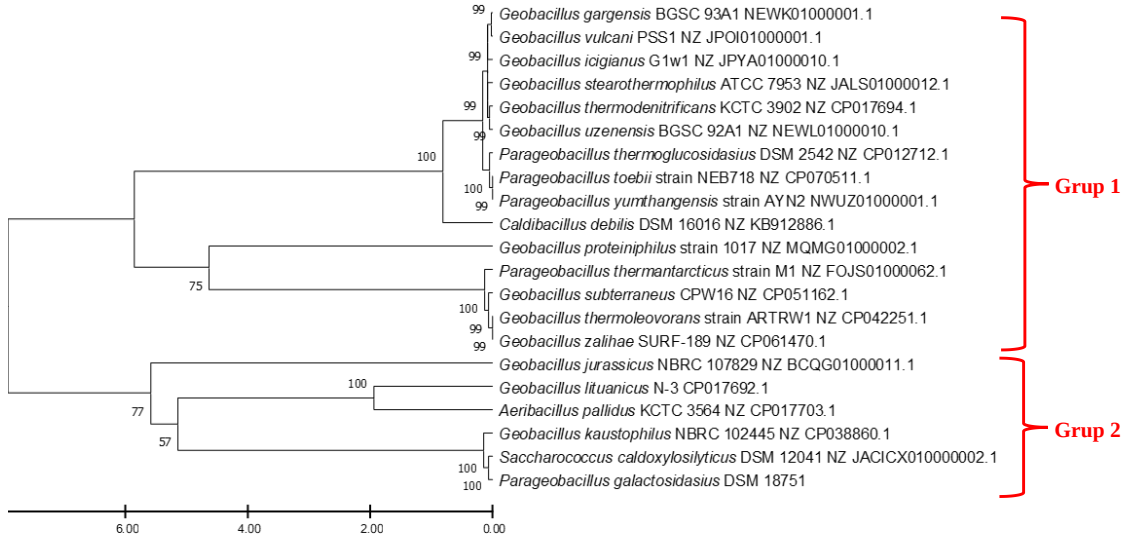
MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) yazılımı kullanılarak NCBI veritabanından çekilen tüm dizi bilgileri, her bir cins ve her bir gene özgü olarak düzenlenerek sıralanmıştır. Sıralama sonrasında ise, UPGMA (Unweighted Pair Group Method) algoritması baz alınarak ve bootstrap değeri 1000 replika olarak seçildikten sonra filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Oluşturulan bu ağaçlarla tür bazındaki kümelenmelerin olduğu çok daha net bir biçimde gözlenmiştir (Cihan vd. 2018).

Elde edilen bu hizalama verilerine göre, gene göre değişmekle beraber, hizalamaların iki veya üç gruba bölündüğü gözlenmiş olup, benzerlikleri tespit edebilmek için sınıflandırma yapılarak, bu türler gerektiğinde grup 1 ve grup 2 şeklinde farklı gruplar altında ayrı ayrı hizalanmıştır. Filogenetik ağaçların belirlenen gen bölgelerine özgü olarak çizilmesinden sonra, benzerlik oranlarının belirlenmesi için yine MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) ile dendogramlar oluşturulmuştur. Maximum likelihood özelliği seçilerek yapılan pairwise distance matriksiyle % benzerlik oranları hesaplanmıştır. Bu kısımda çalışılmış tüm gen grupları yerine sadece her cinse özgü olarak seçilmiş spesifik

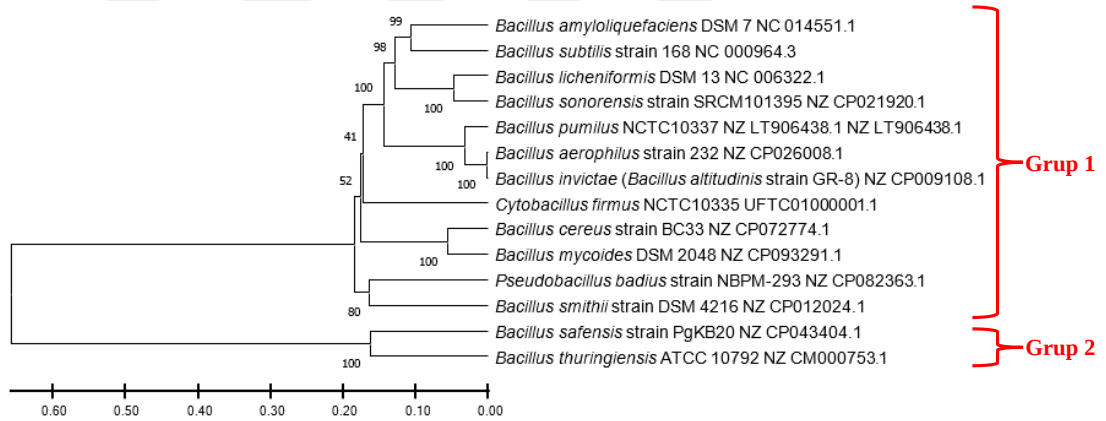
primer çiftlerine ait (Çizelge 4.5) bilgiler sunulmuştur. Süt ve süt ürünleri içerisinde sıklıkla rastlanılan bakteriler için nihai olarak seçilmiş primer ve prob setlerine özgül gen bölgeleri için çizilen filogenetik ağaçlar Şekil 4.7-4.9 arasında sunulmuştur.



Şekil 4.7 Aspo0A grubu olarak seçilen sporlu basillerin gen dizileriyle MEGA 11 (Koichiro vd.2021) programında UPGMA algoritması kullanılarak elde edilen ağaç



Şekil 4.8 GgyrB grubu olarak seçilen sporlu basillerin gen dizileriyle MEGA 11 (Koichiro vd.2021) programında UPGMA algoritması kullanılarak elde edilen ağaç



Şekil 4.9 BgyrB grubu olarak seçilen sporlu basillerin gen dizileriyle MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) programında UPGMA algoritması kullanılarak elde edilen ağaç

Seçilen setlerin tasarlandığı gen bölgeleriyle ilgili dendogramlar da Çizelge 4.2-4.4 arasında sunulmuştur.

Çizelge 4.2 Aspo0A-f/r ve P-spo0A seti için gen dizilerinin hizalaması sonrası MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) yazılımı ile yapılan Maximum Likelihood Pairwise benzerlik analizi

	<i>A. amyloctylicum</i> DSM 15939	<i>A. ayderensis</i> AB04	<i>T. caldiproteolyticus</i> U458	<i>A. calidus</i> DSM 25220	<i>A. flavithermus</i> WK1	<i>A. gonensis</i> G2	<i>A. kamchatkensis</i> hs. <i>A. ayderensis</i> G10	<i>A. karvacharensis</i> K1	<i>A. kestanbolensis</i> NCIMB 13971	<i>A. mongoliensis</i> DSM 19169	<i>A. pushchinoensis</i> K1	<i>A. rupiense</i> DSM 17127	<i>A. salavallensis</i> hs. <i>A. gonensis</i> DSM 22626	<i>B. sediminii</i> PCH 117	<i>A. suryakundensis</i> DSM 27374	<i>A. tengchongensis</i> DSM 23211	<i>A. tepidamans</i> DSM 16325	<i>A. thermarum</i> AF04	<i>P. vitaminophilus</i> CGMCC 1.8979	<i>A. voinovskense</i> JCM 12111
<i>Anoxybacteriodes amyloctylicum</i> DSM 15939 CP015438.1																				
<i>Anoxybacillus ayderensis</i> strain AB04 NZ_JXTG01000002.1	98,93																			
<i>Thermaerobacillus caldiproteolyticus</i> strain U458 NZ_CP064060.1	99,78	98,85																		
<i>Paranoxybacillus calidus</i> DSM 25220 NZ_JACDUU010000001.1	98,75	99,67	98,75																	
<i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1 NC_011567.1	98,91	99,87	98,82	99,65																
<i>Anoxybacillus gonensis</i> strain G2 NZ_CP012152.1	99,70	99,02	99,69	98,91	98,99															
<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> hs. <i>Anoxybacillus ayderensis</i> strain G10 CP025535.1	98,91	99,97	98,83	99,66	99,87	98,99														
<i>Anoxybacillus karvacharensis</i> hs. <i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> strain K1 NZ_MQAD01000005.1	99,70	99,08	99,66	98,93	99,03	99,87	99,05													
<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i> NCIMB 13971 NZ_JALLIW010000004.1	99,70	99,06	99,66	98,92	99,02	99,88	99,04	99,99												
<i>Anoxybacillus mongoliensis</i> DSM 19169 NZ_JACHEQ010000014.1	99,69	99,02	99,66	98,92	98,99	99,87	98,99	99,90	99,90											
<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i> strain K1 NZ_FQJQ01000005.1	99,69	99,01	99,68	98,87	98,99	99,85	98,99	99,84	99,84	99,83										
<i>Anoxybacteriodes rupiense</i> DSM 17127 NZ_JACIDF010000002.1	99,78	98,83	99,79	98,70	98,81	99,69	98,81	99,69	99,69	99,68	99,68									
<i>Anoxybacillus salavallensis</i> hs. <i>Anoxybacillus gonensis</i> DSM 22626 NZ_JANGZY010000004.1	99,70	99,01	99,69	98,90	98,98	99,99	98,98	99,88	99,88	99,87	99,85	99,69								
<i>Brevibacillus sediminii</i> strain PCH 117 NZ_CP064048.1	98,87	99,53	98,78	99,51	99,53	98,96	99,52	98,96	98,94	98,92	98,93	98,74	98,95							
<i>Anoxybacillus suryakundensis</i> DSM 27374 NZ_LJOK010000006.1	99,68	98,97	99,66	98,92	98,95	99,87	98,94	99,87	99,88	99,90	99,84	99,67	99,87	98,94						
<i>Anoxybacillus tengchongensis</i> DSM 23211 NZ_JACHES010000001.1	98,91	99,88	98,84	99,63	99,87	98,98	99,87	99,01	99,01	98,97	98,95	98,79	98,97	99,54	98,92					
<i>Anoxybacteriodes tepidamans</i> DSM 16325 NZ_JACHEP010000013.1	98,79	99,72	98,73	99,78	99,72	98,87	99,72	98,87	98,86	98,85	98,79	98,71	98,87	99,57	98,82	99,69				
<i>Anoxybacillus thermarum</i> strain AF04 NZ_JXTH01000003.1	98,92	99,96	98,84	99,67	99,86	99,02	99,94	99,06	99,05	98,99	99,00	98,80	99,01	99,52	98,94	99,86	99,71			
<i>Paranoxybacillus vitaminophilus</i> strain CGMCC 1.8979 NZ_QLMH01000002.1	99,75	98,87	99,77	98,70	98,88	99,68	98,85	99,67	99,67	99,67	99,66	99,77	99,69	98,89	99,65	98,90	98,74	98,86		
<i>Anoxybacteriodes voinovskense</i> JCM 12111 BMNP01000029.1	99,92	98,91	99,78	98,73	98,90	99,71	98,89	99,71	99,70	99,68	99,69	99,79	99,71	98,88	99,68	98,89	98,78	98,90	99,76	

*(Bootstrap value 1000 replika olarak belirlenmiştir, **Turuncu** olarak işaretli olanlar grup 1, diğerleri grup 2 olarak sınıflandırılmıştır, **kırmızı yazılı** olanlar farklı cins ait türleri göstermekle beraber, en düşük ve en yüksek benzerlik oranları **kahın** yazılı olarak çizelgede işaretlenmiştir)

Çizelge 4.3 GgyrB-f/r ve P-GgyrB seti için dizilerinin hizalaması sonrası MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) yazılımı ile yapılan Maximum Likelihood Pairwise benzerlik analizi

	<i>S. caldosylosilyticus</i> DSM 12041	<i>C. debilis</i> DSM 16016	<i>P. galactosidarius</i> DSM 18751	<i>G. icigianus</i> GIw1	<i>G. jurassicus</i> NBRC 107829	<i>G. kaustophilus</i> NBRC 102445	<i>G. lituanicus</i> N-3	<i>A. pallidus</i> KCTC 3564	<i>G. proteinophilus</i> strain 1017	<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 7953	<i>G. subterraneus</i> CPW16	<i>P. argeobacillus thermantarcticus</i> strain M1	<i>G. thermocatenulatus</i> BGSC 93A1	<i>G. thermodenitrificans</i> KCTC 3902	<i>P. thermoglucosidarius</i> DSM 2542	<i>G. thermoleovorans</i> strain ARTRW1	<i>P. toebii</i> strain NEB718	<i>G. izenensis</i> BGSC 92A1	<i>G. vulcani</i> PSS1 N	<i>P. yunhangensis</i> strain AYN2	<i>G. zailhae</i> SURF-189
<i>Saccharococcus caldosylosilyticus</i> DSM 12041																					
<i>Caldibacillus debilis</i> DSM 16016 NZ_KB912886.1	99.40																				
<i>Parageobacillus galactosidarius</i> DSM 18751	99.86	99.39																			
<i>Geobacillus icigianus</i> GIw1 NZ_JPYA01000010.1	99.44	99.7	99.42																		
<i>Geobacillus jurassicus</i> NBRC 107829 NZ_BCQG01000011.1	99.44	99.72	99.43	99.86																	
<i>Geobacillus kaustophilus</i> NBRC 102445 NZ_CP038860.1	99.78	99.42	99.77	99.46	99.47																
<i>Geobacillus lituanicus</i> N-3 CP017692.1	99.78	99.42	99.75	99.46	99.47	99.86															
<i>Aeribacillus pallidus</i> KCTC 3564 NZ_CP017703.1	99.75	99.38	99.74	99.41	99.42	99.70	99.70														
<i>Geobacillus proteinophilus</i> strain 1017 NZ_MQMG01000002.1	99.78	99.41	99.77	99.46	99.47	99.96	99.86	99.70													
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 NZ_JALS01000012.1	99.44	99.72	99.43	99.84	99.86	99.47	99.47	99.41	99.47												
<i>Geobacillus subterraneus</i> CPW16 NZ_CP051162.1	99.78	99.42	99.78	99.46	99.48	99.87	99.86	99.72	99.87	99.47											
<i>Parageobacillus thermantarcticus</i> strain M1 NZ_FOJS01000062.1	99.88	99.39	99.89	99.43	99.44	99.78	99.77	99.75	99.79	99.44	99.79										
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> BGSC 93A1 NEWK01000001.1	99.44	99.72	99.43	99.86	99.88	99.47	99.47	99.41	99.47	99.85	99.47	99.43									
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> KCTC 3902 NZ_CP017694.1	99.44	99.71	99.43	99.84	99.84	99.46	99.46	99.42	99.46	99.85	99.46	99.44	99.85								
<i>Parageobacillus thermoglucosidarius</i> DSM 2542 NZ_CP012712.1	99.43	99.72	99.42	99.77	99.79	99.45	99.46	99.41	99.45	99.78	99.45	99.42	99.78	99.77							
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> strain ARTRW1 NZ_CP042251.1	99.78	99.42	99.77	99.46	99.47	99.99	99.86	99.70	99.96	99.46	99.87	99.78	99.47	99.46	99.45						
<i>Parageobacillus toebii</i> strain NEB718 NZ_CP070311.1	99.42	99.70	99.42	99.76	99.77	99.44	99.45	99.42	99.43	99.75	99.44	99.42	99.76	99.7	99.89	99.44					
<i>Geobacillus izenensis</i> BGSC 92A1 NZ_NEWL01000010.1	99.44	99.72	99.43	99.85	99.86	99.46	99.47	99.41	99.46	99.86	99.46	99.44	99.86	99.91	99.79	99.46	99.78				
<i>Geobacillus vulcani</i> PSS1 NZ_JPOI01000001.1	99.43	99.72	99.43	99.86	99.88	99.47	99.47	99.41	99.47	99.84	99.46	99.43	99.95	99.85	99.79	99.47	99.77	99.86			
<i>Parageobacillus yunhangensis</i> strain AYN2 NWUZ01000001.1	99.42	99.70	99.422	99.76	99.77	99.44	99.45	99.42	99.44	99.75	99.44	99.42	99.76	99.77	99.89	99.44	99.99	99.78	99.77		
<i>Geobacillus zailhae</i> SURF-189 NZ_CP061470.1	99.78	99.42	99.770	99.46	99.47	99.99	99.86	99.70	99.96	99.47	99.87	99.78	99.47	99.46	99.45	99.99	99.44	99.46	99.47	99.44	

*(Bootstrap value 1000 replika olarak belirlenmiştir, **Turuncu** olarak işaretli olanlar grup 1, diğerleri grup 2 olarak sınıflandırılmıştır, **kırmızı** yazılı olanlar farklı cins ait türleri göstermekle beraber, en düşük ve en yüksek benzerlik oranları **kalem** yazılı olarak çizelgede işaretlenmiştir)

Çizelge 4.4 BgyrB-f/r ve P-BgyrB seti için dizilerinin hizalaması sonrası MEGA 11 (Koichiro vd. 2021) yazılımı ile yapılan Maximum Likelihood Pairwise benzerlik analizi

	<i>B. aerophilus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>P. badius</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. firmus</i>	<i>B. invictae (B. altitudinis)</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. safensis</i>	<i>B. smithii</i>	<i>B. sonorensis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. pumilus</i>
<i>Bacillus aerophilus</i> strain 232 NZ_CP026008.1														
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7 NC_014551.1	99,71													
<i>Pseudobacillus badius</i> strain NBPM-293 NZ_CP082363.1	99,61	99,63												
<i>Bacillus cereus</i> strain BC33 NZ_CP072774.1	99,67	99,64	99,59											
<i>Cytobacillus firmus</i> NCTC10335 UFTC01000001.1	99,65	99,63	99,65	99,64										
<i>Bacillus invictae (B. altitudinis)</i> strain GR-8) NZ_CP009108.1	99,99	99,72	99,61	99,67	99,65									
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 NC_006322.1	99,70	99,74	99,64	99,63	99,67	99,71								
<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048 NZ_CP093291.1	99,66	99,62	99,59	99,88	99,63	99,66	99,64							
<i>Bacillus safensis</i> strain PgKB20) NZ_CP043404.1	98,71	98,64	98,65	98,65	98,61	98,73	98,65	98,63						
<i>Bacillus smithii</i> strain DSM 4216 NZ_CP012024.1	99,63	99,62	99,67	99,65	99,63	99,63	99,64	99,64	98,68					
<i>Bacillus sonorensis</i> strain SRCM101395 NZ_CP021920.1	99,70	99,75	99,64	99,64	99,65	99,71	99,90	99,63	98,69	99,63				
<i>Bacillus subtilis</i> str. 168 NC_000964.3	99,71	99,78	99,63	99,64	99,66	99,71	99,73	99,62	98,60	99,62	99,72			
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 NZ_CM000753.1	98,77	98,66	98,66	98,68	98,67	98,78	98,67	98,70	99,67	98,74	98,69	98,65		
<i>Bacillus pumilus</i> NCTC10337 NZ_LT906438.1	99,93	99,71	99,61	99,66	99,64	99,93	99,69	99,66	98,70	99,63	99,69	99,70	98,75	

*(Bootstrap value 1000 replika olarak belirlenmiştir, **Turuncu** olarak işaretli olanlar grup 1, diğerleri grup 2 olarak sınıflandırılmıştır, **kırmızı** yazılı olanlar farklı cinse ait türleri göstermekle beraber, en düşük ve en yüksek benzerlik oranları **kalıın** yazılı olarak çizelgede işaretlenmiştir)

4.4 Primer ve Prob Tasarımları

Primer ve prob tasarımları, hizalama sonucunda en çok benzerlik gösteren gen dizi bölgeleri seçilerek öncelikle manuel olarak yapılmış, bu öncül tasarım sonrasında Premier Biosoft'un Beacon Designer web tabanlı yazılımından faydalanılmıştır. Primer ve prob tasarımları oluşturulurken, üç farklı oligonükleotit dizisinin hairpin, dimer – dimer ve self dimer yapılarının oluşturduğu ΔG (Gibbs serbest enerji değişimi) değerleri, Forward ve reverse primer dizisinin kodladığı bölge boyutunun 300 baz çiftini geçmemesine, prob dizisinin forward ve reverse primer dizilerinden uzun olması ve erime sıcaklığının (T_m) daha fazla olması gibi hususlara dikkat edilmiştir. Yöntem 3.4'te anlatılan gruplara ve benzerlik yoğunluğunun çok olduğu bölgelere dikkat edilerek tasarımlar yapılmıştır. Nihai primer ve prob tasarımlarının dizileri ticarileşme süreçleri ve patent başvurusu hassasiyetlerinden ötürü tez içeriğine dahil edilmeden sadece cinslere özgü gen bölgelerine göre oluşturulmuş kodlar şeklinde sunulmuştur (Çizelge 4.5)

Çizelge 4.5 Primer ve prob tasarımlarının sporlu basillerin yakınlık derecelerine göre yapılan kodlandırmaları

	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoA</i>	<i>rpoB</i>	<i>spo0A</i>	<i>spo0B</i>	<i>spoIIAB</i>
Primer Seti (Forward/ Reverse: 5'-3'/3'-5')	BgyrA-f/r1, BgyrA-f/r2	BgyrB-f/r1, BgyrB-f/r2	BrpoA-f/r1, BrpoA-f/r2	BrpoB-f/r1, BrpoB-f/r2	Bspo0A-f/r1, Bspo0A-f/r2	Bspo0B-f/r1, Bspo0B-f/r2	BspoIIAB-f/r1, BspoIIAB-f/r2
Prob (5'-3')	P-BgyrA1 P-BgyrA2	P-BgyrB1, P-BgyrB2	P-BrpoA1, P-BrpoA2	P-BrpoB1 P-BrpoB2	P-Bspo0A1 P-Bspo0A2	P-Bspo0B1 P-Bspo0B2	P-BspoIIAB1 P-BspoIIAB2
Primer Seti (Forward/ Reverse: 5'-3'/3'-5')	AgyrA-f/r1, AgyrA-f/r2	AgyrB-f/r1, AgyrB-f/r2	ArpoA-f/r1, ArpoA-f/r2	ArpoB-f/r1, ArpoB-f/r2	Aspo0A-f/r1, Aspo0A-f/r2	Aspo0B-f/r1, Aspo0B-f/r2	AspoIIAB-f/r1, AspoIIAB-f/r2
Prob (5'-3')	P-AgyrA1 P-AgyrA2	P-AgyrB1, P-AgyrB2	P-ArpoA1, P-ArpoA2	P-ArpoB1 P-ArpoB2	P-Aspo0A1 P-Aspo0A2	P-Aspo0B1 P-Aspo0B2	P-AspoIIAB1 P-AspoIIAB2
Primer Seti (Forward/ Reverse: 5'-3'/3'-5')	GgyrA-f/r1, GgyrA-f/r2	GgyrB-f/r1, GgyrB-f/r2	GrpoA-f/r1, GrpoA-f/r2	GrpoB-f/r1, GrpoB-f/r2	Gspo0A-f/r1, Gspo0A-f/r2	Gspo0B-f/r1, Gspo0B-f/r2	GspoIIAB-f/r1, GspoIIAB-f/r2
Prob (5'-3')	P-GgyrA1 P-GgyrA2	P-GgyrB1, P-GgyrB2	P-GrpoA1, P-GrpoA2	P-GrpoB1 P-GrpoB2	P-Gspo0A1 P-Gspo0A2	P-Gspo0B1 P-Gspo0B2	P-GspoIIAB1 P-GspoIIAB2

Çizelge 4.5'te yer alan kodlandırmalar, primer seti için sırasıyla; ilk harflendirme kısaltılmış olarak sporlu basillerin yer aldığı cinsleri, daha sonra tasarlandığı gen bölgesini; f/r olarak belirtilen kısım primer setini (forward/reverse), en son da yer alan rakam ise gruplandırmayı (1=grup 1, 2=grup 2, *Bknz Bölüm 4.2 ve 4.3*) ifade etmektedir.

P ile ifade edilen ise ilgili prob dizisini işaret etmektedir. Örneğin, BgyrB-f/r1, P-BgyrB1, *Bacillus* cinsi B, *gyrB* geni grup 1 için tasarlanan forward ve reverse primer setini ve prob dizisini temsil etmektedir.

4.5 Konvansiyonel PCR ve Sanger DNA Dizi Analizi Bulguları

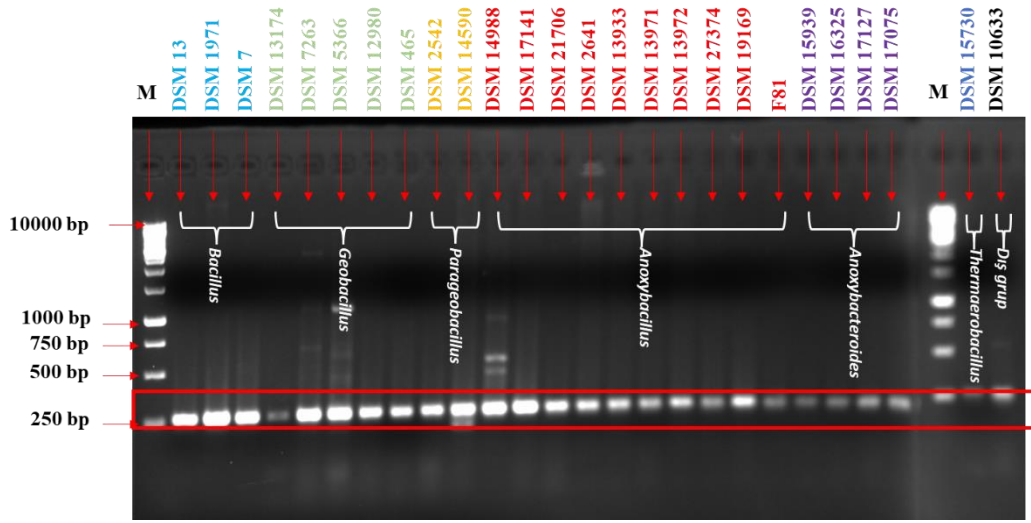
Her bir primer seti, kendi grubunda yer alan türler ve diğer cinslerdeki yer alan türlerle (Çizelge 3.8 ve 3.9) kendine özgü ideal PCR koşullarında çalışılmıştır. Böylece, cinsler arası ve dış grup olarak belirlenen diğer cins ve türlere bağlanarak ampikon oluşturan primer setleri çalışma kapsamında elimine edilerek, sadece kendi cinsine ait türlerin DNA'larına spesifik bağlanma gösteren primer setleri belirlenmiştir. Seçilen primer setlerinin cins içi ve dışı çaprazlama reaksiyonlarına ait agaroz jel görüntüleri (Şekil 4.10-4.13) ve belirlenen optimal PCR koşulları Çizelge 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6'da sarı işaretli kutucuklardaki 11 primer çifti elverişli olabilecekleri düşünülerek bir sonraki qRT-PCR çalışmalarında sınanmak üzere seçilmişlerdir. Bunlardan sarı işaretli ve **koyu kırmızı*** (Çizelge 4.6) ile yazılı primerler ise nihai olarak qRT-PCR sonrası tüm çalışmalarda kullanılmak için saptanmış primerlerdir. Bu bağlamda, toplam 4 adet primer seti belirlenmiş olup (her bir cins için birer adet [*Anoxybacillus* için Aspo0A-f/r2, *Bacillus* için BgyrB-f/r1, *Geobacillus* için GgyrB-f/r1] ve A16SrRNA-f/r1 ise iç kontrol olarak kullanılmak üzere bir adet) ilerleyen çalışmalar bu primer setleri üzerinden gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.6). Bu dört primerden internal kontrol olarak seçilen A16SrRNA-f/r1 primeri ise beklendiği üzere, tüm cinslere ait türlerde pozitif reaksiyon vermiştir.

Çizelge 4.6 Tasarlanan primer setlerine göre ideal PCR koşulları ve cins içi ve cinsler arası yapılan çaprazlamalar ile belirlenen reaksiyon sonuçları

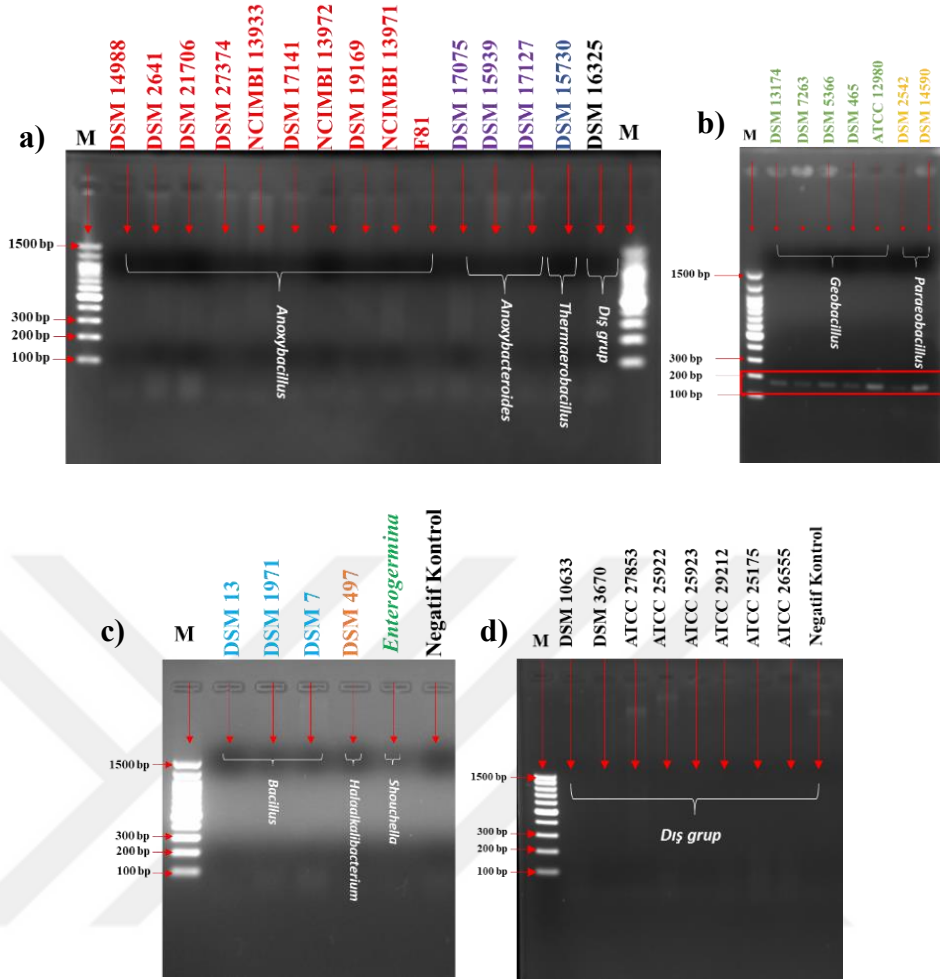
Hedef Cins	Primer setleri /Özellikleri	Kontrol Gruplarıyla Konvansiyonel PCR Çaprazlama Sonuçları				qRT-PCR için seçilen primerler
		<i>Bacillus/ Halalkalibacterium/ Shouchella</i>	<i>Anoxybacillus/ Anoxybacteriodes/ Thermoerobacillus</i>	<i>Geobacillus/ Parageobacillus</i>	Dış Grup	
<i>Bacillus</i>	BrpoA-f/r1 /178 bp 52°C	+	+-	-	TE	
	BrpoB-f/r1 /159 bp 54°C	+	+	+-	TE	
	BgyrA-f/r1 /215 bp 52°C	+	+-	+-	+-	+
	BgyrB-f/r1 /235 bp 50°C	+	+-	-	-	+
	Bspo0A-f/r1 /187 bp 50°C	+	+-	-	-	+
	Bspo0B-f/r1 /164 bp	-	TE	TE	TE	
	BspoIIIAB-f/r1/141 bp					
	BrpoA-f/r2/131 bp 52°C	+	+	+	TE	
	BrpoB-f/r2/139 bp 52°C	+-	-	-	TE	
	BgyrA-f/r2/168 bp 52°C	-	-	-	TE	
	BgyrB-f/r2/302 bp 52°C	+	-	-	TE	+
	Bspo0A-f/r2/248 bp 50°C	+-	-	-	TE	+
<i>Anoxybacillus</i>	A16SrRNA-f/r1/264 bp 52°C	+	+	+	+	+
	ArpoA-f/r1/203 bp 56°C	+	+	+	TE	
	ArpoB-f/r1/230 bp 52°C	+-	+	+-	TE	
	AgyrA-f/r1/283 bp 50°C	+	+-	+-	TE	
	AgyrB-f/r1/185 bp 52°C	-	+	-	-	+
	Aspo0A-f/r1/269 bp 52°C	-	+	-	-	+
	Aspo0B-f/r1/230 bp 54°C	-	+-	-	TE	
	AspoIIIAB-f/r1/311 bp 52°C	+-	+-	-	TE	
	ArpoA-f/r2/139 bp 52°C	+	+	+	TE	
	ArpoB-f/r2/211 bp 52°C	+-	+	+-	TE	
<i>Geobacillus</i>	Aspo0A-f/r2/202 bp 56°C	-	+	-	-	+
	GrpoA-f/r1/200 bp 56°C	-	-	+	-	+
	GrpoB-f/r1/118 bp 52°C	+-	+	+-	TE	
	GgyrA-f/r1/197 bp 56°C	-	-	-	TE	
	GgyrB-f/r1/170 bp 52°C	-	-	+	-	+
	Gspo0A-f/r1/156 bp	TE	TE	-	TE	
	Gspo0B-f/r1/90 bp	TE	TE	-	TE	
	GspoIIIAB-f/r1/166 bp 50°C	+-	+-	+-	TE	
	GrpoB-f/r2/110 bp 52°C	TE	TE	-	TE	
	GgyrA-f/r2/221 bp 52°C	+-	+-	+	+-	

(*+: primer seti hedeflenen cinse özgü türlere bağlandı, + -: hedeflenen cins içerisindeki türlerin bir kısmına bağlanıp diğerlerine bağlanmadı; -: cinse özgü türlere bağlanmadı, TE: test edilmedi, sarıyla işaretli 11 primer: qRT-PCR için seçilenler, kırmızı yazılan primerler: nihai olarak seçilen 4 primer çiftini ifade eder)



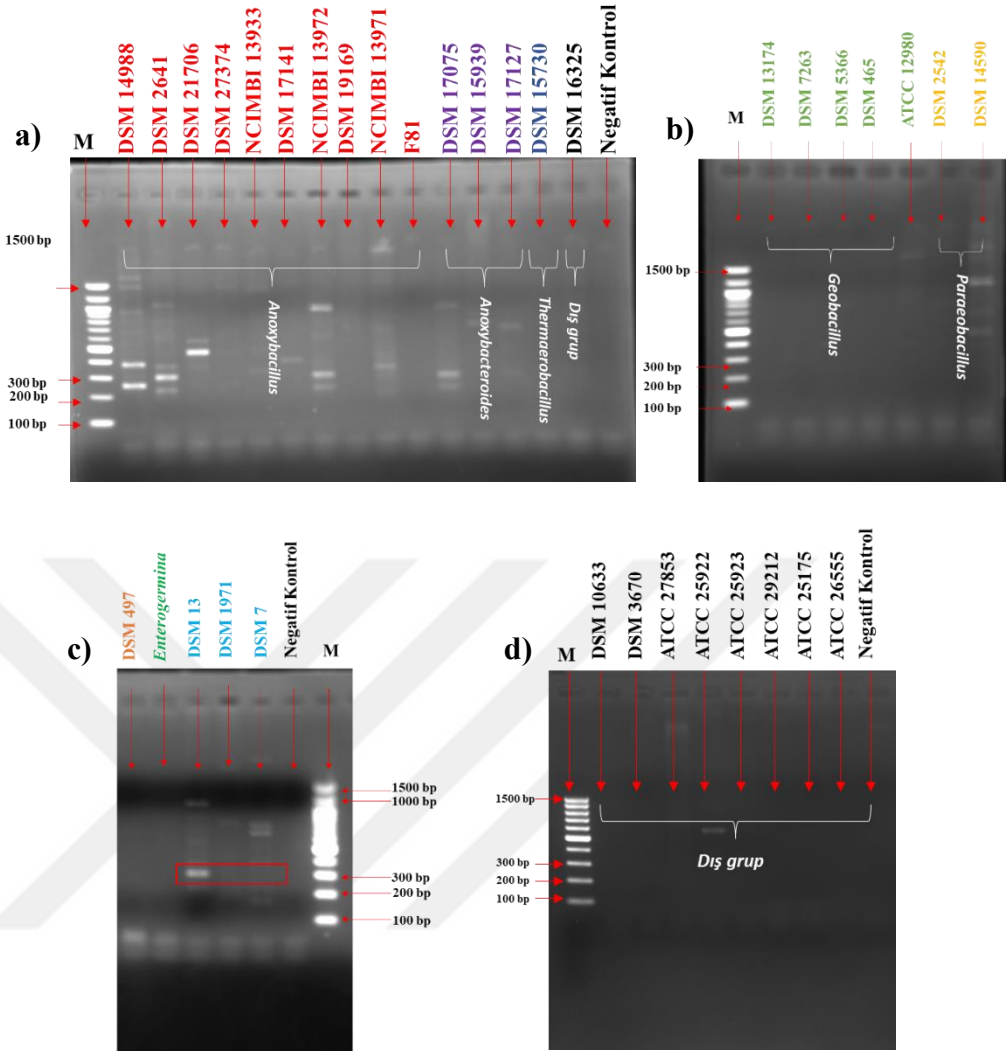
Şekil 4.10 İnternal kontrol olarak kullanılan, *Anoxybacillaceae* ve *Bacillaceae* familya üyelerinin tamamına bağlanan A16SrRNA-f/r1 primerinin konvansiyonel PCR’da temsilci türlerle pozitif çapraz reaksiyon sonuçlarına ait agaroz jel görüntüsü. Jel üzerindeki bakteri türlerinin renklendirmesi cinslerine göre yapılmıştır (Amplikon boyutu: 264 bp, Tm: 52°C).

Anoxybacillus*, *Anoxybacteriodes* ve *Thermoaerobacillus* üyeleri; DSM 27374: *A. suryakundensis*, DSM 19169: *A. mongoliensis*, DSM 16325: *A. tepidemans* (*Anoxybacteriodes tepidemans*), DSM 14988: *A. kamchatkensis* (*Anoxybacillus ayderensis*), NCIMB 13933: *A. gonensis*, NCIMB 13971: *A. kestanbolensis*, NCIMB 13972: *A. ayderensis*, DSM 21706: *A. kaynarcensis*, DSM 15939: *A. amylolyticus* (*Anoxybacteriodes amylolyticus*), DSM 15730: *A. caldiproteolyticus* (*Thermoaerobacillus caldiproteolyticus*), DSM 17141: *A. thermarum*, DSM 17075: *A. voinovskiensis* (*Anoxybacteriodes voinovskiensis*), DSM 17127: *A. rupiensis* (*Anoxybacteriodes rupiensis*), DSM 2641: *A. flavithermus*, DSM 18475: *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (*Anoxybacillus ayderensis*), *Geobacillus* ve *Parageobacillus* üyeleri; DSM 465: *G. thermodenitrificans*, ATCC 12980: *G. stearothermophilus*, DSM 14590: *G. toebii* (*Parageobacillus toebii*), DSM 7263: *G. kaustophilus*, DSM 13174: *G. vulcanii*, DSM 2542: *G. thermoglucosidans* (*Parageobacillus thermoglucosidans*), DSM 5366: *G. thermoleovorans*, *Bacillus*, *Halalkalibacterium* ve *Shouchella* üyeleri_ DSM 1971: *B. subtilis*, ATCC 6633: *B. subtilis*, DSM 13: *B. licheniformis*, DSM 7: *B. amyloliquefaciens*; DSM 497: *B. halodurans* (*Halalkalibacterium halodurans*) *B. clausii*-*Enterogermina* (*Shouchella clausii*), **Negatif Kontrol Grubu Üyeleri: DSM 10633: *Ureibacillus thermosphaericus*, DSM 3670: *Aeribacillus pallidus*, ATCC 26555: *Candida albicans*, ATCC 27853: *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922: *Escherichia coli*, ATCC 25923: *Staphylococcus aureus*, ATCC 29212: *Enterococcus faecalis*, ATCC 25175: *Streptococcus mutans*



Şekil 4.11 Sadece *Geobacillus* ve *Parageobacillus* cinsi üyelerinin türlerine bağlanan GgyrB-f/r1 primerinin konvansiyonel PCR’da temsilci türlerle çapraz reaksiyon sonuçlarına ait agaroz jel görüntüleri. Jel üzerindeki bakteri türlerinin renklendirmesi cinslerine göre yapılmıştır (Amplikon boyutu: 170 bp, Tm: 52°C)

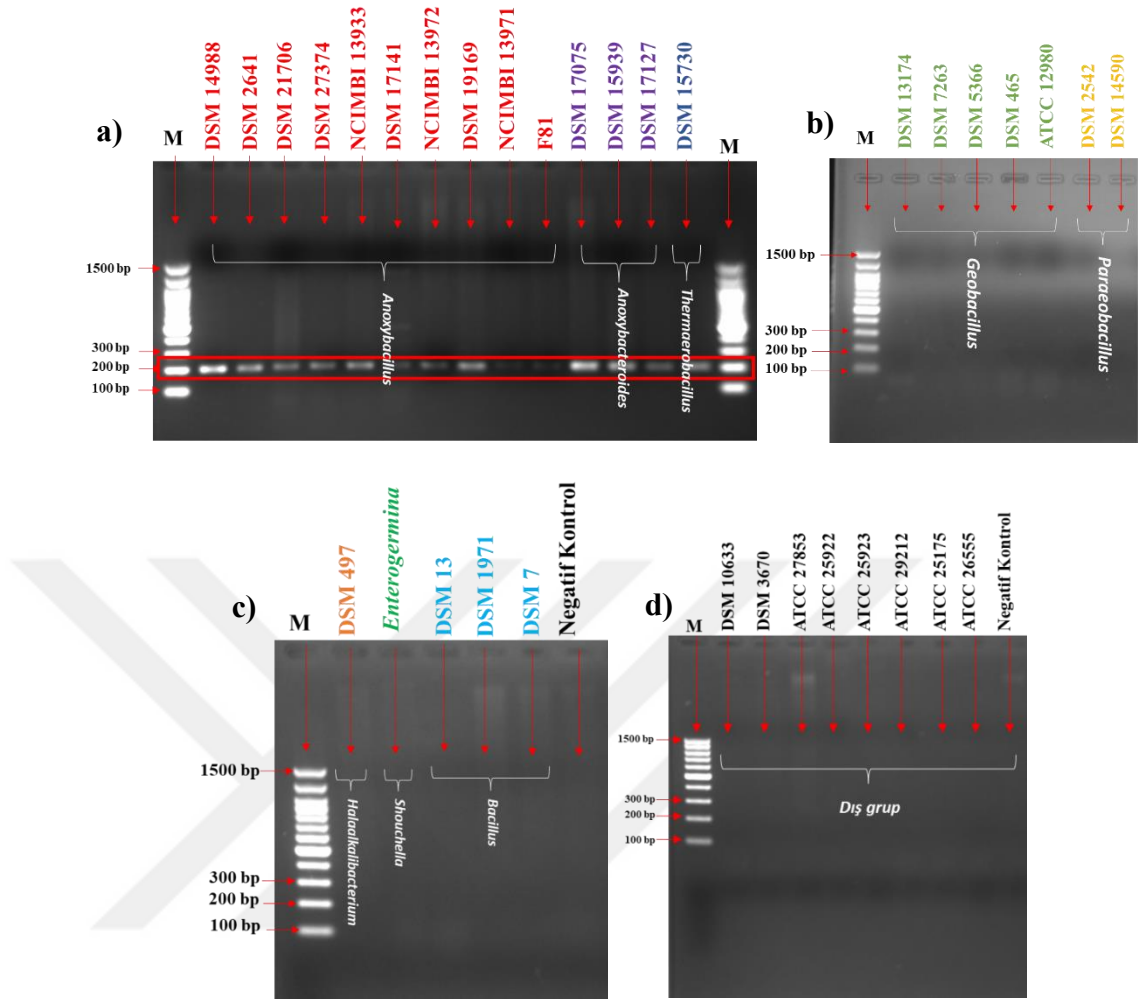
*a) *Anoxybacillus*, *Anoxybacterioides* ve *Thermoaerobacillus* üyeleri; DSM 27374: *A. suryakundensis*, DSM 19169: *A. mongoliensis*, DSM 16325: *A. tepidemans* (*Anoxybacterioides tepidemans*), DSM 14988: *A. kamchatkensis* (*Anoxybacillus ayderensis*), NCIMB 13933: *A. gonensis*, NCIMB 13971: *A. kestanbolensis*, NCIMB 13972: *A. ayderensis*, DSM 21706: *A. kaynarcensis*, DSM 15939: *A. amylolyticus* (*Anoxybacterioides amylolyticus*), DSM 15730: *A. caldiproteolyticus* (*Thermoaerobacillus caldiproteolyticus*), DSM 17141: *A. thermarum*, DSM 17075: *A. voinovskiensis* (*Anoxybacterioides voinovskiensis*), DSM 17127: *A. rupiensis* (*Anoxybacterioides rupiensis*), DSM 2641: *A. flavithermus*, DSM 18475: *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (*Anoxybacillus ayderensis*), b) *Geobacillus* ve *Parageobacillus* üyeleri; DSM 465: *G. thermodenitrificans*, ATCC 12980: *G. stearothermophilus*, DSM 14590: *G. toebii* (*Parageobacillus toebii*), DSM 7263: *G. kaustophilus*, DSM 13174: *G. vulcanii*, DSM 2542: *G. thermoglucosidans* (*Parageobacillus thermoglucosidans*); DSM 5366: *G. thermoleovorans*; c) *Bacillus*, *Halalkalibacterium* ve *Shouchella* üyeleri; DSM 1971: *B. subtilis*, ATCC 6633: *B. subtilis*, DSM 13: *B. licheniformis*, DSM 7: *B. amyloliquefaciens*; DSM 497: *B. halodurans* (*Halalkalibacterium halodurans*) *B. clausii*-*Enterogermina* (*Shouchella clausii*), d) **Negatif Kontrol Grubu Üyeleri**: DSM 10633: *Ureibacillus thermosphaericus*, DSM 3670: *Aeribacillus pallidus*, ATCC 26555: *Candida albicans*, ATCC 27853: *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922: *Escherichia coli*, ATCC 25923: *Staphylococcus aureus*, ATCC 29212: *Enterococcus faecalis*, ATCC 25175: *Streptococcus mutans*



Şekil 4.12 Sadece *Bacillus* cinsi üyelerinin türlerine bağlanan BgyrB-f/r1 primerinin konvansiyonel PCR’da temsilci türlerle çapraz reaksiyon sonuçlarına ait agaroz jel görüntüleri. Jel üzerindeki bakteri türlerinin renklendirmesi cinslerine göre yapılmıştır (Amplikon boyutu: 235 bp, Tm: 50°C)

***a)** *Anoxybacillus*, *Anoxybacteriodes* ve *Thermoaerobacillus* üyeleri; DSM 27374: *A. suryakundensis*, DSM 19169: *A. mongoliensis*, DSM 16325: *A. tepidemans* (*Anoxybacteriodes tepidemans*), DSM 14988: *A. kamchatkensis* (*Anoxybacillus ayderensis*), NCIMB 13933: *A. gonensis*, NCIMB 13971: *A. kestanbolensis*, NCIMB 13972: *A. ayderensis*, DSM 21706: *A. kaynarcensis*, DSM 15939: *A. amylolyticus* (*Anoxybacteriodes amylolyticus*), DSM 15730: *A. caldiproteolyticus* (*Thermoaerobacillus caldiproteolyticus*), DSM 17141: *A. thermarum*, DSM 17075: *A. voinovskiensis* (*Anoxybacteriodes voinovskiensis*), DSM 17127: *A. rupiensis* (*Anoxybacteriodes rupiensis*), DSM 2641: *A. flavithermus*, DSM 18475: *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (*Anoxybacillus ayderensis*), **b)** *Geobacillus* ve *Parageobacillus* üyeleri; DSM 465: *G. thermodenitrificans*, ATCC 12980: *G. stearothermophilus*, DSM 14590: *G. toebii* (*Parageobacillus toebii*), DSM 7263: *G. kaustophilus*, DSM 13174: *G. vulcanii*, DSM 2542: *G. thermoglucosidans* (*Parageobacillus thermoglucosidans*); DSM 5366: *G. thermoleovorans*; **c)** *Bacillus*, *Halalkalibacterium* ve *Shouchella* üyeleri; DSM 1971: *B. subtilis*, ATCC 6633: *B. subtilis*, DSM 13: *B. licheniformis*, DSM 7: *B. amyloliquefaciens*; DSM 497: *B. halodurans* (*Halalkalibacterium halodurans*) *B. clausii*-*Enterogermine* (*Shouchella clausii*), **d)** **Negatif Kontrol Grubu Üyeleri**: DSM 10633: *Ureibacillus thermosphaericus*, DSM 3670: *Aeribacillus pallidus*, ATCC 26555: *Candida albicans*, ATCC 27853: *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922: *Escherichia coli*, ATCC 25923: *Staphylococcus aureus*, ATCC 29212: *Enterococcus faecalis*, ATCC 25175: *Streptococcus mutans*

BgyrB-f/r1 primeri, konvansiyonel PCR'da kendi grubu içindeki *Bacillus* cinsi türleriyle pozitif reaksiyon göstermiştir. Bunun yanı sıra, artık farklı cinsler altında sınıflandırılan *Halalkalibacterium halodurans* DSM 497 ve *Shouchella clausii* (*Enterogermina*) türleriyle ise beklendiği şekilde negatif sonuç alınmıştır. Ancak, “*A. kamchatkensis*” hs., *Anoxybacillus ayderensis* DSM 14988, *A. flavithermus* DSM 2641 ve *A. kaynarcensis* DSM 21706 gibi bazı *Anoxybacillus* türleriyle birden fazla bant oluşturarak spesifik olmayan reaksiyonlar göstermiştir (Çizelge 4.6). Buna rağmen, konvansiyonel PCR çalışmalarında kısmi reaksiyon gösteren bu çapraz etkileşimler, optimizasyon sonrasında qRT-PCR çaprazlamalarında negatif sonuç verdiği için (Çizelge 4.8) ilk bulgular dikkate alınmamıştır.



Şekil 4.13 Sadece *Anoxybacillus*, *Anoxybacteriodes* ve *Thermaerobacillus* cinsi üyelerinin türlerine bağlanan Aspo0A-f/r2 primerinin konvansiyonel PCR sonuçlarına ait agaroz jel görüntüleri. Jel üzerindeki bakteri türlerinin renklendirmesi cinslerine göre yapılmıştır (Amplikon boyutu: 202 bp, Tm: 56°C)

***a) *Anoxybacillus*, *Anoxybacteriodes* ve *Thermaerobacillus* üyeleri;** DSM 27374: *A. suryakundensis*, DSM 19169: *A. mongoliensis*, DSM 16325: *A. tepidemans* (*Anoxybacteriodes tepidemans*), DSM 14988: *A. kamchatkensis* (*Anoxybacillus ayderensis*), NCIMB 13933: *A. gonensis*, NCIMB 13971: *A. kestanbolensis*, NCIMB 13972: *A. ayderensis*, DSM 21706: *A. kaynarcensis*, DSM 15939: *A. amylolyticus* (*Anoxybacteriodes amylolyticus*), DSM 15730: *A. caldiproteolyticus* (*Thermoaerobacillus caldiproteolyticus*), DSM 17141: *A. thermarum*, DSM 17075: *A. voinovskiensis* (*Anoxybacteriodes voinovskiensis*), DSM 17127: *A. rupiensis* (*Anoxybacteriodes rupiensis*), DSM 2641: *A. flavithermus*, DSM 18475: *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (*Anoxybacillus ayderensis*), **b) *Geobacillus* ve *Parageobacillus* üyeleri;** DSM 465: *G. thermodenitrificans*, ATCC 12980: *G. stearothermophilus*, DSM 14590: *G. toebii* (*Parageobacillus toebii*), DSM 7263: *G. kaustophilus*, DSM 13174: *G. vulcanii*, DSM 2542: *G. thermoglucosidans* (*Parageobacillus thermoglucosidans*); DSM 5366: *G. thermoleovorans*; **c) *Bacillus*, *Halalkalibacterium* ve *Shouchella* üyeleri;** DSM 1971: *B. subtilis*, ATCC 6633: *B. subtilis*, DSM 13: *B. licheniformis*, DSM 7: *B. amyloliquefaciens*; DSM 497: *B. halodurans* (*Halalkalibacterium halodurans*) *B. clausii*-Enterogermina (*Shouchella clausii*), **d) Negatif Kontrol Grubu Üyeleri:** DSM 10633: *Ureibacillus thermosphaericus*, DSM 3670: *Aeribacillus pallidus*, ATCC 26555: *Candida albicans*, ATCC 27853: *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922: *Escherichia coli*, ATCC 25923: *Staphylococcus aureus*, ATCC 29212: *Enterococcus faecalis*, ATCC 25175: *Streptococcus mutans*

Seçilen bu primerlerden (GgyrB-f/r1, Aspo0A-f/r2, BgyrB-f/r1) sadece kendi grup üyeleriyle pozitif bant veren ve diğery dış gruplarla reaksiyon vermeyen PCR amplikonları Sanger dizi analizine tabii tutulmuştur. İnternal kontrol olarak seçilen A16SrRNA-f/r1 primer setinin PCR ürünü için ise *B. licheniformis* DSM 13 suşu seçilmiştir. Elde edilen diziler FASTA formatında alınmış ve Unipro UGENE (Okonechnikov vd. 2012) programında düzenlendikten sonra, BLAST analiziyle hedef bölgeyi çoğaltabildikleri teyit edilerek, dizilerin doğrulukları kontrol edilebilmiştir. Bu amaçla diziler ilk olarak UGENE programında, orijinal FASTA dizisi üzerinden her bir yönden ortalama 100 bp kesim yapılarak (trimming) ve dizi haritalaması (mapping) denilen bir yöntem kullanılarak düzenlenmiştir. Her bir genomik DNA'nın referans dizisi NCBI üzerinden seçilerek (örneğin PCR reaksiyonunun yapıldığı genomik DNA olan *G. stearothermophilus* için NCBI'da yer alan referans) gerek UGENE programı üzerinden (Şekil 4.14a-4.17a) gerekse de NCBI web arayüzü (Şekil 4.14b-4.17b) ile BLAST analizine alınmıştır. Ek olarak ise, CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) analiziyle daha önceden primer ve prob dizaynı için hizalanan diziler ile tekrar teyit amaçlı hizalama yapılmıştır (Şekil 4.14c-4.17c). Bu kısımda temsilci bazı sonuçlar sunulabilmiştir.

c)

```

C. debilis          TCAGATATCCAGATTTTTTACGTACAAGGCGTTTTCTTCGATGAATTGCCTTCTCGGTT 60
P. thermoglucosidasiu TTAATGTCCAGTTTTTACATATCGGCGATTTTCTTCAATGAATGCTCTTCTTGGGTC 60
P. toebii          TTAATGTCTAAGTTTTTACATATCGGCGATTTTCTTCAATAAACTGCCTTCTCGGTT 60
P. yumthangensis    TTAATGTCTAAGTTTTTACATATCGGCGATTTTCTTCAATAAACTGCCTTCTCGGTT 60
G. thermodenitrificans CTAAATATCCAGTTTTTACATAAACGGGCGTTTTCTTCAATAAACTGCAGCGCGGTT 60
G. uzenensis        TTAATATCCAGTTTTTACATAAACGGGCGTTTTCTTCAATAAACTGCAGCGCGGTT 60
G. icigianus        CTAGATATCTAAGTTTTTACGTAAACGGGCGTTTTCTTCGATAAACTGCAGCGCGGTT 60
G. stearothermophilus CTAAATGTCCAGTTTTTACATAAACGGGCGTTTTCTTCGATAAACTGCAGCGCGGTT 60
GgyrB-f/r1         -----TGCCTTTCTTCGATAAAATGGCGCGTGGCTC 33
G. jurassicus       -TAAATATCCAGTTTTTACGTAAACGGGCGTTTTCTTCGATGAATTGGCGCGCGGTT 59
G. thermocatenulatus CTAAATGTCCAGTTTTTACATAAACGGGCGATTTTCTTCGATGAATGGCGCGCGGTT 60
G. vulcani          CTAAATGTCCAGTTTTTACATAAACGGGCGATTTTCTTCGATGAATGGCGCGCGGTT 60
                    ** * * * * *

C. debilis          CACCCGGTCGCCCATCAGCATTTGAAAGTCTCATCCGCTCGATGGGCTTCCAGGCT 120
P. thermoglucosidasiu TACTTTATCTCCCATCAAAATTTCAAAAGTCTCTCGTCAAGTTCAATGCACTTTGAAGGCT 120
P. toebii          TACTTTATCTCCCATCAAAATTTCAAAAGTCTCTCGTCAAGTTCAATGCACTTTGAAGGCT 120
P. yumthangensis    TACTTTATCTCCCATCAAAATTTCAAAAGTCTCTCGTCAAGTTCAATGCACTTTGAAGGCT 120
G. thermodenitrificans CACCTTGTCCGCCATTAAATTTCAAAAGTCTCTCGTCAAGTTCAATGCACTTTGAAGGCT 120
G. uzenensis        CACTTTGTCCGCCATTAAATTTCAAAAGTCTCTCGTCAAGTTCAATGCACTTTGAAGGCT 120
G. icigianus        GACTTTATCGCCCATTAATTTCAAAAGTCTCTCGTCAAGTTCAATGCACTTTGAAGGCT 120
G. stearothermophilus GACTTTGTCCGCCATTAAATTTCAAAAGTCTCTCGTCAAGTTCAATGCACTTTGAAGGCT 120
GgyrB-f/r1         GACTTTGTCCGCCATTAAATTTCAAAAGTCTCTCGTCAAGTTCAATGCACTTTGAAGGCT 93
G. jurassicus       GACTTTATCAGCCATTAAATTTCAAAAGTCTCTCGTCAAGTTCAATGCACTTTGAAGGCT 119
G. thermocatenulatus AACTTTATCGCCCATTAATTTCAAAAGTCTCTCGTCAAGTTCAATGCACTTTGAAGGCT 120
G. vulcani          GACTTTATCGCCCATTAATTTCAAAAGTCTCTCGTCAAGTTCAATGCACTTTGAAGGCT 120
                    ** * * * * *

C. debilis          CACCTGCAGCAGCGTCCGGTTTTCCGGATTCACTGCTGTTTTCCCAAGCTGCTCGGGTT 180
P. thermoglucosidasiu GACTTGAAGCAGCGTTCTTGTCTCTGATTCACTGCTGTTTTCCCAATTAATGTTCCGGTT 180
P. toebii          AACTTGAAGCAGCGTTCTTGTCTCTGATTCACTGCTGTTTTCCCAATTAATGTTCCGGTT 180
P. yumthangensis    AACTTGAAGCAGCGTTCTTGTCTCTGATTCACTGCTGTTTTCCCAATTAATGTTCCGGTT 180
G. thermodenitrificans CACTTGCAGCAATGTTCTCGTTTTCCGGATTCACTGCTGTTTTCCCAAGTTGCTCTGGATT 180
G. uzenensis        CACTTGCAGCAATGTTCTCGTTTTCCGGATTCACTGCTGTTTTCCCAAGTTGCTCTGGATT 180
G. icigianus        CACTTGCAGCAATGTTCTCGTTTTCCGGATTCACTGCTGTTTTCCCAAGTTGCTCTGGATT 180
G. stearothermophilus GACTTGAAGCAATGTTCTCGTTTTCCGGATTCACTGCTGTTTTCCCAAGTTGCTCTGGATT 180
GgyrB-f/r1         GACTTGAAGCAATGTTCTCGTTTTCCGGATTCACTGCTGTTTTCCCAAGTTGCTCTGGATT 153
G. jurassicus       GACTTGCAGCAATGTTCTCGTTTTCCGGATTCACTGCTGTTTTCCCAAGTTGCTCTGGATT 179
G. thermocatenulatus CACTTGCAGCAATGTTCTCGTTTTCCGGATTCACTGCTGTTTTCCCAAGTTGCTCTGGATT 180
G. vulcani          CACTTGCAGCAATGTTCTCGTTTTCCGGATTCACTGCTGTTTTCCCAAGTTGCTCTGGATT 180
                    ** * * * * *

C. debilis          CATTTGCGCCCAACCTTTTATAGCGCTGAATGCCGGGTTTTCCGGCTGGCTGGGAAGGACTT 240
P. thermoglucosidasiu CATTTCTCCAGACCTTTTATAAGCTTGAATCGTCGGTTTTCCGGATTTTCCGGCAATTCCGC 240
P. toebii          CATTTCTCCAGACCTTTTATAAGCTTGAATCGTCGGTTTTCCGGATTTTCCGGCAATTCCGC 240
P. yumthangensis    CATTTCTCCAGACCTTTTATAAGCTTGAATCGTCGGTTTTCCGGATTTTCCGGCAATTCCGC 240
G. thermodenitrificans CATCTCGGCCAATCCTTTTGTAGCGCTGAATCACTGCTGTTTTGGCTGAGCGGCGAGTTGGC 240
G. uzenensis        CATTTGCGCCCAATCCTTTTGTAGCGCTGAATCGTCGGTTTTCCGGCTGATCGGGCAGCTCGGC 240
G. icigianus        CATCTCGGCCAATCCTTTTGTAGCGCTGAATCGTCGGTTTTGGGCTGATCGGGCAGCTCGGC 240
G. stearothermophilus CATCTCGGCCAATCCTTTTGTAGCGCTGAATCGTCGGTTTTGGGCTGATCGGGCAGCTCAGC 240
GgyrB-f/r1         CATCTCGGCCAATCCTTT-----170
G. jurassicus       CATTTCTCCCAACCTTTTGTAGCGCTGAATGGTCGGCTTCCGGCTGATCTGGAAGCTCAGC 239
G. thermocatenulatus CATTTGCGCCCAATCCTTTTATAGCGCTGAATCGTCGGTTTTGGCTGATCGGGCAGCTCGGC 240
G. vulcani          CATTTGCGCCCAATCCTTTTATAGCGCTGAATCGTCGGTTTTGGCTGATCGGGCAGCTCGGC 240
                    *** ** * * *

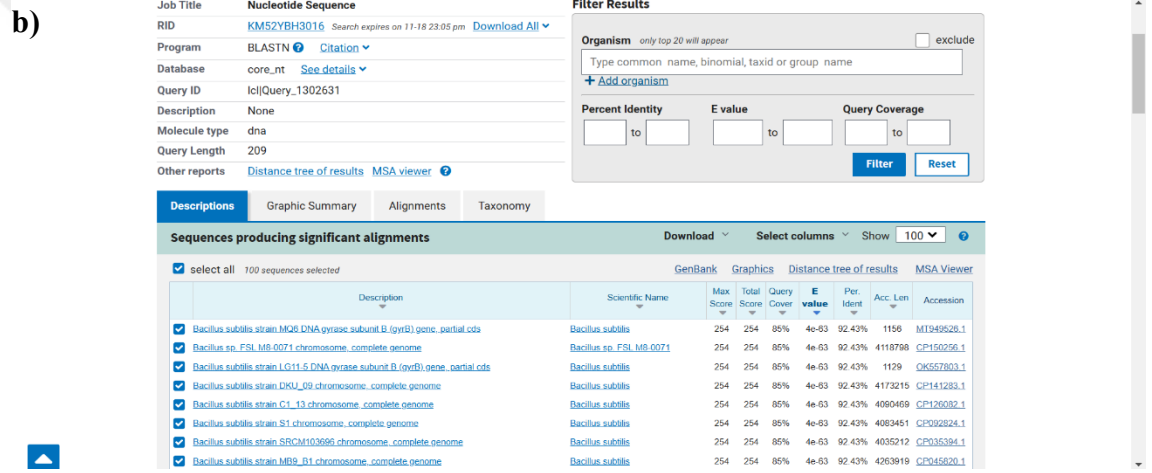
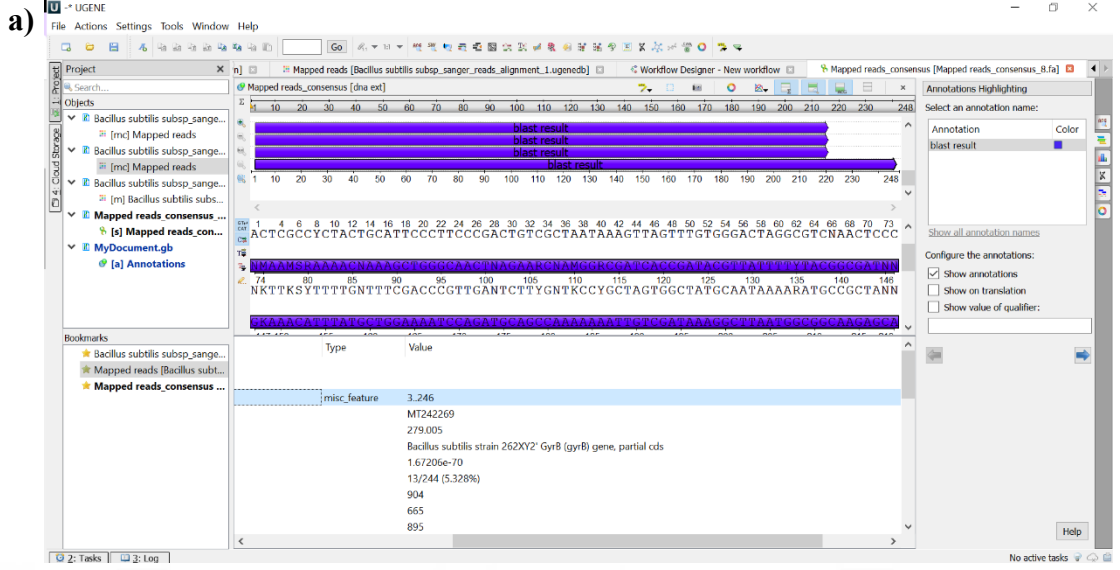
```

Şekil 4.14 GgyrB-f/r1 primer seti ile *G. stearothermophilus* ATCC 12980'e ait genomik DNA ile yapılan reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürününün Sanger dizileme sonucunda elde edilen kromotogram verilerinin c) CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) ile yapılan toplu dizi hizalaması sonucu (devam)

c)

<i>A. pushchinoensis</i>	TGTCGGCTTTGCTTTTGACATGCTGACCGGTATGACCAATAAAGAGCGAATCGACTCTAA	120
<i>A. gonensis</i>	TGTCGGCTTTGCTTTTGACATGCTGACCGGTATGACCGAACAAGAGAAATGGATTCTAA	120
<i>A. salavatliensis</i> hs. <i>A. gonensis</i>	TGTCGGCTTTGCTTTTGACATGCTGACCGGTATGACCGAACAAGAGAAATGGATTCTAA	120
<i>A. suryakundensis</i>	TGTCGGCTTTGCTTTTGACATGCTGACCGGTATGACCGAACAAGAGAAATGGATTCTAA	120
<i>A. karvacharensis</i> hs. <i>A. kestanbolensis</i>	TGTCGGCTTTGCTTTTGACATGCTGACCGGTATGACCGAACAAGAGAAATGGATTCTAA	120
<i>A. kestanbolensis</i>	TGTCGGCTTTGCTTTTGACATGCTGACCGGTATGACCGAACAAGAGAAATGGATTCTAA	119
<i>A. mongoliensis</i>	TGTCGGCTTTGCTTTTGACATGCTGACCGGTATGACCGAACAAGAGAAATGGATTCTAA	120
<i>A. amylolyticus</i>	CGTCGGCTTTGCTTTTGACATGCTGACCGGTATGACCGAACAAGAGAAATGGATTCTAA	120
<i>A. voinovskienae</i>	CGTCGGCTTTGCTTTTGACATGCTGACCGGTATGACCGAACAAGAGAAATGGATTCTAA	119
<i>P. vitaminophilus</i>	TGTCGGCTTTGCTTTTGACATGCTGACCGGTATGACCGAACAAGAGAAATGGATTCTAA	120
<i>A. rupiense</i>	GGTTGGTTTGGCTTTTGACATGCTGACCGGTATGACCGAACAAGAGAAATGGATTCTAA	119
<i>T. caldiproteolyticus</i>	CGTAGGTTTGGCTTTTGACATGCTGACCGGTATGACCGAACAAGAGAAATGGATTCTAA	120
<i>Aspo0A fr/2</i>	-----TTGGCTTTTGGATATGCTGACCGGTATGACCGAACAAGAGAAATGGATTCTAA	54
	A *** ** ** ** **	
<i>A. pushchinoensis</i>	ATTCCGCGGACTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	180
<i>A. gonensis</i>	GTTTCGCGGCTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	180
<i>A. salavatliensis</i> hs. <i>A. gonensis</i>	GTTTCGCGGCTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	180
<i>A. suryakundensis</i>	ATTACCGGACTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	180
<i>A. karvacharensis</i> hs. <i>A. kestanbolensis</i>	ATTACCGGACTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	180
<i>A. kestanbolensis</i>	ATTACCGGACTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	179
<i>A. mongoliensis</i>	ATTCCGCGGACTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	180
<i>A. amylolyticus</i>	GTTCCGCGGACTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	180
<i>A. voinovskienae</i>	GTTCCGCGGCTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	179
<i>P. vitaminophilus</i>	GTTCCGCGGCTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	180
<i>A. rupiense</i>	GTTACCGGCTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	179
<i>T. caldiproteolyticus</i>	GTTGCTCGGCTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	180
<i>Aspo0A fr/2</i>	GTTGCTCGGCTCCATGCGACTTCAATGCGATGACGAATCGCTCGCTCTACGCGACTAGC	114
	** ** ** ** **	
<i>A. pushchinoensis</i>	TGTTGTTTATATTTTTTGCAATATCTGGATAAAGACTCTTGTAATCGATCGAGCAA	240
<i>A. gonensis</i>	GGTCGTATTATATTTTTTGCAATATCTGGATAAAGAACTTTGTAATCGATCGAGCAA	240
<i>A. salavatliensis</i> hs. <i>A. gonensis</i>	TGTCGTATTATATTTTTTGCAATATCTGGATAAAGAACTTTGTAATCGATCGAGCAA	240
<i>A. suryakundensis</i>	TGTCGTATTATATTTTTTGCGGATATCTGGGTATAGCACTTGTAATCGATCGAGCAA	240
<i>A. karvacharensis</i> hs. <i>A. kestanbolensis</i>	TGTCGTATTATATTTTTTGCAATATCTGGGTAAAGCACTTTGTAATCGATCGAGCAA	240
<i>A. kestanbolensis</i>	TGTCGTATTATATTTTTTGCAATATCTGGGTAAAGCACTTTGTAATCGATCGAGCAA	239
<i>A. mongoliensis</i>	TGTCGTATTATATTTTTTGCGATATCTGGATAAAGCACTTGTAATCGATCGAGCAA	240
<i>A. amylolyticus</i>	GGTCGTATTATATTTTTTGCGATATCTGGATAAAGCACTTTGTAATCGATCGAGCAA	240
<i>A. voinovskienae</i>	GGTCGTATTATATTTTTTGCAATATCTGGGTATAGCACTTGTAATCGATCGAGCAA	239
<i>P. vitaminophilus</i>	AGTTGTATTATATTTTTTGCGATATCTGGATAAAGCACTTTGTAATCGATCGAGCAA	240
<i>A. rupiense</i>	GGTTGTATTATATTTTTTGCAATATCTGGATAAAGCACTTTGTAATCGATCGAGCAA	239
<i>T. caldiproteolyticus</i>	GGTGGTATTATATTTTTTGCGGATGCTGGATAGAGGACTTTGTAATCGATCGAGCAA	240
<i>Aspo0A fr/2</i>	GGTGGTATTATATTTTTTGCGGATGCTGGATAGAGGACTTTGTAATCGATCGAGCAA	174
	** ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** ** * ** **	
<i>A. pushchinoensis</i>	TTCCAGCTGTTATACACCATAGCAATCGCTTCAAGCAATATAAATACCTTTAATATG	300
<i>A. gonensis</i>	CTCGACGTGTTATACACCATAGCAATCGCTTCAAGCAATATAAATATCCTTTAATATG	300
<i>A. salavatliensis</i> hs. <i>A. gonensis</i>	CTCGACGTGTTATACACCATAGCAATCGCTTCAAGCAATATAAATATCCTTTAATATG	300
<i>A. suryakundensis</i>	CTCGACGTGTTATACACCATAGCAATCGCTTCAAGCAATATAAATATCCTTTAATATG	300
<i>A. karvacharensis</i> hs. <i>A. kestanbolensis</i>	TTCCAGCTGTTATACACCATAGCAATCGCTTCAAGCAATATAAATATCCTTTAATATG	300
<i>A. kestanbolensis</i>	TTCCAGCTGTTATACACCATAGCAATCGCTTCAAGCAATATAAATATCCTTTAATATG	299
<i>A. mongoliensis</i>	CTCGACGTGTTATACACCATAGCAATCGCTTCAAGCAATATAAATATCCTTTAATATG	300
<i>A. amylolyticus</i>	CTCAATGCTGTTATACACCATAGCAATCGCTTCAAGCAATATAAATAGCCTTTAATATG	300
<i>A. voinovskienae</i>	TTCAATGCTGTTATACACCATAGCAATCGCTTCAAGCAATATAAATAGCCTTTAATATG	299
<i>P. vitaminophilus</i>	TTCGATGCTGTTATACACCATAGCAATCGCTTCAAGCAATATAAATACCTTTAATATG	300
<i>A. rupiense</i>	TTCGATATCATTATACACCATAGCAATCGCTTCAAGCAATATAAATATCCTTTAATATG	299
<i>T. caldiproteolyticus</i>	CTCAATATGTTATACACCATAGCAATAGCCTTCAAGCAATATAAATATCCTTTAATATG	300
<i>Aspo0A fr/2</i>	CTCAATATGTTATACACCATAGCAATAGCCTTCAAGCAATATAAATATCCTTTAATATG	234
	** * ** ** ** **	
<i>A. pushchinoensis</i>	TGCAGGAACACCGATTTCGTGAATGATGTTTGAATGCTGCGATCTAAGTTTTTCGGTTT	360
<i>A. gonensis</i>	GGCTGGGACACCAATTTTCGTGAATGATGTTTGAATGCTGCGATCTAAGTTTTTCGGTTT	360
<i>A. salavatliensis</i> hs. <i>A. gonensis</i>	GGCTGGGACACCAATTTTCGTGAATGATGTTTGAATGCTGCGATCTAAGTTTTTCGGTTT	360
<i>A. suryakundensis</i>	TGCAGGAACACCGATTTCGTGAATGATGTTTGAATGCTGCGATCTAAGTTTTTCGGTTT	360
<i>A. karvacharensis</i> hs. <i>A. kestanbolensis</i>	TGCAGGAACACCAATTTTCGTGAATGATGTTTGAATGCTGCGATCTAAGTTTTTCGGTTT	360
<i>A. kestanbolensis</i>	TGCAGGAACACCAATTTTCGTGAATGATGTTTGAATGCTGCGATCTAAGTTTTTCGGTTT	359
<i>A. mongoliensis</i>	TGCAGGAACACCGATTTCGTGAATGATGTTTGAATGCTGCGATCTAAGTTTTTCGGTTT	360
<i>A. amylolyticus</i>	CGCAGGACACCGGATTTCATGAATGATGCTGTAATGCTTGCGTCTAAGTTTTTCGGTTT	360
<i>A. voinovskienae</i>	CGCTGGGACACCAATTTTCGTGAATGATGCTGTAATGCTTGCGTCTAAGTTTTTCGGTTT	359
<i>P. vitaminophilus</i>	TGCCGGGACACCGATTTCATGAATGATGCTGTAATGCTTGCGATCTAAGTTTTTCGGTTT	360
<i>A. rupiense</i>	AGCCGGTACACCGATTTCATGAATGATGCTGTAATGCTTGCGATCTAAGTTTTTCGGTTT	359
<i>T. caldiproteolyticus</i>	TGCCGGTACACCAATTTTCGTGAATGATGCTGTAATGCTTGCGATCTAAGTTTTTCGGTTT	360
<i>Aspo0A fr/2</i>	TGCCGGTACACCAATTTTCATGAATGATGCTGTAATGCTTGCGATCTAAGTTTTTCGGTTT	267
	** ** ** ** * ** ** * **	

Şekil 4.15 Aspo0A-fr/2 primer seti ile *A. caldiproteolyticus* (*Thermaerobacillus caldoproteolyticus*) DSM 15730'a ait genomik DNA ile yapılan reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürününün Sanger dizileme sonucunda elde edilen kromotogram verilerinin c) CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) ile yapılan toplu dizi hizalaması sonucu (devam)



Şekil 4.16 BgyrB-f/r1 primer seti ile *B. subtilis* DSM 1971'a ait genomik DNA ile yapılan reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürününün Sanger dizileme sonucunda elde edilen kromotogram verilerinin a) UGENE Unipro (Okonechnikov vd. 2012) programı ile düzenlenmesi ve blastxn sonucunun ekran görüntüsü b) web tarayıcısı ile NCBI veritabanında yapılan blastxn sonucu

c)

<i>B. pumilus</i>	GCTCGTAAAAATGGCGTATTCAAAGATGGAGACTCGAATTTGAGCGGTGAAGATGTGCGA	960
<i>B. aerophilus</i>	GCTCGTAAAAATGGCGTATTCAAAGATGGAGACTCGAATTTGAGCGGTGAAGATGTACGA	960
<i>B. invictae</i>	GCTCGTAAAAATGGCGTATTCAAAGATGGAGACTCGAATTTGAGCGGTGAAGATGTACGA	960
<i>BgyrB-f/r1</i>	-----TGAGCGGAGATGACGTAAAGG	20
<i>B. licheniformis</i>	GCGAGAAGAAACGGCGTATTCAAAGAAAGCGATCCGAACCTTAAGCGGGAAGACGTCCGG	957
<i>B. sonorensis</i>	GCGAGAAGAAACGGCGTATTCAAAGAAAGCGATCCGAATTTAAGCGGGAAGATGTCCGG	957
<i>B. amyloliquefaciens</i>	GCAAGAAGAAAGGGGATTTTCAAAGAAATGATCCGAATCTGAGCGGTGATGATGTGAGA	960
<i>B. subtilis</i>	GCCAGAAAAAGGGCTTATTAAAGAAATGATCCAAACCTTAAGCGGAGATGACGTAAAGG	960
	* * * * *	
<i>B. pumilus</i>	GAGGCTTTAACAGCCATTATCTCCATCAAAATCCAGATCCTCAATTCGAAGGACAAACG	1020
<i>B. aerophilus</i>	GAGGCTTTAACAGCCATTATCTCTATCAAAATCCAGACCCCTCAATTCGAAGGACAAACG	1020
<i>B. invictae</i>	GAGGCTTTGACAGCCATTATCTCTATCAAAATCCAGACCCCTCAATTCGAAGGACAAACG	1020
<i>BgyrB-f/r1</i>	GAGGCTTTGACAGCGATTATTTCAATCAAAACCCCTGATCCGAGNITGAGGGNMAAMSR	80
<i>B. licheniformis</i>	GAGGCTTTGACAGCGATTATTTCAATCAAGCAACCCGATCCCTCAATTTGAAGGGCAGAGC	1017
<i>B. sonorensis</i>	GAGGCTTTGACAGCGATTATTTCAATCAAGCAACCCGATCCGATCCCTCAATTTGAAGGGCAGAGC	1017
<i>B. amyloliquefaciens</i>	GAGGCTTTGACTGCCATCATTTCAATTAAGCAACCCCTGATCCGCAATTCGAAGGGCAGAGC	1020
<i>B. subtilis</i>	GAGGCTTTGACAGCGATTATTTCAATCAAAACCCCTGATCCGCAATTTGAAGGGCAGAGC	1020
	** * * * * * * * * * *	
<i>B. pumilus</i>	AAGACAAAGCTCG-GTAACTCAGAA-GCAAGAACCATTAACGACTCCCTTTCTCTGA--	1076
<i>B. aerophilus</i>	AAGACAAAGCTCG-GTAACTCAGAA-GCAAGAACCATTAACGACTCCCTTTCTCTCGA--	1076
<i>B. invictae</i>	AAGACAAAGCTCG-GTAACTCAGAA-GCAAGAACCATTAACGACTCCCTTTCTCTCGA--	1076
<i>BgyrB-f/r1</i>	AAAACTAAAGCTGGGCAACTNAGAARNAMGRCGATACCGATACGTTATTTTACGG	140
<i>B. licheniformis</i>	AAAACTAAAGCTCG-GCAACTCAGAA-GCGCGTACGATACAGATGCGCTATTTTTCAGA--	1073
<i>B. sonorensis</i>	AAAACTAAAGCTCG-GCAACTCAGAA-GCGCGTACGATACAGATGCTCTATTTTTCAGA--	1073
<i>B. amyloliquefaciens</i>	AAAACTAAAGCTCG-GCAACTCAGAA-GCGGAGACGATTACTGATACGCTGTTTCTTC--	1076
<i>B. subtilis</i>	AAAACTAAAGCTGG-GCAACTCAGAA-GCACGGACGATACCGATACGTTATTTTCTAC--	1076
	** * * * * * * * * * *	
<i>B. pumilus</i>	AGCATTGAGAAATTCCTCTTAGAGAACCCCTGATGCTGCAAGAAAAATTTGTGGAGAAAGG	1136
<i>B. aerophilus</i>	AGCATTGAGAAATTCCTCTTAGAGAACCCCTGATGCTGCAAGAAAAATTTGTGGAGAAAGG	1136
<i>B. invictae</i>	AGCATTGAGAAATTCCTCTTAGAGAACCCCTGATGCTGCAAGAAAAATTTGTGGAGAAAGG	1136
<i>BgyrB-f/r1</i>	CGATNKGAAACATTTATGCTGGAAATCCGATGCGCAAAAAAATTTGCTGATAAGG	200
<i>B. licheniformis</i>	AGCGCTTGAAAAATTTCTGCTAGAAAAACCGGATTCAGCGAAAAAATCGTTGAAAAAGG	1133
<i>B. sonorensis</i>	AGCATTGAAAAATTCCTCTGTTGAAAAACCGGATTCAGCGAAAAAATTTGTTGAAAAAGG	1133
<i>B. amyloliquefaciens</i>	CGCACTGGAACATTTCTCTTGAATAACCGGATTCAGCGCAAAAAAATTCGTTGAAAAAGG	1136
<i>B. subtilis</i>	GGCGATGGAACATTTATGCTGGAAAAATCCAGATGCAAGCAAAAAAATTTGCTGATAAAGG	1136
	* * * * *	
<i>B. pumilus</i>	CGTGATGGCAGCTCGTGCAAGAATGGCTGCCAAAAAGGCAOGTGAGCTGACAAGACGTAA	1196
<i>B. aerophilus</i>	TGTGATGGCAGCTCGTGCAAGAATGGCTGCCAAAAAGGCAOGTGAGCTGACAAGACGTAA	1196
<i>B. invictae</i>	TGTGATGGCAGCTCGTGCAAGAATGGCTGCCAAAAAGGCAOGTGAGCTGACAAGACGTAA	1196
<i>BgyrB-f/r1</i>	CTTAATGGCGCAAGAGCAANNNNNNNGAATGGCGGCAAAAAAGG-----	248
<i>B. licheniformis</i>	GGTTATGGCGCCAGAGCAGCGGATGGCTGCAAGAAAGCAOGCGAATTGACGCGCAGAAA	1193
<i>B. sonorensis</i>	CGTGATGGCAGCAAGAGCAGCGGATGGCGCAAAAAAGCAOGCGAATTGACGCGCAGAAA	1193
<i>B. amyloliquefaciens</i>	CTTAATGGCGCAAGAGCAGCGGATGGCGGCAAAAAAGCGGGGAATTGACCGGCGGTAA	1196
<i>B. subtilis</i>	TTTAATGGCGCAAGAGCAAGAATGGCTGCGAAAAAGCGCGTGAATCAACAGCGCGTAA	1196
	* * * * *	

Şekil 4.16 BgyrB-f/r1 primer seti ile *B. subtilis* DSM 1971'a ait genomik DNA ile yapılan reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürününün Sanger dizileme sonucunda elde edilen kromotogram verilerinin c) CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) ile yapılan toplu dizi hizalaması sonucu (devam)

c)	Streptococcus mutans	CAACCTTATTGTAGTTGCCATCA--TTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGTAA	1176
	Enterococcus faecalis	CAACCTTATTGTAGTTGCCATCA--TTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGTAA	1179
	Ureibacillus thermosphaericus	CAACCTTGTCTTAGTTGCCATCA--TTAAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGTAA	1170
	A. suryakundensis	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1130
	A. mongoliensis	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1147
	A. gonensis	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1157
	A. flavithermus	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1146
	A. syderensis	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1148
	A. kestanbolensis	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1103
	A. kaynarçensis	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1177
	A. kamchatkensis	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1172
	A. thesaurum	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1141
	Aeribacillus pallidus	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1155
	G. thermodenitrificans	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1181
	G. stearothermophilus	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1183
	G. thermoleovorans	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1182
	G. kaustophilus	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1182
	G. vulcani	CAACCTTGACCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTA	1162
	Staphylococcus aureus	CAACCTTAGCTTAGTTGCCATCA--TTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA	1176
	A16SrRNA-f/r1	-----CTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA	47
	B. licheniformis	CAACCTTGATCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA	1168
	B. subtilis	CAACCTTGATCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA	1117
	B. amyloliquefaciens	CAACCTTGATCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA	1187
	Escherichia coli	CAACCTTGATCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA	1187
	Pseudomonas aeruginosa	CAACCTTGATCTTAGTTGCCAGAGTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA	1162
		* * * * *	
	Streptococcus mutans	TAAACCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1236
	Enterococcus faecalis	CAAAACCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1238
	Ureibacillus thermosphaericus	AAATACCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1238
	A. suryakundensis	AAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1190
	A. mongoliensis	AAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1207
	A. gonensis	AAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1217
	A. flavithermus	AAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1206
	A. syderensis	AAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1208
	A. kestanbolensis	AAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1163
	A. kaynarçensis	AAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1237
	A. kamchatkensis	AAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1201
	A. thesaurum	AAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1201
	Aeribacillus pallidus	AAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1215
	G. thermodenitrificans	AAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1241
	G. stearothermophilus	CAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1243
	G. thermoleovorans	CAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1242
	G. kaustophilus	CAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1242
	G. vulcani	CAAGTCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1222
	Staphylococcus aureus	CAAAACCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1236
	A16SrRNA-f/r1	CAAAACCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	107
	B. licheniformis	CAAAACCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1228
	B. subtilis	CAAAACCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1177
	B. amyloliquefaciens	CAAAACCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1205
	Escherichia coli	CAAAACCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1217
	Pseudomonas aeruginosa	CAAAACCGAGGAGGTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA	1222
		** * * * *	
	Streptococcus mutans	CACTGCTACAATGGTGGGATCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1296
	Enterococcus faecalis	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1293
	Ureibacillus thermosphaericus	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1290
	A. suryakundensis	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1280
	A. mongoliensis	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1267
	A. gonensis	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1277
	A. flavithermus	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1266
	A. syderensis	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1268
	A. kestanbolensis	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1223
	A. kaynarçensis	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1297
	A. kamchatkensis	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1292
	A. thesaurum	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1261
	Aeribacillus pallidus	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1275
	G. thermodenitrificans	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1301
	G. stearothermophilus	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1303
	G. thermoleovorans	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1302
	G. kaustophilus	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1302
	G. vulcani	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1282
	Staphylococcus aureus	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1280
	A16SrRNA-f/r1	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	167
	B. licheniformis	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1288
	B. subtilis	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1237
	B. amyloliquefaciens	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1265
	Escherichia coli	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1277
	Pseudomonas aeruginosa	CACTGCTACAATGGGAGTCAACAGAGTTCGAGCCGGTGAACGCAAGCTAATCTCTGA	1282
		* * * * *	

Şekil 4.17 A16SrRNA-f/r1 primer seti ile *B. licheniformis* DSM 13'e ait genomik DNA ile yapılan reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürününün Sanger dizileme sonucunda elde edilen kromotogram verilerinin c) CLUSTAL W (Sievers vd. 2011) ile yapılan toplu dizi hizalaması sonucu (devam)

Örneğin, Şekil 4.14'te GgyrB-f/r1 primer dizisinin çoğalttığı bölge, orijinal olarak 170 bp uzunluğunda olup, yapılan iki yönlü Sanger analiziyle ortaya çıkan dizinin de 170 bp uzunluğunda olduğu görülmüştür. İki farklı arayüz kullanılarak yapılan BLAST sonuçları paralellik göstermekte olup, primerlerin genomik DNA üzerinde doğru bölgeyi çoğalttığı gözlenmiştir. Diğer seçilen primer setleri (Aspo0A-f/r2 ve BgyrB-f/r1) ve internal kontrol primer seti (A16SrRNA-f/r1) ile yapılan Sanger dizi analizleri de aynı şekilde kontrol

edilerek doğrulukları teyit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.14- 4.17 arasında her bir seçilen set için bazı temsilci sonuçlar sunulmuştur.

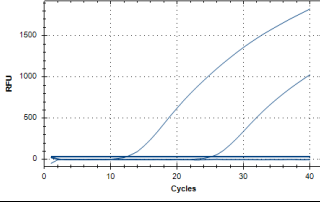
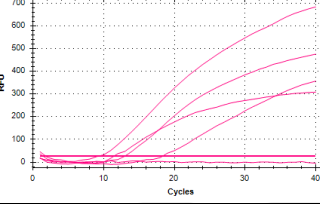
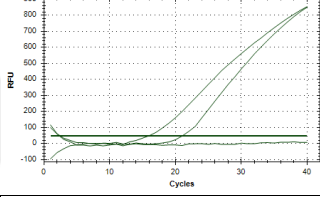
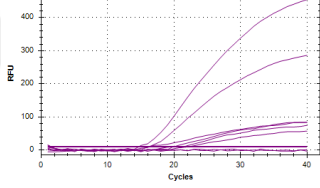
4.6 qRT-PCR Sonuçları

4.6.1 qRT-PCR optimizasyonları ve cinsler arası çaprazlamalar

Bölüm 4.4'te yapılan konvansiyonel PCR sonuçları ışığında, bu aşamada ilk olarak 11 primer/prob adayı içerisinde qRT-PCR ile çalışmak için en uygun primer ve prob setleri yeniden teyit edilmiştir (Çizelge 4.5). Bu setler üzerinde qRT-PCR çalışmalarına geçilmiş olup, sıcaklık gradiyenti, primer ve prob konsantrasyonları, uzama ve bağlanma süreleri qRT-PCR optimizasyonları ile yürütülmüştür. qRT-PCR analizleri BioRad marka CFX96 Touch cihazında yürütülmüş, verilerin düzenlenmesi için cihazın yazılımı olan CFX Maestro programının yanısıra ve Microsoft Office Excel programı da kullanılmıştır.

Yapılan bu optimizasyon süreci sonucunda ideal veri sağlayan primer ve prob setlerinin optimum çalışma koşulları belirlenebilmiştir (Çizelge 4.7). Çalışma dahilinde amaçlanan durum, tasarlanan primer ve prob setlerinin, temsilci olarak belirlenen basiller ile pozitif sonuç vermesi, cinsler arası ve dış grup olarak belirlenen farklı cinsler ile sonuç vermemesidir. Ayrıca internal (iç) kontrol olarak belirlenen primer ve prob setinin, familya ve cinsten bağımsız olarak sahip olduğu (16S rRNA) evrensel özellik sebebiyle, her cins ve tür ile sonuç vermesi hedeflenmiştir. Bu bağlamda, belirlenen primer ve prob setlerinin (Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2, GgyrB-f/r1, P-GgyrB1, BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 ve A16S-f/r1, P-A16S1) cins içi, cinsler arası ve dış grup olarak belirlenen bakterilerin genomik DNA'larıyla, daha önceden belirlenmiş olan optimum koşullarda qRT-PCR düzenekleri kurulmuş olup, elde edilen tüm çaprazlama sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Optimize edilen ve primer/prob setleri ve ideal çalışma koşulları

Primer- Prob Setleri	İdeal Bağlanma Sıcaklığı (Tm, Çalıştığı Sıcaklık aralığı)	Sonuç- Grafik	Sonuç- Ct Değerleri																																																						
Aspo0A- f/r1, P2- Aspo0A1	58°C (54- 60°C)		<table><tr><th>Well</th><th>Fluor</th><th>Target</th><th>Content</th><th>Sample</th><th>Cq</th></tr><tr><td>E03</td><td>FAM</td><td></td><td>Unkn</td><td>DSM 2641</td><td>25.05</td></tr><tr><td>A01</td><td>FAM</td><td></td><td>Unkn</td><td>F81</td><td>12.30</td></tr><tr><td>C05</td><td>FAM</td><td></td><td>Neg Ctrl</td><td></td><td>N/A</td></tr><tr><td>C06</td><td>FAM</td><td></td><td>Neg Ctrl</td><td></td><td>N/A</td></tr></table>	Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	E03	FAM		Unkn	DSM 2641	25.05	A01	FAM		Unkn	F81	12.30	C05	FAM		Neg Ctrl		N/A	C06	FAM		Neg Ctrl		N/A																								
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq																																																				
E03	FAM		Unkn	DSM 2641	25.05																																																				
A01	FAM		Unkn	F81	12.30																																																				
C05	FAM		Neg Ctrl		N/A																																																				
C06	FAM		Neg Ctrl		N/A																																																				
A16S- f/r1, P-A16S1	54°C (52- 60°C)		<table><tr><th>Well</th><th>Fluor</th><th>Content</th><th>Sample</th><th>Cq</th></tr><tr><td>C01</td><td>Cal Red 610</td><td>Unkn</td><td>F81</td><td>11.53</td></tr><tr><td>C02</td><td>Cal Red 610</td><td>Unkn</td><td>F81</td><td>9.46</td></tr><tr><td>C03</td><td>Cal Red 610</td><td>Unkn</td><td>DSM 2641</td><td>13.07</td></tr><tr><td>C04</td><td>Cal Red 610</td><td>Unkn</td><td>DSM 2641</td><td>18.40</td></tr><tr><td>C05</td><td>Cal Red 610</td><td>Neg Ctrl</td><td></td><td>N/A</td></tr></table>	Well	Fluor	Content	Sample	Cq	C01	Cal Red 610	Unkn	F81	11.53	C02	Cal Red 610	Unkn	F81	9.46	C03	Cal Red 610	Unkn	DSM 2641	13.07	C04	Cal Red 610	Unkn	DSM 2641	18.40	C05	Cal Red 610	Neg Ctrl		N/A																								
Well	Fluor	Content	Sample	Cq																																																					
C01	Cal Red 610	Unkn	F81	11.53																																																					
C02	Cal Red 610	Unkn	F81	9.46																																																					
C03	Cal Red 610	Unkn	DSM 2641	13.07																																																					
C04	Cal Red 610	Unkn	DSM 2641	18.40																																																					
C05	Cal Red 610	Neg Ctrl		N/A																																																					
GgyrB- f/r1, P- GgyrB1	58°C (58- 60°C)		<table><tr><th>Well</th><th>Fluor</th><th>Content</th><th>Sample</th><th>Cq</th></tr><tr><td>H02</td><td>HEX</td><td>Unkn</td><td>ATCC 12980</td><td>21.00</td></tr><tr><td>H04</td><td>HEX</td><td>Unkn</td><td>DSM 465</td><td>15.87</td></tr><tr><td>B10</td><td>HEX</td><td>Neg Ctrl</td><td></td><td>N/A</td></tr></table>	Well	Fluor	Content	Sample	Cq	H02	HEX	Unkn	ATCC 12980	21.00	H04	HEX	Unkn	DSM 465	15.87	B10	HEX	Neg Ctrl		N/A																																		
Well	Fluor	Content	Sample	Cq																																																					
H02	HEX	Unkn	ATCC 12980	21.00																																																					
H04	HEX	Unkn	DSM 465	15.87																																																					
B10	HEX	Neg Ctrl		N/A																																																					
BgyrB- f/r1 P- BgyrB1	58°C (56- 60°C)		<table><tr><th>Well</th><th>Fluor</th><th>Target</th><th>Content</th><th>Sample</th><th>Cq</th></tr><tr><td>A01</td><td>Cy5</td><td></td><td>Unkn</td><td>DSM 13</td><td>21.95</td></tr><tr><td>B01</td><td>Cy5</td><td></td><td>Unkn</td><td>DSM 13</td><td>19.41</td></tr><tr><td>C01</td><td>Cy5</td><td></td><td>Unkn</td><td>DSM 1971</td><td>21.35</td></tr><tr><td>D01</td><td>Cy5</td><td></td><td>Unkn</td><td>DSM 1971</td><td>15.92</td></tr><tr><td>E01</td><td>Cy5</td><td></td><td>Unkn</td><td>DSM 7</td><td>16.19</td></tr><tr><td>F01</td><td>Cy5</td><td></td><td>Unkn</td><td>DSM 7</td><td>14.61</td></tr><tr><td>G01</td><td>Cy5</td><td></td><td>Neg Ctrl</td><td></td><td>N/A</td></tr><tr><td>H01</td><td>Cy5</td><td></td><td>Neg Ctrl</td><td></td><td>N/A</td></tr></table>	Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	A01	Cy5		Unkn	DSM 13	21.95	B01	Cy5		Unkn	DSM 13	19.41	C01	Cy5		Unkn	DSM 1971	21.35	D01	Cy5		Unkn	DSM 1971	15.92	E01	Cy5		Unkn	DSM 7	16.19	F01	Cy5		Unkn	DSM 7	14.61	G01	Cy5		Neg Ctrl		N/A	H01	Cy5		Neg Ctrl		N/A
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq																																																				
A01	Cy5		Unkn	DSM 13	21.95																																																				
B01	Cy5		Unkn	DSM 13	19.41																																																				
C01	Cy5		Unkn	DSM 1971	21.35																																																				
D01	Cy5		Unkn	DSM 1971	15.92																																																				
E01	Cy5		Unkn	DSM 7	16.19																																																				
F01	Cy5		Unkn	DSM 7	14.61																																																				
G01	Cy5		Neg Ctrl		N/A																																																				
H01	Cy5		Neg Ctrl		N/A																																																				

(*Sample kodları= **A16S-f/r1, P-A16S1** ve **Aspo0A-f/r1, P2-Aspo0A1** seti, F81: “*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*” hs. *A. ayderensis*, DSM 2641: *A. flavithermus*, DSM 465; **GgyrB-f/r1, P-GgyrB1** seti, *G. thermodenitrificans*, ATCC 12980: *G. stearothermophilus*; **BgyrB-f/r1 P-BgyrB1** seti, DSM 13: *B. licheniformis*, DSM 1971: *B. subtilis*, DSM 7: *B. amyloliquefaciens*.)

Belirlenen primer ve prob setleri, qRT-PCR reaksiyonlarıyla kendi grubu içerisinde ve kendi grubu dışında yer alan pozitif ve negatif kontrol bakterileriyle çaprazlanmıştır. Çizelge 4.8’de sunulan bakteri cins ve tür isimleri güncel literatüre uygun olacak şekilde isimlendirilerek 2025 yılı itibariyle güncel taksonomik pozisyonlarında sunulmuştur. Böylece, konvansiyonel PCR çalışmaları sonrası, belirlenen cinse özgül olarak bağlandığı gösterilen primerlerin, sonrasında problemlerle eşleştirilerek tekli qRT-PCR reaksiyonlarıyla grup spesifiteleri yeniden kontrol edilmiş, seçilen her bir set için kendi gruplandırmaları dışında yer alan farklı bir cinse bağlanmayanlar tekrar teyit edilmiş, nihai olarak gene özgü tasarlanan primer ve prob seti seçimi gerçekleştirilebilmiştir. Bu sonuçlara göre; *Anoxybacillus* cinsi için tasarlanan Aspo0A-f/r2/P2-Aspo0A2 primer/prob çiftinin güncel

taksonomik değişikliklere göre 3 farklı cinse bölünen *Anoxybacillus*, *Anoxybacteriodes* ve *Thermoaerobacillus* cinslerine, *Geobacillus* cinsi için tasarlanan GgyrB-f/r1/P-GgyrB1 çiftinin ikiye ayrılan *Geobacillus* ve *Parageobacillus* üyelerine ve *Bacillus* cinsi için tasarlanan BgyrB-f/r1/P-BgyrB1 çiftinin ise sadece *Bacillus* cinsi türlere bağlandıkları ancak kendi cinsleri dışındaki üyelere (*Halalkalibacterium* ve *Shouchella* üyeleri beklendiği üzere negatif qRT-PCR sonucu alınmıştır) qRT-PCR reaksiyonları oluşturmadıkları görölmüştür. Tüm bu türlerden sadece Aspo0A-f/r2/P2-Aspo0A2 primer/prob çifti, hedeflenen *Anoxybacillus ayderensis* türüyle konvansiyonel PCR reaksiyonunda ampikon vermişken, qRT-PCR’da pozitif reaksiyon vermemiştir. Bu durum primer/prob tasarımı aşamasında kullanılan ve NCBI veri tabanından alınan *A. ayderensis* genom dizisi ile ilişkilendirilmiştir.

Çizelge 4.8 Seçilen 4 primer ve prob setiyle yapılan cins içi ve cinsler arası qRT-PCR çaprazlama sonuçları

	Aspo0A-f/r2 P2-Aspo0A2	A16S-f/r1 P-A16S1	GgyrB-f/r1 P-GgyrB1	BgyrB-f/r1 P-BgyrB1
Primer- prob konsantrasyonu	Önerildiği şekliyle	Önerildiği şekliyle	Primer 1/8, prob 1/2	Önerildiği şekliyle
Optimum bağlanma sıcaklığı (Bağlanma sıcaklık aralığı)	58°C (56- 58°C)	58°C (52- 60°C)	58°C (58- 60°C)	58°C (56- 60°C)
Anoxybacillaceae familyası				
Anoxybacillus cinsi üyeler				
<i>A. suryakundensis</i> DSM 27374	+	+	-	-
<i>A. mongoliensis</i> DSM 19169	+	+	-	-
" <i>A. kamchatkensis</i> DSM 14988" hs <i>A. ayderensis</i>	+	+	-	-
<i>A. gonensis</i> NCIMB 13933	+	+	-	-
<i>A. kestanbolensis</i> NCIMB 13971	+	+	-	-
<i>A. ayderensis</i> NCIMB 13972	-	+	-	-
<i>A. kaynarcensis</i> DSM 21706	+	+	-	-
<i>A. thermarum</i> DSM 17141	+	+	-	-
" <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>asaccharedens</i> " F81 hs <i>A. ayderensis</i>	+	+	-	-
<i>A. flavithermus</i> DSM 2641	+	+	-	-
Anoxybacteroides cinsi üyeler				
<i>A. tepidamans</i> DSM 16325	+	+	-	-
<i>A. voinovskiensis</i> DSM 17075	+	+	-	-
<i>A. amylolyticus</i> DSM 15939	+	+	-	-
<i>A. rupiensis</i> DSM 17127	+	+	-	-
Thermoeribacillus cinsi üye				
<i>T. caldiproteolyticus</i> DSM 15730	+	+	-	-
Geobacillus cinsi üyeler				
<i>G. kaustophilus</i> DSM 7263	-	+	+	-
<i>G. vulcanii</i> DSM 13174	-	+	+	-
<i>G. thermoleovorans</i> DSM 5366	-	+	+	-
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465	-	+	+	-
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980	-	+	+	-
Parageobacillus cinsi üyeler				
<i>P. toebii</i> DSM 14590	-	+	+	-
<i>P. thermoglucosidasius</i> , DSM 2542	-	+	+	-
Bacillaceae familyası				
Bacillus cinsi üyeler				
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	+	-	+
<i>B. subtilis</i> DSM 1971	-	+	-	+
<i>B. licheniformis</i> DSM 13	-	+	-	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7	-	+	-	+
Halalkalibacterium cinsi üye				
<i>H. halodurans</i> DSM 497	-	+	-	-
Shouchella cinsi üye				
<i>Shouchella clausii</i> (<i>Enterogermina</i>)	-	+	-	-
Dış gruplar				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	+	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	-	+	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 26555	-	+	-	-
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i> DSM 10633	-	+	-	-
<i>Aeribacillus pallidus</i> DSM 3670	-	+	-	-

(+): pozitif sonuç verenler, -: negatif sonuç verenler, **hs**: heterotipik sinonim, **kırmızı** işaretli türler: 7 temsilci türü ifade etmektedir)

4.6.2 Optimize edilen primer/prob setleriyle tekli reaksiyonlardaki tespit limitleri (LOD)

Çalışma kapsamında, belirlenen 4 primer ve prob setinin hassasiyet (LOD-Limit of Detection-Tespit Limiti) değerlerini belirlemek amacıyla, belirtilen 7 temsilci türün genomik DNA'ları, 200 ng/μL, 20 ng/μL, 2 ng/μL, 200 pg/μL, 20 pg/μL, 2 pg/μL, 200 fg/μL, 20 fg/μL ve 2 fg/μL (ng=nanogram, pg=picogram, fg=femtogram) konsantrasyonlarda hazırlanmış, qRT-PCR reaksiyonları en az 3 paralel olacak şekilde kurulmuştur. Sonrasında elde edilen Ct (threshold) değerlerinin ortalaması alınmış, kullanılan DNA konsantrasyonunun miktarına karşılık gelecek şekilde kalibrasyon grafiği çizilerek, etkinlik (efficiency-E) ve eğim (slope) değerleri hesaplanmış ve nihayetinde kantitatif analizleri güvenilirlik aralığında $E = [10^{(-1/slope)}] - 1$ denklemiyle Microsoft Office Excel programı üzerinde yapılmıştır. GraphPad Prism (Versiyon 10.4.0) programı kullanılarak regresyon analizleri yapılmıştır. Elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 4.9-4.12 arasında sunulmuştur.

Çizelge 4.9 *A. flavithermus* DSM 2641 ve “*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*” F81 hs. *A. ayderensis* türlerine ait genomik DNA'larının Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 primer/prob seti ile yapılan reaksiyonlarından elde edilen ortalama Ct değerleri ve standart sapma sonuçları

DNA miktarı (ng/ml)	log ₁₀ DNA (ng/ml)	Lineer DNA (ng/ml)	DSM 2641		F81	
			Ortalama Ct	STD DEV	Ortalama Ct	STD DEV
0,000002	2,00E-06	-5,7	-	-	-	-
0,00002	2,00E-05	-4,7	-	-	-	-
0,0002	2,00E-04	-3,7	-	-	-	-
0,002	2,00E-03	-2,7	-	-	-	-
0,02	2,00E-02	-1,7	-	-	-	-
0,2	2,00E-01	-0,7	28,88	0,62	28,47	1,7
2	2,00E+00	0,3	24,61	0,48	24,88	2,47
20	2,00E+01	1,3	20,10	0,45	18,92	0,54
200	2,00E+02	2,3	16,27	0,35	14,86	0,41

*(Sarı işaret: Tespit edilebilen minimum DNA konsantrasyon limitini, STDEV: standart sapmayı ifade etmektedir)

Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 seti ile “*A. kamchatkensis* subsp. *assacharedens*” F81 hs. *A. ayderensis* ve *A. flavithermus* DSM 2641 temsilci türleri için lineer regresyon analizi sonucunda sırasıyla $p < 0,05$ ve $p < 0,001$ güvenilirlik değeri tespit edilerek, sonuçlar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (GraphPad Prism (Versiyon 10.4.0)).

Çizelge 4.10 *A. flavithermus* DSM 2641 ve “*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*” F81 hs. *A. ayderensis* türlerine ait genomik DNA’larının A16S-f/r1, P-A16S1 primer/prob seti ile yapılan reaksiyonlarından elde edilen ortalama Ct değerleri ve standart sapma sonuçları

DNA miktarı (ng/ml)	log ₁₀ DNA (ng/ml)	Lineer DNA (ng/ml)	DSM 2641		F81	
			Ortalama Ct	STD DEV	Ortalama Ct	STD DEV
0,000002	2,00E-06	-5,7	-	-	-	-
0,00002	2,00E-05	-4,7	-	-	-	-
0,0002	2,00E-04	-3,7	39,25	0,0	38,58	0,72
0,002	2,00E-03	-2,7	26,67	0,12	34,78	0,90
0,02	2,00E-02	-1,7	31,20	0,32	31,90	1,43
0,2	2,00E-01	-0,7	25,92	0,46	26,99	0,28
2	2,00E+00	0,3	20,40	0,23	21,11	0,36
20	2,00E+01	1,3	17,04	0,09	15,85	1,02
200	2,00E+02	2,3	12,37	0,24	10,60	0,0

*(Sarı işaret: Tespit edilebilen minimum DNA konsantrasyon limitini, STDEV: standart sapmayı ifade etmektedir)

A16S-f/r1, P-A16S1 seti ile “*A. kamchatkensis* subsp. *assacharedens*” F81 hs. *A. ayderensis* ve *A. flavithermus* DSM 2641 temsilci türler için lineer regresyon analizi sonucu sırasıyla $p < 0,001$ istatistiki olarak anlamlı bulunurken, $p = 0,110$ güvenilirlik değeri istatistiki olarak anlamsız bulunmuştur (GraphPad Prism (Versiyon 10.4.0)).

Çizelge 4.11 *G. thermodenitrificans* DSM 465 ve *G. stearothermophilus* ATCC 43223 türlerine ait genomik DNA’larının GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 primer/prob seti ile yapılan reaksiyonlarından elde edilen ortalama Ct değerleri ve standart sapma sonuçları

DNA miktarı (ng/ml)	log ₁₀ DNA (ng/ml)	Lineer DNA (ng/ml)	DSM 465		ATCC 43223	
			Ortalama Ct	STD DEV	Ortalama Ct	STD DEV
0,000002	2,00E-06	-5,7	-	-	-	-
0,00002	2,00E-05	-4,7	-	-	-	-
0,0002	2,00E-04	-3,7	36,11	0,0	33,21	1,54
0,002	2,00E-03	-2,7	32,43	0,51	30,57	0,78
0,02	2,00E-02	-1,7	30,42	0,27	27,59	0,62
0,2	2,00E-01	-0,7	27,31	0,22	24,19	0,04
2	2,00E+00	0,3	24,79	0,55	21,41	0,16
20	2,00E+01	1,3	20,96	0,99	18,75	0,67
200	2,00E+02	2,3	11,11	0,14	15,66	0,65

*(Sarı işaret: Tespit edilebilen minimum DNA konsantrasyon limitini, STDEV: standart sapmayı ifade etmektedir)

GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 seti ile *G. thermodenitrificans* DSM 465 ve *G. stearothermophilus* ATCC 43223 temsilci türler için lineer regresyon analizi sonucu sırasıyla $p = 0,0834$ istatistiki olarak anlamsız bulunurken, $p < 0,001$ güvenilirlik değeri istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (GraphPad Prism (Versiyon 10.4.0)).

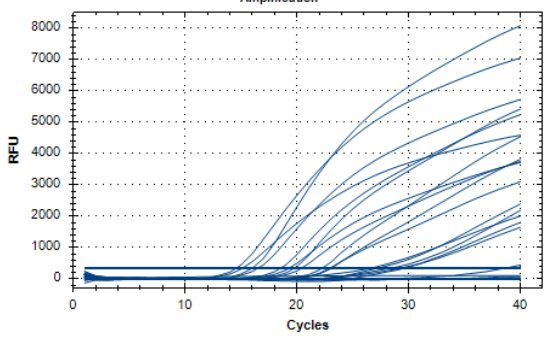
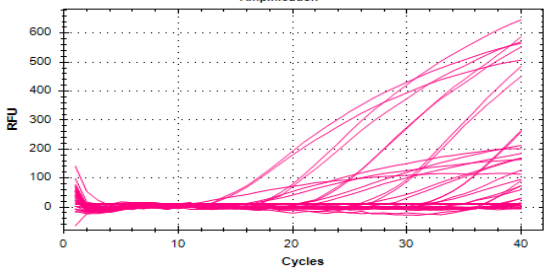
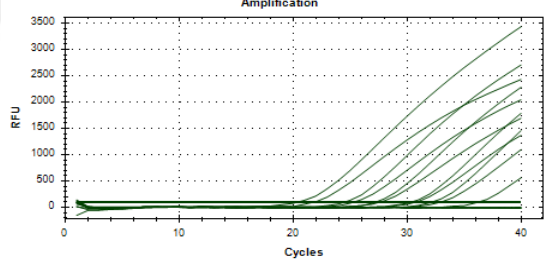
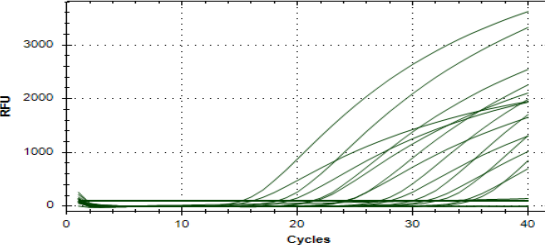
Çizelge 4.12 *B. subtilis* DSM 1971, *B. licheniformis* DSM 13 ve *B. amyloliquefaciens* DSM 7 türlerine ait genomik DNA'larının BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 primer/prob seti ile yapılan reaksiyonlarından elde edilen ortalama Ct değerleri ve standart sapma sonuçları

DNA miktarı (ng/ml)	log ₁₀ DNA (ng/ml)	Lineer DNA (ng/ml)	DSM 1971		DSM 13		DSM 7	
			Ortalama Ct	STDEV	Ortalama Ct	STD DEV	Ortalama Ct	STD DEV
0,000002	2,00E-06	-5,7	-	-	-	-	-	-
0,00002	2,00E-05	-4,7	-	-	-	-	-	-
0,0002	2,00E-04	-3,7	-	-	39,49	0,01	-	-
0,002	2,00E-03	-2,7	39,71	0,0	35,57	0,17	39,20	0,10
0,02	2,00E-02	-1,7	35,16	0,80	31,23	0,17	33,30	0,08
0,2	2,00E-01	-0,7	30,44	1,12	27,43	0,07	29,69	0,32
2	2,00E+00	0,3	27,66	0,15	23,19	0,71	24,82	0,31
20	2,00E+01	1,3	24,47	0,31	19,52	0,12	20,49	0,53
200	2,00E+02	2,3	21,42	0,67	15,19	0,10	16,33	0,29

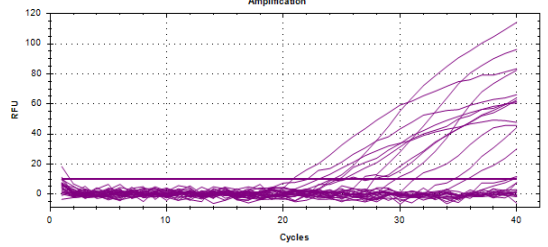
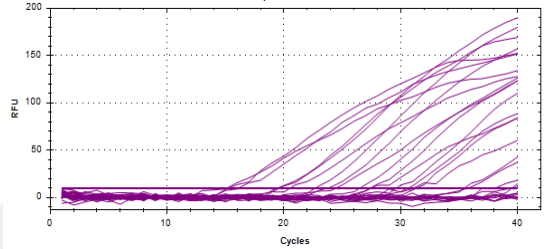
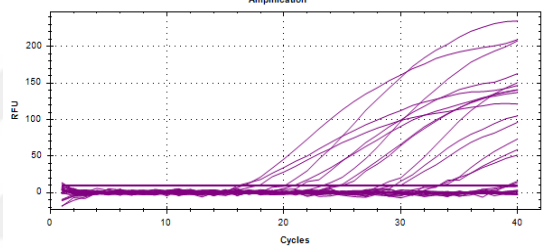
*(Sarı işaret: Tespit edilebilen minimum DNA konsantrasyon limitini, STDEV: standart sapmayı ifade etmektedir)

BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile *B. subtilis* DSM 1971, *B. licheniformis* DSM 13 ve *B. amyloliquefaciens* DSM 7 temsilci türler için lineer regresyon analizi sonucu sırasıyla $p=0,220$ istatistiki olarak anlamsız bulunurken, diğer iki tür için ise $p<0,05$ istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (GraphPad Prism (Versiyon 10.4.0)).

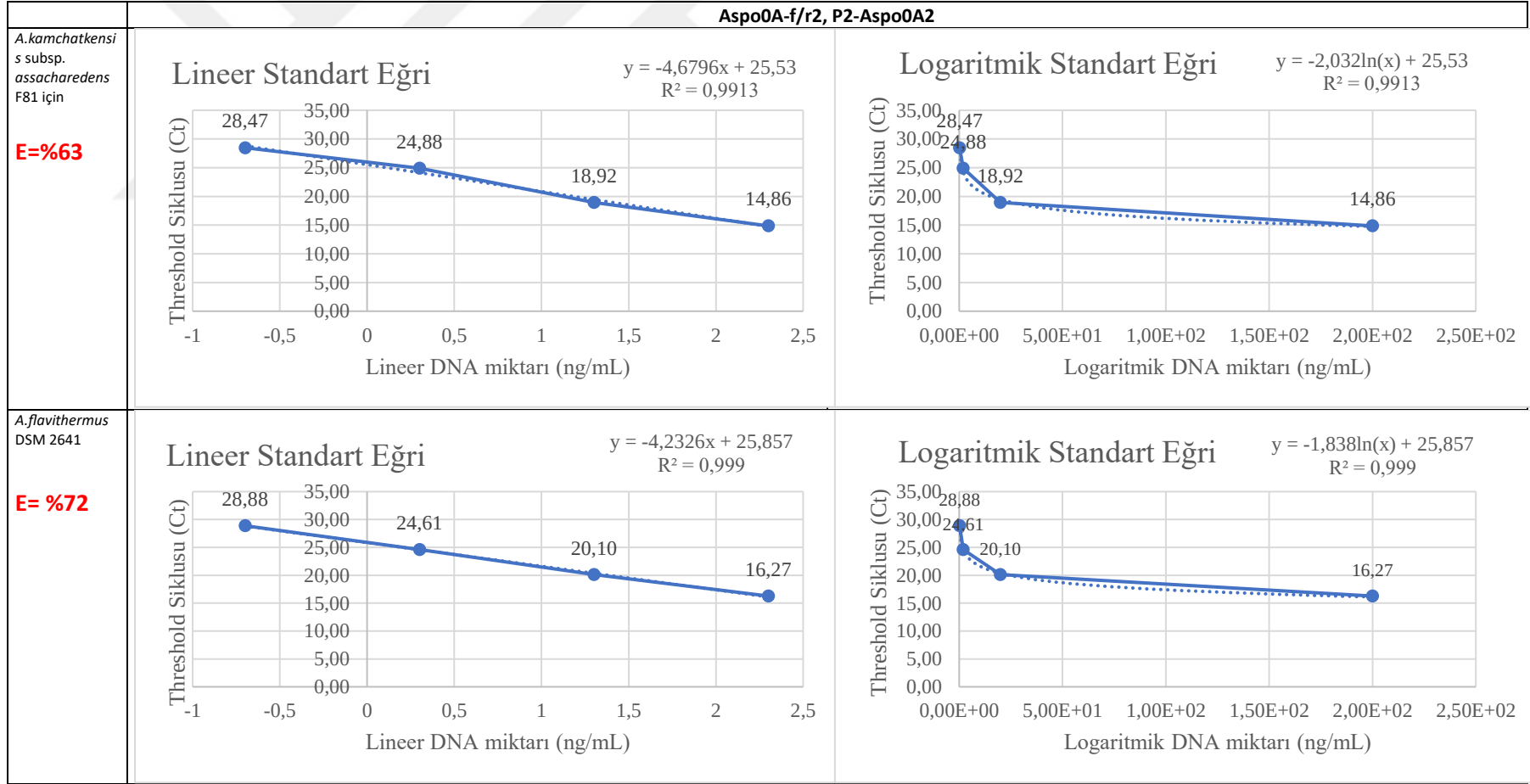
Çizelge 4.13 Tekli reaksiyonların hassasiyet çalışmalarından elde edilen amplifikasyon grafikleri

Primer- Prob Seti	Bakteri ismi	Amplifikasyon Grafiği
Aspo0A- f/r2, P2- Aspo0A2	<i>"A. kamchatkensis</i> subsp. <i>assacharedens</i> " F81 hs. <i>A. ayderensis</i> ve <i>A. flavithermus</i> DSM 2641	
A16S-f/r1, P-A16S1	<i>"A. kamchatkensis</i> subsp. <i>assacharedens</i> " F81 hs. <i>A. ayderensis</i> ve <i>A. flavithermus</i> DSM 2641	
GgyrB-f/r1, P-GgyrB1	<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465	
	<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223	

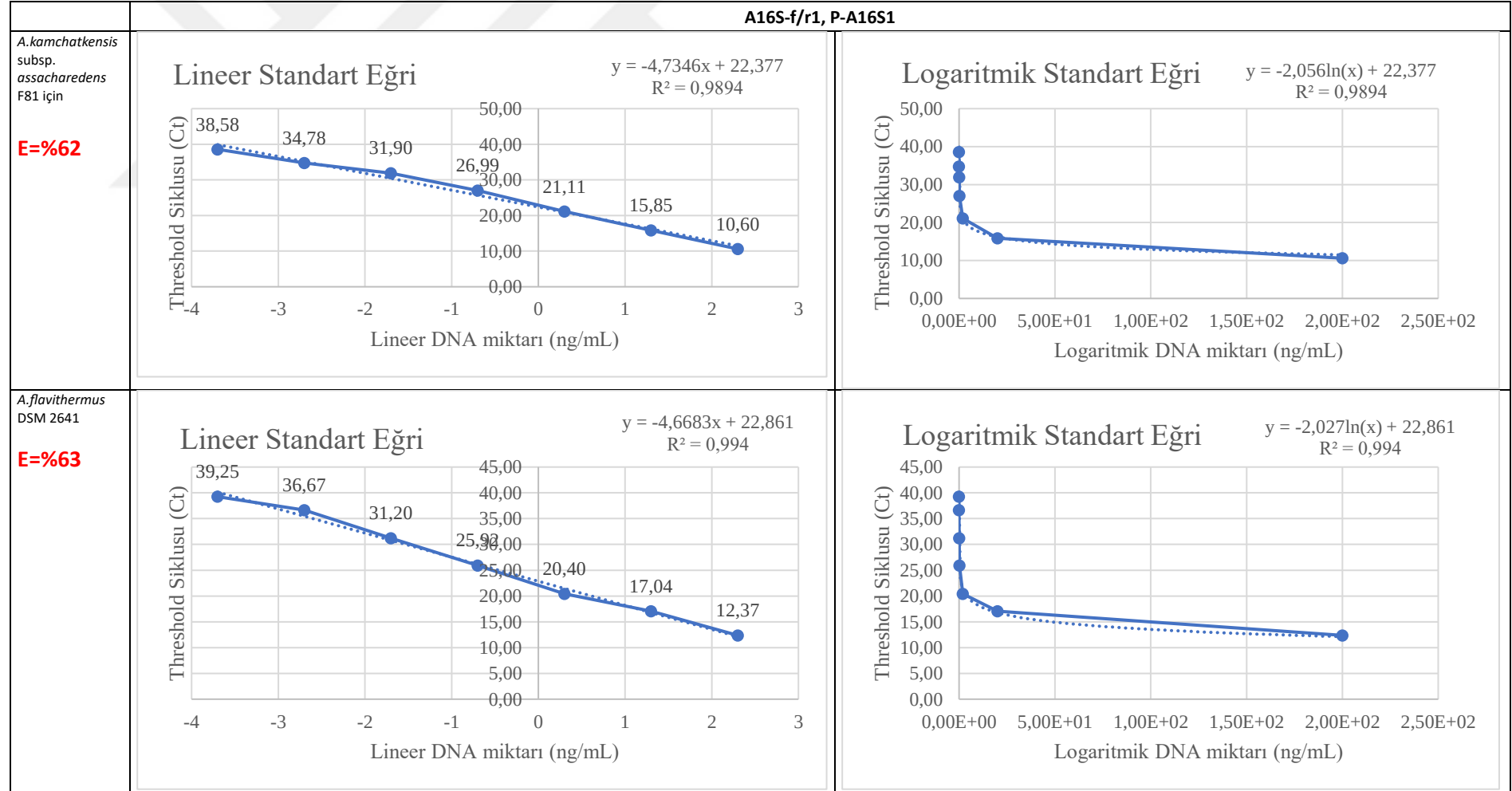
Çizelge 4.13 Tekli reaksiyonların hassasiyet çalışmalarından elde edilen amplifikasyon grafikleri (devam)

Primer- Prob Seti	Bakteri ismi	Amplifikasyon Grafiği
BgyrB-f/r1 P-BgyrB1	<i>B. subtilis</i> DSM 1971	
	<i>B. licheniformis</i> DSM 13	
	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7	

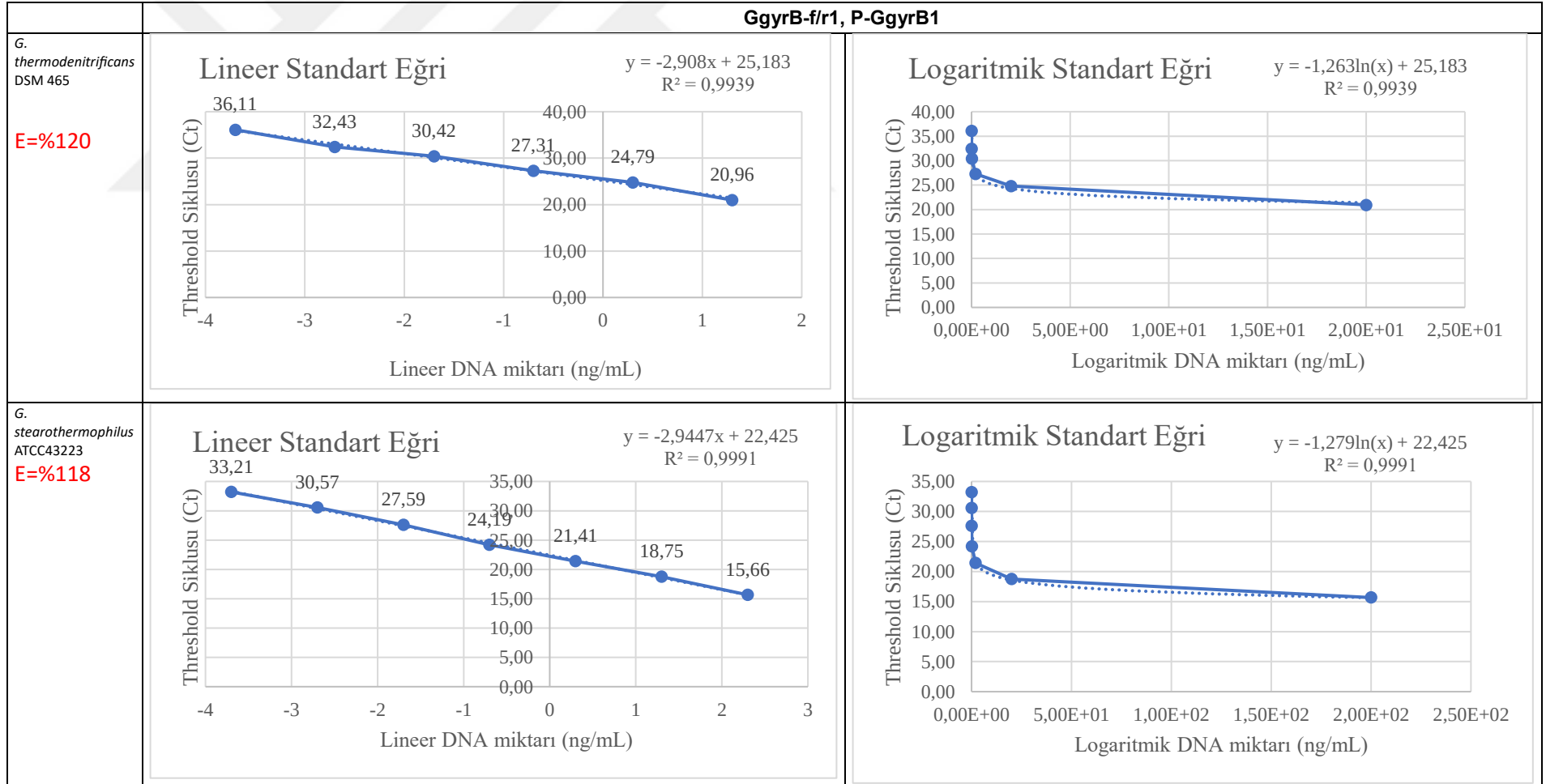
Çizelge 4.14 Tekli reaksiyonların belirlenen primer ve prob setleriyle temsilci türler arasında yürütülen semikantifikasyon grafikleri



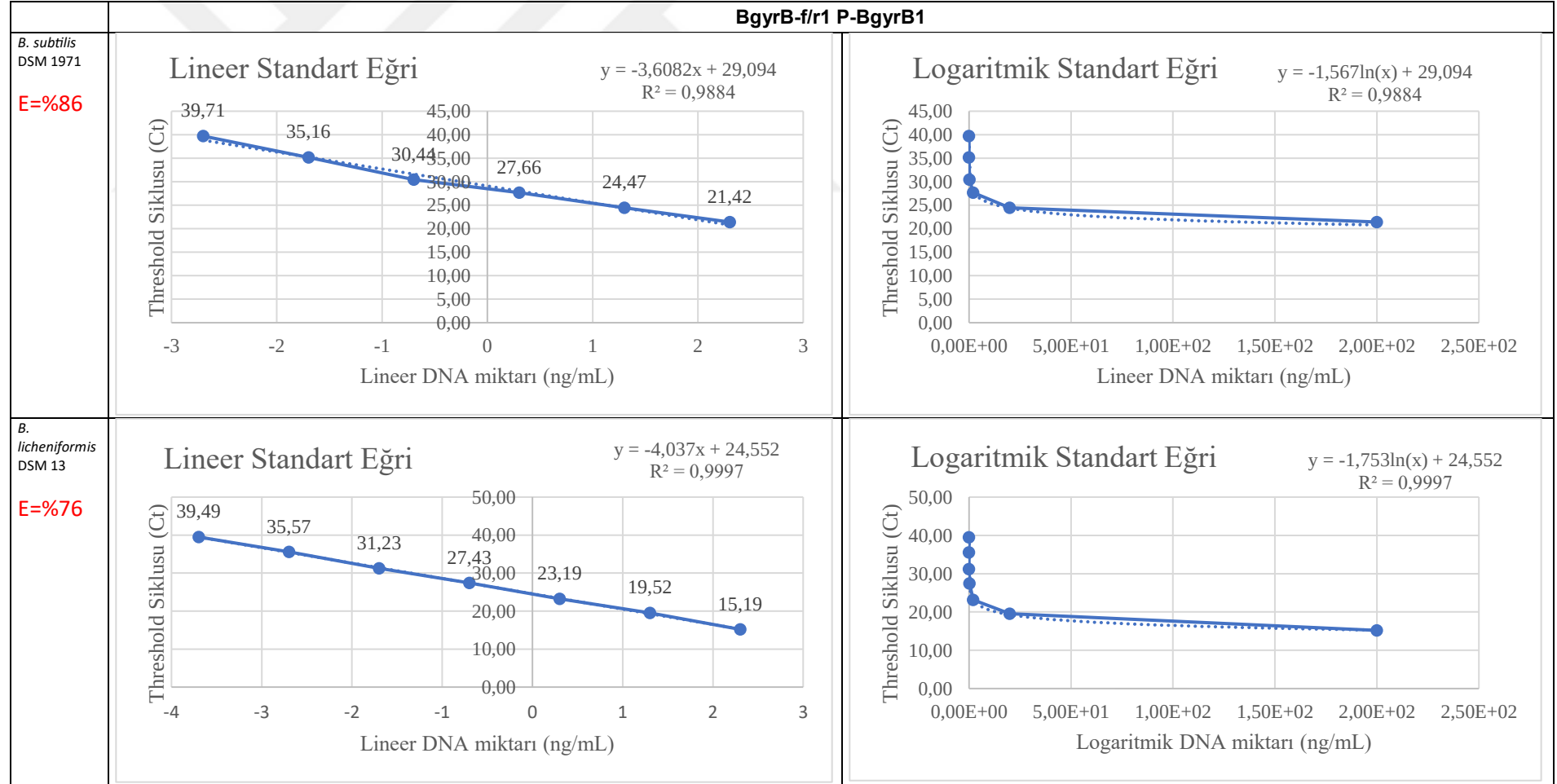
Çizelge 4.14 Tekli reaksiyonların belirlenen primer ve prob setleriyle temsilci türler arasında yürütülen semi kantifikasyon grafikleri (devamı)



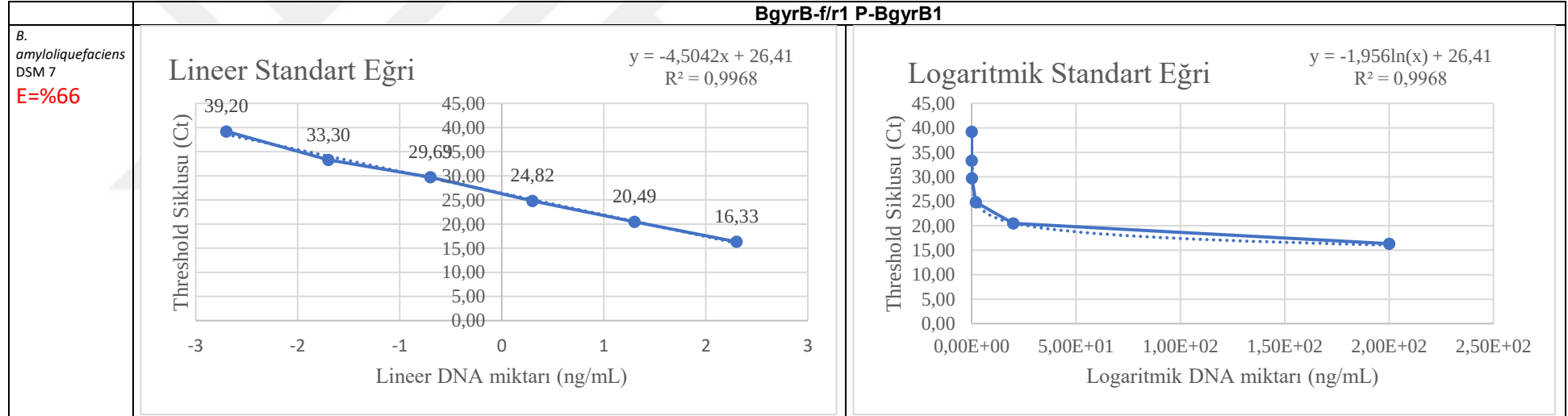
Çizelge 4.14 Tekli reaksiyonların belirlenen primer ve prob setleriyle temsilci türler arasında yürütülen semi kantifikasyon grafikleri (devamı)



Çizelge 4.14 Tekli reaksiyonların belirlenen primer ve prob setleriyle temsilci türler arasında yürütülen semi kantifikasyon grafikleri (devamı)



Çizelge 4.14 Tekli reaksiyonların belirlenen primer ve prob setleriyle temsilci türler arasında yürütülen semi kantifikasyon grafikleri (devamı)



Literatürde kabul gören görüşe göre, grafiklerde slope (eğim) değerinin -3,1 ila -3,6 arasında olması, yüksek bir qRT-PCR etkinliğinin (%90-%110 etkinlik) olduğuna işaret etmektedir. Buna göre lineer grafik denklemlerinde bulunan E ve eğim değerlerinin sırasıyla %62 ile %120 ve -2,9080 ile -4,0370 aralıklarında oldukları görülmüştür (çizelge 4.15). Eğrilerin R^2 değerleri oldukça yüksek olmasına karşın hassasiyetin kabul gören aralıklarının kısmen dışında fakat yakın eğim ve E değerleri tespit edilebilmiştir. Bu durum genellikle tür tespiti için spesifik grafiklerde beklenen aralıklarda hesaplanabilirken, çok sayıda türün tespit edildiği cins spesifik grafiklerde ise tam hedef aralığı yakalanamamaktadır. Bu durum cins spesifik primer/prob tasarımlarında çok sayıda türün teşhisi amacıyla dejenere primer kullanımıyla açıklanabilmektedir (Yu vd. 2005, Lim vd. 2011). Buna karşın, tekli qRT-PCR reaksiyonlarında hedeflenen hassasiyet değerlerine yaklaşılmış ve cins temelli primer/probların her durumda çalışılan cinse ait ilgili türü teşhis edebildiği gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, Asp0A-f/r2, P2-Asp0A2 primer/prob setiyle *Anoxybacillus* türlerinin minimum 0,2 ng/mL konsantrasyondaki DNA'ları (Ct: 28,88-28,67), A16S-f/r1, P-A16S1 primer/prob setiyle *Anoxybacillus* türlerinin en az 0,0002 ng/mL'lık DNA'ları (Ct: 39,25-38,58); BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 primer/prob setiyle *Bacillus* türlerinin minimum 0,002 ng/mL'lık DNA'ları (Ct: 39,71-39,20) ila 0,0002 ng/mL DNA'ları (Ct: 39,49) ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 primer/prob setiyle ise *Geobacillus* türlerinin en az 0,0002 ng/mL DNA'ları (Ct: 36,11-33,21) tespit edilebilmiştir. Ayrıca, aşılardan hücre konsantrasyonu arttıkça klasik kültürel sayımla ters orantılı olarak, izole edilen DNA miktarındaki artışla ters orantılı şekilde, teorik sayım yapılan qRT-PCR'dan elde edilen Ct değerlerinde de düşüş yaşandığı da dikkat çekmektedir (Çizelge 4.9- 4.12).

Çizelge 4.15 Temsilci türlerin 200 ng/μL-2 fg/μL konsantrasyonlardaki genomik DNA'ları ile yürütülmüş tekli qRT-PCR reaksiyonlarının kalibrasyon grafiği denklem verileri

Primer/Prob	Temsilci tür	Lineer Denklem/ Eğim	R ²	E değeri (%)
Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2	" <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>assacharedens</i> " F81 hs. A. <i>ayderensis</i>	y=-4,6796x+25,53	0,9913	63
	<i>A. flavithermus</i> DSM 2641	y=-4,2326x+25,857	0,9990	72
GgyrB-f/r1, P-GgyrB1	<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223	y=-2,9447x+22,425	0,9991	118
	<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465	y=-2,9080x+25,183	0,9939	120
BgyrB-f/r1, P-BgyrB1	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7	y=-4,5042x+26,41	0,9968	66
	<i>B. licheniformis</i> DSM 13	y=-4,0370x+24,552	0,9997	76
	<i>B. subtilis</i> DSM 1971	y=-3,6082x+29,094	0,9884	86
A16S-f/r1, P-A16S1	" <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>assacharedens</i> " F81 hs. A. <i>ayderensis</i>	y=-4,7346x+22,377	0,9894	62
	<i>A. flavithermus</i> DSM 2641	y=-4,6683x+22,861	0,9940	63

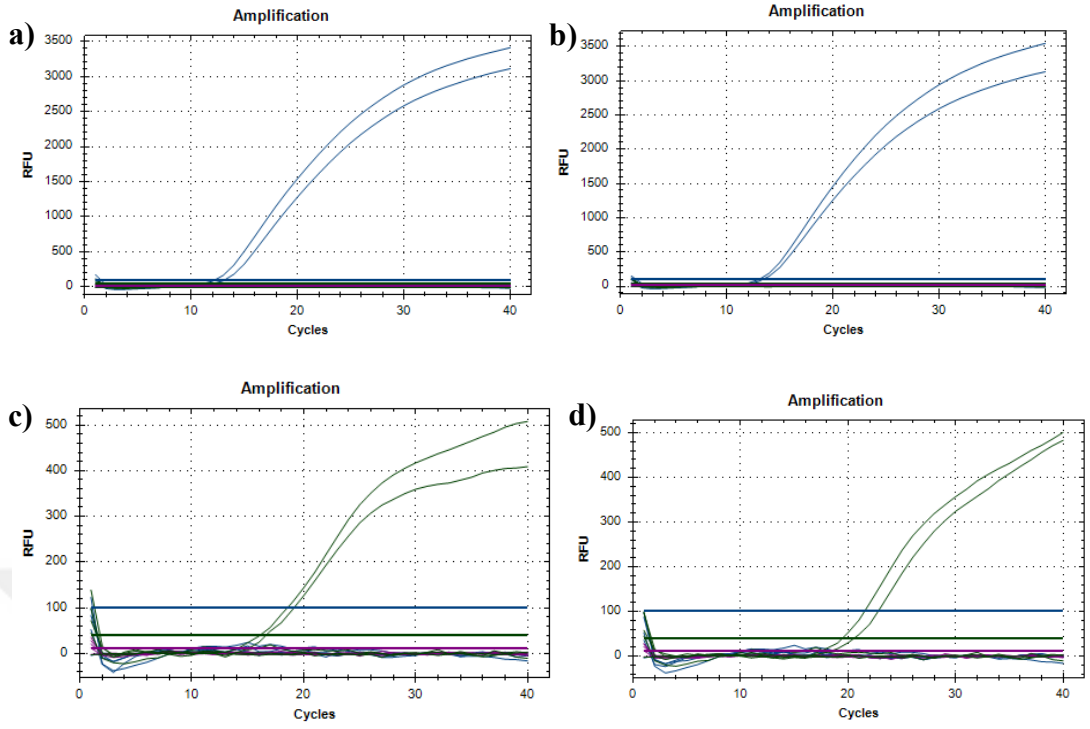
4.6.3 Çoklu reaksiyon çalışmaları ve tespit limitleri

Her cins için belirlenen primer ve prob setlerinin birlikte çalışma koşullarını belirleyemek adına ilk olarak çoklu reaksiyon optimizasyonları yapılmıştır. En uygun çalışma konsantrasyonları ve reaksiyon hacimleri özellikle üç primer ve prob setinin birbiriyle olan ilişkilerine bakılarak belirlenmiş olup, her bir cins için temsilci türler kullanılarak çaprazlamalar yapılmış, ideal konsantrasyon ve bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16 İdeal olarak belirlenen çoklu reaksiyon koşulları

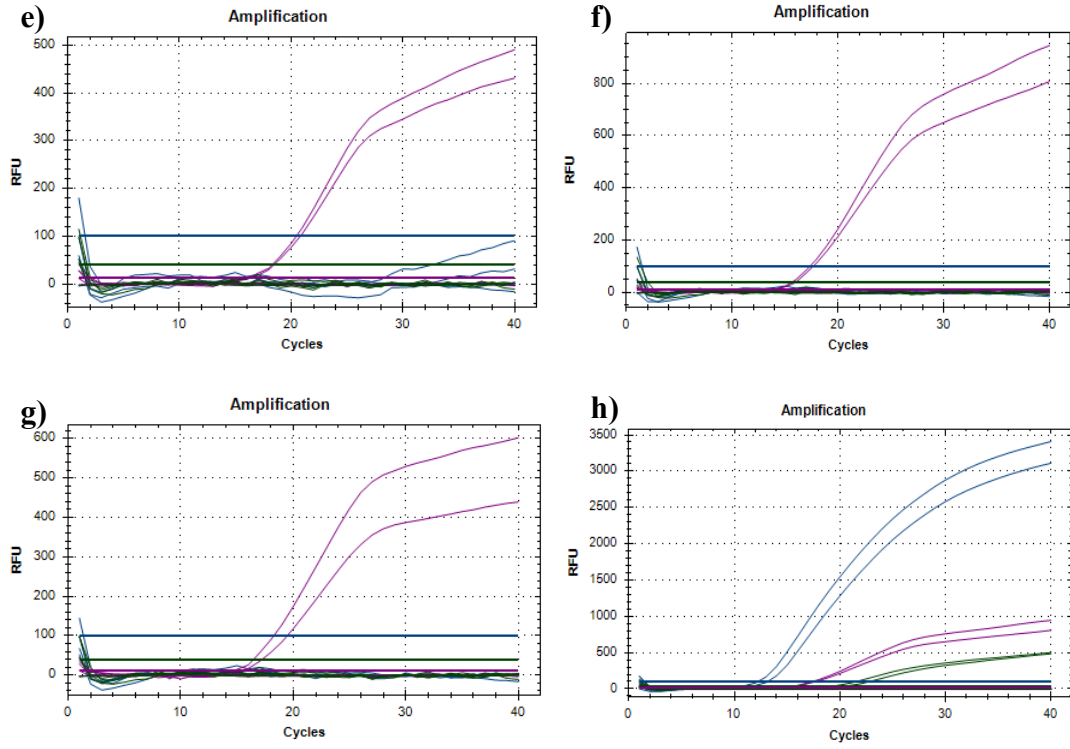
İçerik	Tekli Reaksiyon için Kullanılan Hacim ve Konsantrasyon	Çoklu (Multipleks) Reaksiyon için Kullanılan Hacim ve Konsantrasyon		
iTaq Universal Probes Supermix (2X)	5 μL (2X)	5 μL (2X)		
Forward ve Reverse Primerler	1 μL (5 μM- her bir primer)	Aspo0A-f/r2 0,5 μL (10 μM- her bir primer)	BgyrB-f/r1 0,5 μL (10 μM- her bir primer)	GgyrB-f/r1 0,125 μL (10 μM- her bir primer)
Florojenik Prob	1 μL (2,5 μM)	0,5 μL (5 μM)	0,5 μL (5 μM)	0,5 μL (5 μM)
DNA (200 ng)	1 μL	1 μL		
Nükleaz içermeyen su	1 μL	1,375 μL		
Toplam reaksiyon hacmi	10 μL	10 μL		

İlerleyen aşamalarda, hassasiyet derecelerini belirleme amacıyla tekli reaksiyonlarda olduğu gibi 200 ng- 2 fg aralığında bir seri dilüsyonla hazırlanan genomik DNA'lar kullanılmış ve çoklu reaksiyon karışımında bulunan primer ve prob çiftleriyle birarada birlikte kurulan qRT-PCR düzeneklerinde hassasiyet dereceleri belirlenmiştir.



Şekil 4.18 Çoklu (multipleks) reaksiyonların CFX Maestro yazılımından elde edilen amplifikasyon grafikleri

a) “*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*” F81 hs. *A. ayderensis*, FAM kanalı (2 paralel mavi), b) *A. flavithermus* DSM 2641, FAM kanalı (2 paralel mavi), c) *G. thermodenitrificans* DSM 465, HEX kanalı (2 paralel yeşil), d) *G. stearothermophilus* ATCC 43223, HEX kanalı (2 paralel yeşil).



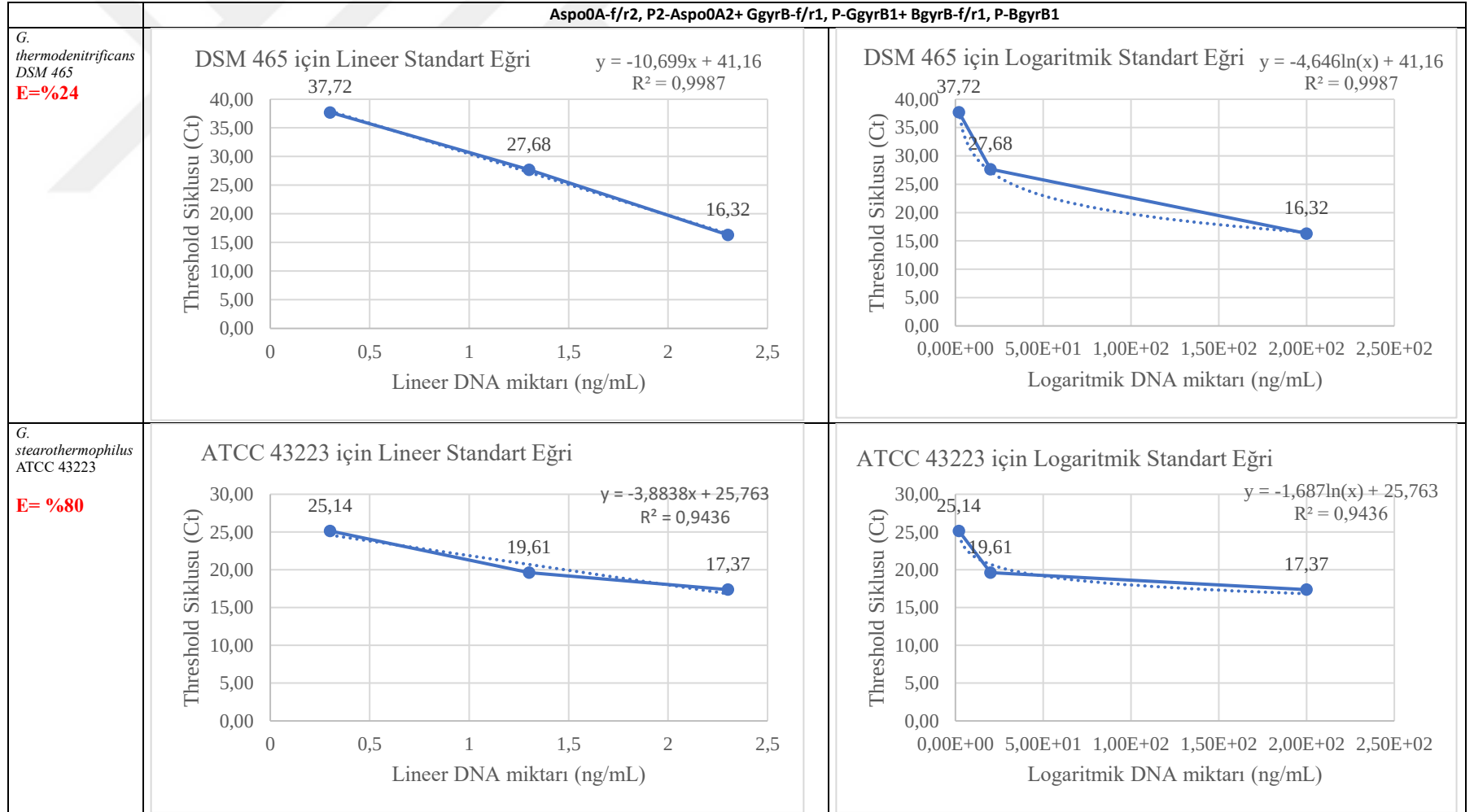
Şekil 4.18 Çoklu (multipleks) reaksiyonların CFX Maestro yazılımından elde edilen amplifikasyon grafikleri

e) *B. amyloliquefaciens* DSM 7, CY5 kanalı (2 paralel mor), f) *B. licheniformis* DSM 13, CY5 kanalı (2 paralel mor), g) *B. subtilis* DSM 1971 CY5 kanalı (2 paralel mor), h) Tüm reaksiyonların birlikte görünümü (devam).

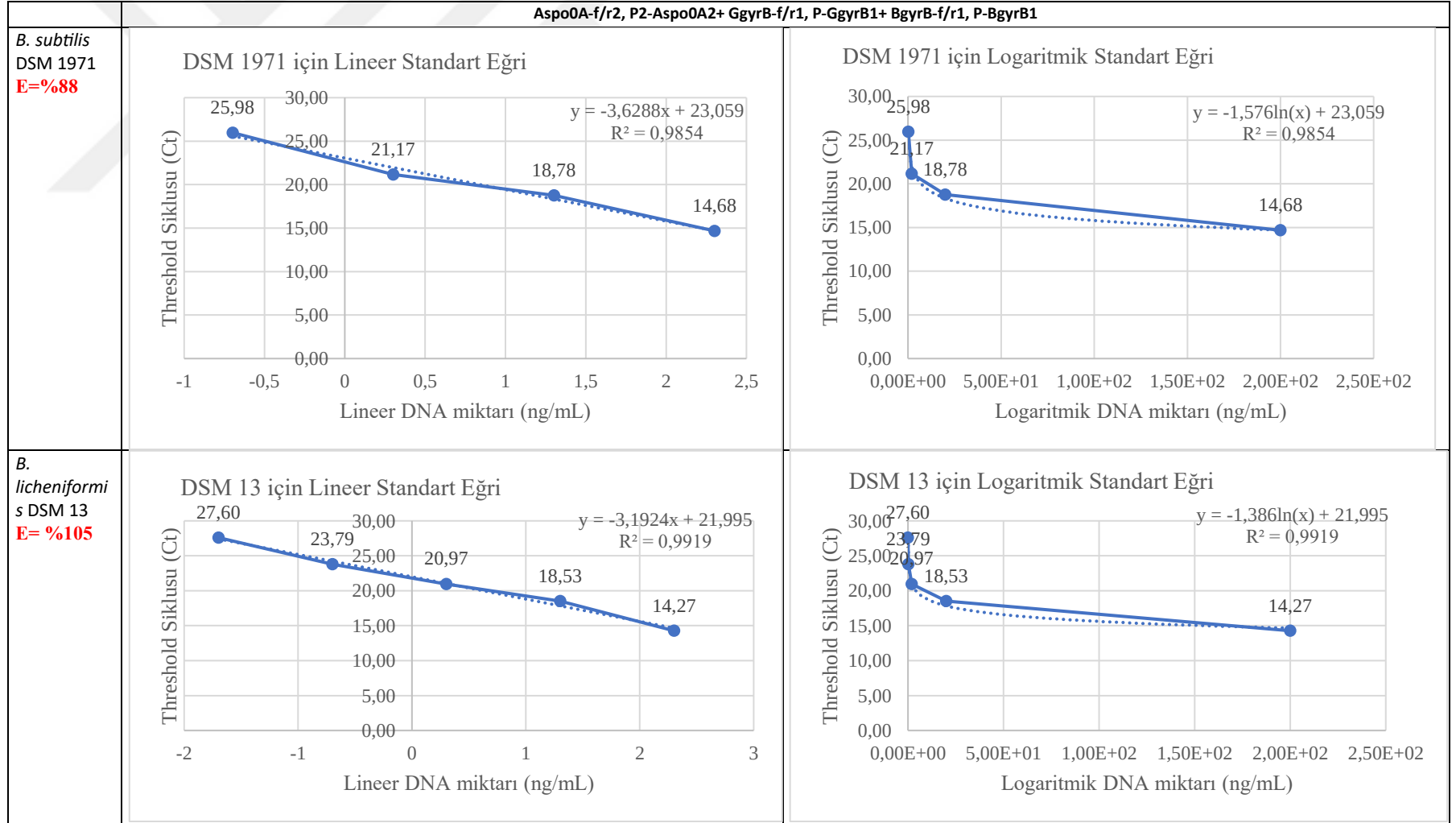
Çizelge 4.17 Çoklu reaksiyonlarda primer ve prob setleriyle temsilci türlerin çalışıldığı semi kantifikasyon grafikleri

<i>A.kamchatkensis</i> subsp. <i>assacharedens</i> F81 için E=%83	Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2+ GgyrB-f/r1, P-GgyrB1+ BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 F81 için Lineer Standart Eğri $y = -3,8016x + 20,839$ $R^2 = 0,9976$ Threshold Siklusu (Ct) Lineer DNA miktarı (ng/mL)	F81 için Logaritmik Standart Eğri $y = -1,651\ln(x) + 20,839$ $R^2 = 0,9976$ Threshold Siklusu (Ct) Logaritmik DNA miktarı (ng/mL)
<i>A.flavithermus</i> DSM 2641 E= %80	DSM 2641 için Lineer Standart Eğri $y = -3,9111x + 22,136$ $R^2 = 0,978$ Threshold Siklusu (Ct) LineerDNA miktarı (ng/mL)	DSM 2641 için Logaritmik Standart Eğri $y = -1,699\ln(x) + 22,136$ $R^2 = 0,978$ Threshold Siklusu (Ct) Logaritmik DNA miktarı (ng/mL)

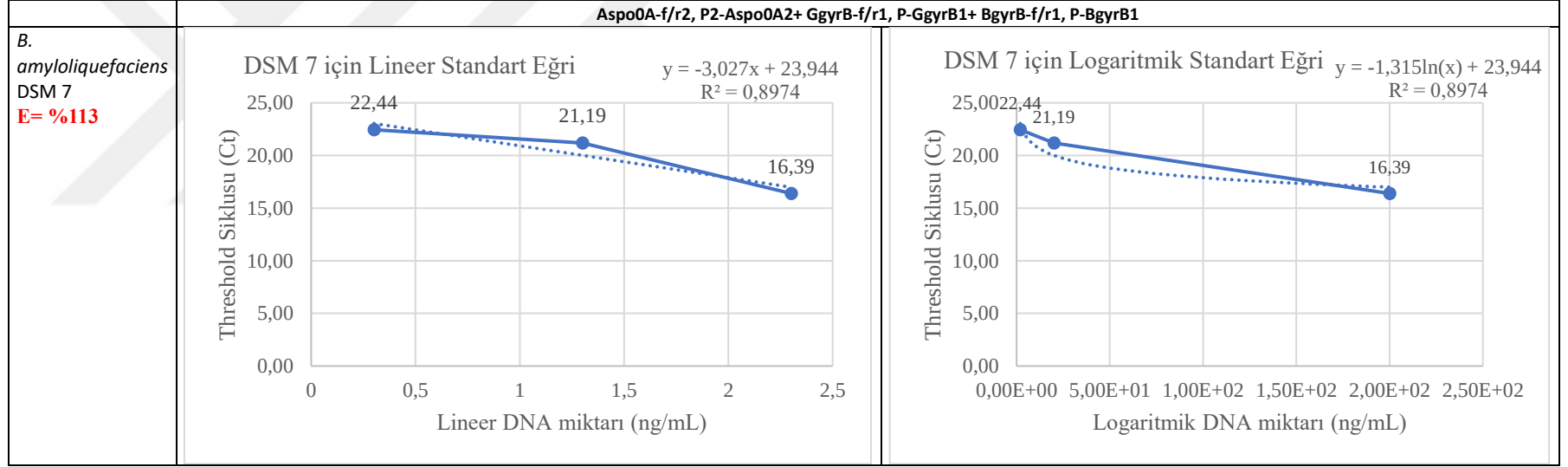
Çizelge 4.17 Çoklu reaksiyonlarda primer ve prob setleriyle temsilci türlerin çalışıldığı semi kantifikasyon grafikleri (devamı)



Çizelge 4.17 Çoklu reaksiyonlarda primer ve prob setleriyle temsilci türlerin çalışıldığı semi kantifikasyon grafikleri (devamı)



Çizelge 4.17 Çoklu reaksiyonlarda primer ve prob setleriyle temsilci türlerin çalışıldığı semi kantifikasyon grafikleri (devamı)



İdeal koşulları belirlenen çoklu qRT-PCR reaksiyon karışımları ile çalışma kapsamında belirlenen 7 temsilci türden elde edilen genomik DNA'lar (200 ng/μL) test edilmiş olup, CFX Maestro yazılımından elde edilen amplifikasyon görüntüleri toplu halde Şekil 4.18'de verilmiştir. Bu çoklu reaksiyonlarda "*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*" F81 hs. *A. ayderensis* ve *A. flavithermus* DSM 2641 FAM kanalında; *G. thermodenitrificans* DSM 465 ve *G. stearothermophilus* ATCC 43223 HEX kanalında; *B. amyloliquefaciens* DSM 7, *B. licheniformis* DSM 13 ve *B. subtilis* DSM 1971 ise CY5 kanalında, tüm seçilen primer ve prob setleri birlikte iken dahi hedef cinse özgü pozitif reaksiyonlar olduğu görülmektedir. Reaksiyonlara ait ekran görüntülerinden de anlaşılacağı üzere, her bir cinse ait primer ve prob seti sadece kendi cinsine ait türlerle reaksiyona girmekte ve bir arada bulunduklarında bir diğer reaksiyonu engelleyecek şekilde davranmamakta, 3 kanaldaki farklı renkte ışımlar rahatlıkla ayırt edilebilmekte, yalancı pozitif sonuçlara neden olmamaktadırlar. Dolayısıyla, çoklu reaksiyonlar üçlü primer-prob seti kullanılarak yürütülmüştür. Ancak, tüm bakterilerde mevcut olan 16S rRNA genini temel alan pozitif kontrol olarak A16S-f/r1, P-A16S1 primer/prob seti diğer 3 primer-prob seti ile bir arada çoklu reaksiyona alındığında, tüm kanalları baskılayıp, ortamdaki DNA'ların tamamını kullanarak CFR610'a özgü tek bir amplifikasyon grafiği verilmiştir. Kullanılan iTaq (Universal Probes Supermix (Kat. No: 1725131)) enzim üretici tavsiyesi çoklu reaksiyonlarda ikiden fazla primer ve prob seti için garanti vermemekte, dolayısıyla dört primer ve prob setinin birlikte bulunduğu çoklu reaksiyonlarda başarılı olmaması durumu anlaşılır bulunmuştur. Bu sebeple A16S-f/r1, P-A16S1 setinin iç kontrol olarak ayrı bir halde kullanılması düşünülmüş ve çoklu reaksiyonlarına dahil edilmemiştir.

Çizelge 4.18 Temsilci türlerin 200 ng/μl-2 fg/μl konsantrasyonlardaki genomik DNA'ları ile yürütülmüş çoklu qRT-PCR reaksiyonlarının kalibrasyon grafiği denklem verileri

Çoklu Reaksiyon	Temsilci tür	Lineer Denklem/ Eğim	R ²	Çoklu E değeri (%)	Tekli E değeri (%)
Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2+ GgyrB-f/r1, P-GgyrB1+ BgyrB-f/r1, P-BgyrB1	" <i>A. kamchatkensis</i> subsp. <i>assacharedens</i> " F81 hs. <i>A. ayderensis</i>	$y = -3,8016x + 20,839$	0,9976	83	63
	<i>A. flavithermus</i> DSM 2641	$y = -3,9111x + 22,136$	0,9780	80	72
	<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223	$y = -3,8838x + 25,763$	0,9436	80	118
	<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465	$y = -10,699x + 41,16$	0,9987	24	120
	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7	$y = -3,027x + 23,944$	0,8974	113	66
	<i>B. licheniformis</i> DSM 13	$y = -3,1924x + 21,995$	0,9919	105	76
	<i>B. subtilis</i> DSM 1971	$y = -3,6288x + 23,059$	0,9854	88	86

Çoklu reaksiyonlarda kullanılan setler ve (Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 + GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 + BgyrB-f/r1, P-BgyrB1) temsilci türler ile *A. kamchatkensis* subsp. *assacharedens*" F81 hs. *A. ayderensis* ($p < 0,001$, anlamlı), *A. flavithermus* DSM 2641 ($p < 0,001$, anlamlı), *G. thermodenitrificans* DSM 465 ($p < 0,05$, anlamlı), *G. stearothermophilus* ATCC 43223 ($p = 0,153$, anlamsız), *B. subtilis* DSM 1971 ($p < 0,05$, anlamlı), *B. licheniformis* DSM 13 ($p = 0,798$, anlamsız) ve *B. amyloliquefaciens* DSM 7 ($p = 0,208$, anlamsız) arasında lineer regresyon analizleri de yapılmıştır (Çizelge 4.17).

Tekli ve çoklu reaksiyonlardan elde edilen etkinlik değerleri (E) kümülatif bir değerlendirmeye tabii tutulduğunda söz konusu değerlerin çoklu reaksiyonlarda farklılık gösterdiği, temsilci türler bazında değerlendirdiğinde tekli reaksiyonlara oranla kabul edilebilirlik aralığına (%90-%110) daha çok yaklaştığı görülmektedir (Çizelge 4.18).

4.6.4 Sütten izole edilen DNA'lar ile yapılan qRT-PCR çalışmaları

Tez çalışmaları kapsamında seçilen 7 basilin (*G. thermodenitrificans* DSM 465, *G. stearothermophilus* ATCC 43223, *A. flavithermus* DSM 2641, "*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*" F81 hs. *A. ayderensis*, *B. subtilis* DSM 1971, *B. licheniformis* DSM 13 ve *B. amyloliquefaciens* DSM 7) nihai toplam vejetatif hücre sayım sonuçları logaritma cinsinden KOB/mL şeklinde hesaplanmıştır. $\log_{10}(\text{KOB/mL})$ birimindeki kültürel sayım sonuçları, izole edilen DNA'lara ait spektrofotometrik ölçüm verileri ve cinse özgü

primer/prob setleriyle kurulan qRT-PCR sonuçlarından elde edilen Ct değerleri toplu olarak Çizelge 4.19-4.25 aralığında verilmiştir.

Çizelge 4.19 “*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*” F81 hs. *A. ayderensis* için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları

Aşılana n Vejetatif Örnek Miktarı (KOB/mL)	DNA ^V (ng/μL)	DNA ^S (ng/μL)	TSA*	BCP*	Ortalama Ct ^V	STDEV ^V	Ortalama Ct ^S	STDEV ^S
10 ¹	28,8	127,9	-	-	-	-	-	-
10 ²	32,9	126,9	2,34	-	-	-	-	-
10 ³	97,1	133,3	3,71	-	-	-	39,43	0,06
10 ⁴	56,0	110,0	5,01	-	-	-	29,67	0,0
10 ⁵	130,1	162,6	5,75	-	34,05	0,35	32,78	2,22
10 ⁶	37,2	151,3	7,29	-	31,44	0,0	27,42	0,83
10 ⁷	63,2	97,8	7,85	-	28,51	0,42	22,93	0,92
10 ⁸	85,3	162,0	9,28	-	28,11	0,34	19,87	2,38
10 ⁹	328,8	472,5	9,95	-	17,41	0,37	19,14	1,29

(*; log(KOB/mL), ^V; vorteks, ^S; sonikasyon, STDEV; Standart sapma)

Çizelge 4.20 *A. flavithermus* DSM 2641 için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları

Aşılana n Vejetatif Örnek Miktarı (KOB/mL)	DNA ^V (ng/μL)	DNA ^S (ng/μL)	TSA*	BCP*	Ortalama Ct ^V	STDEV ^V	Ortalama Ct ^S	STDEV ^S
10 ¹	93,3	160,9	1,30	-	-	-	-	-
10 ²	134,8	73,6	1,30	-	-	-	-	-
10 ³	66,3	72,9	3,58	-	-	-	-	-
10 ⁴	41,8	98,3	5,34	-	-	-	-	-
10 ⁵	61,3	115,1	5,74	-	-	-	38,11	0,0
10 ⁶	76,1	67,8	6,95	-	-	-	32,36	0,0
10 ⁷	43,9	76,6	7,90	-	-	-	28,07	0,0
10 ⁸	158,7	122,1	8,95	-	32,57	0,79	28,08	0,0
10 ⁹	528,1	687,5	9,90	-	17,15	1,41	19,34	0,0

(*; log(KOB/mL), ^V; vorteks, ^S; sonikasyon, STDEV; Standart sapma)

Çizelge 4.21 *G. thermodenitrificans* DSM 465 için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları

Aşılana n Vejetatif Örnek Miktarı (KOB/mL)	DNA ^V (ng/μL)	DNA ^S (ng/μL)	TSA*	BCP*	Ortalama Ct ^V	Ortalama Ct ^S
10 ¹	179,2	30,3	-	-	-	-
10 ²	43,7	53,8	2,18	2,30	-	-
10 ³	69,0	50,0	3,67	3,18	-	-
10 ⁴	48,0	77,0	4,91	4,79	-	-
10 ⁵	55,4	55,5	6,09	6,70	-	-
10 ⁶	56,1	48,0	6,95	7,41	-	-
10 ⁷	41,1	85,3	7,88	8,13	-	-
10 ⁸	89,0	206,4	9,13	9,48	-	-
10 ⁹	393,7	710,0	10,70	10,76	-	-

(*; log (KOB/mL), ^V; vorteks, ^S; sonikasyon, STDEV; Standart Dağılım)

Çizelge 4.22 *G. stearothermophilus* ATCC 43223 için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları

Aşılana n Vejetatif Örnek Miktarı (KOB/mL)	DNA ^V (ng/μL)	DNA ^S (ng/μL)	TSA *	BCP *	Ortalama Ct ^V	STDEV ^V	Ortalama Ct ^S	STDEV ^S
10 ¹	33,7	59,0	2,00	1,60	-	-	-	-
10 ²	44,3	71,6	2,90	1,85	-	-	-	-
10 ³	69,2	99,0	3,73	4,04	-	-	-	-
10 ⁴	69,6	44,3	5,17	5,49	39,69	0,00	-	-
10 ⁵	90,4	68,4	6,78	6,21	36,96	0,00	33,06	0,20
10 ⁶	90,7	60,4	7,67	7,77	31,02	0,00	32,18	0,95
10 ⁷	100,3	109,8	8,23	8,10	29,89	0,00	26,62	0,31
10 ⁸	72,1	202,6	9,29	9,30	24,63	0,70	23,97	0,66
10 ⁹	529,5	911,4	10,51	10,78	14,50	0,05	14,11	0,50

(*; log (KOB/mL), ^V; vorteks, ^S; sonikasyon, STDEV; Standart sapma)

Çizelge 4.23 *B. licheniformis* DSM 13 için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları

Aşılana n Vejetatif Örnek Miktarı (KOB/mL)	DNA ^V (ng/μL)	DNA ^S (ng/μL)	TSA *	BCP*	Ortalama Ct ^V	STDEV ^V	Ortalama Ct ^S	STDEV ^S
10 ¹	184,3	148,2	2,90	2,70	-	-	-	-
10 ²	133,2	131,2	3,80	3,59	-	-	38,89	0,00
10 ³	114	163,2	4,73	4,85	-	-	32,84	0,19
10 ⁴	202,3	186,0	5,60	5,70	-	-	30,47	0,00
10 ⁵	89,4	233,5	7,27	7,00	30,96	0,43	29,47	1,73
10 ⁶	189,3	141,7	8,28	7,95	27,97	0,77	26,03	1,37
10 ⁷	104,5	168,1	9,15	9,22	25,41	0,52	27,07	2,00
10 ⁸	125,9	301,4	9,90	9,90	25,54	0,08	24,52	1,97
10 ⁹	990,7	1255,1	10,6	10,78	14,97	1,23	19,94	0,87

(*; log (KOB/mL), ^V; vorteks, ^S; sonikasyon, STDEV; Standart sapma)

Çizelge 4.24 *B. subtilis* DSM 1971 için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları

Aşılana n Vejetatif Örnek Miktarı (KOB/mL)	DNA ^V (ng/μL)	DNA ^S (ng/μL)	TSA *	BCP*	Ortalama Ct ^V	STDEV ^V	Ortalama Ct ^S	STDEV ^S
10 ¹	132,2	154,5	2,48	2,85	-	-	-	-
10 ²	103,1	47,3	3,72	3,33	-	-	-	-
10 ³	140,4	150,9	4,78	4,56	-	-	-	-
10 ⁴	37,4	122,4	5,1	5,48	-	-	-	-
10 ⁵	173,5	78,4	6,26	6,51	-	-	-	-
10 ⁶	126,4	116,7	7,3	7,72	38,71	0,0	34,13	0,0
10 ⁷	65,9	332,1	8,6	8,64	37,45	0,0	30	2,64
10 ⁸	135,8	227,6	9,88	9,68	32,21	0,0	20,45	1,55
10 ⁹	453,1	1203	10,78	10,53	18,36	1,48	20,15	1,39

(*; log (KOB/mL), ^V; vorteks, ^S; sonikasyon, STDEV; Standart sapma)

Çizelge 4.25 *B. amyloliquefaciens* DSM 7 için vejetatif kültürden yapılan sayım ve qRT-PCR sonuçları

Aşılana Vejetatif Örnek Miktarı (KOB/mL)	DNA ^v (ng/μL)	DNA ^s (ng/μL)	TSA*	BCP*	Ortalama Ct ^v	STDEV ^v	Ortalama Ct ^s	STDEV ^s
10 ¹	150,2	384,2	-	-	-	-	-	-
10 ²	222,2	142	2,3	2	-	-	-	-
10 ³	109,5	112,9	3,54	3,23	-	-	-	-
10 ⁴	179,5	182,6	4,19	3	-	-	-	-
10 ⁵	217,8	128,1	5,3	5,3	30,65	0,25	33,42	0,03
10 ⁶	116,1	163,1	6,3	6	26,78	0,72	23,26	0,16
10 ⁷	219,6	582,1	6,88	8,04	25,29	0,25	22,03	0,31
10 ⁸	272,3	611,7	9,3	8,6	21,94	0,27	18,61	0,41
10 ⁹	635	825,6	9,24	9,18	16,49	0,85	17,78	0,87

(*; log (KOB/mL), ^v; vorteks, ^s; sonikasyon, STDEV; Standart sapma)

Bölüm 4.1’de elde edilen spor stokları kullanılarak, steril tam yağlı süt içeren falkonlar içerisine bir seri dilüsyon yapılmıştır (10⁻¹-10⁻⁹). Konsantrasyonların teyidi amacıyla, TSA ve BCP agar besiyerlerine inokülasyon yapılarak her bir cinse ait ideal sıcaklık koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde gelişen koloniler sayılarak nihai toplam spor sayım sonuçları logaritma cinsinden KOB/mL hesaplamaları yapılmıştır. Buna göre logaritma 10 tabanında sayılan sporların KOB/mL değerleri, izole edilen DNA’lara ait spektrofotometrik ölçüm sonuçları ve cinse özgü primer/prob setleriyle kurulan qRT-PCR sonuçlarından elde edilen Ct değerlerinin tamamı toplu olarak Çizelge 4.26-4.31 aralığında verilmiştir.

Çizelge 4.26 *G. thermodenitrificans* DSM 465 türüne ait spor stoklarının süte inoküle edilmesi sonrası izole edilen DNA konsantrasyonları, koloni sayım sonuçları ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 seti ile kurulan qRT-PCR reaksiyonundan elde edilen ortalama Ct değerleri

Aşılana DSM 465 spor miktarı (KOB/mL)	DNA (ng/μL) ^v	DNA (ng/μL) ^s	TSA log (KOB/mL)	BCP log (KOB/mL)	Ct ^v	Ct ^s
10 ¹	134,4	115,9	1,30	3,00	-	-
10 ²	49,6	92,8	2,51	2,61	-	-
10 ³	49,6	91,3	4,02	4,02	-	-
10 ⁴	112,4	121,5	4,00	4,74	-	37,18
10 ⁵	51,8	72,2	5,60	5,48	36,02	31,61
10 ⁶	85,3	70	6,00	6,30	34,65	27,85
10 ⁷	116,8	78,7	7,00	7,30	27,72	26,42
10 ⁸	76,3	99	8,00	8,78	25,54	21,40
10 ⁹	81,6	90,2	9,00	9,30	21,52	18,55

(^v: vorteks, ^s: sonikasyon)

Çizelge 4.27 *G. stearothermophilus* ATCC 43223 türüne ait spor stoklarının süte inoküle edilmesi sonrası izole edilen DNA konsantrasyonları, koloni sayım sonuçları ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 seti ile kurulan qRT-PCR reaksiyonundan elde edilen ortalama Ct değerleri

Aşılana ATCC 43223 spor miktarı (KOB/mL)	DNA (ng/μL) ^v	DNA (ng/μL) ^s	TSA log (KOB/mL)	BCP log (KOB/mL)	Ct ^v	Ct ^s
10 ¹	140,9	82,3	0,60	-	-	-
10 ²	81,8	92,7	2,79	-	-	-
10 ³	42,5	155	3,92	3,56	35,93	-
10 ⁴	73,6	80,7	5,11	4,79	37,14	35,64
10 ⁵	30,0	94,6	5,48	5,48	27,02	34,43
10 ⁶	68,5	63,7	6,90	6,81	24,11	27,75

(^v: vorteks, ^s: sonikasyon)

Çizelge 4.28 “*A. kamchatkensis subsp. asaccharedens*” F81 hs. *A. ayderensis* türüne ait spor stoklarının süte inoküle edilmesi sonrası izole edilen DNA konsantrasyonları, koloni sayım sonuçları ve Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 seti ile kurulan qRT-PCR reaksiyonundan elde edilen ortalama Ct değerleri

Aşılana F81 spor miktarı (KOB/mL)	DNA (ng/μL) ^v	DNA (ng/μL) ^s	TSA log (KOB/mL)	BCP log (KOB/mL)	Ct ^v	Ct ^s
10 ¹	78,9	90,8	ND	-	-	-
10 ²	50,5	51,4	2,85	-	-	-
10 ³	48,6	112,2	4,65	-	-	-
10 ⁴	42,5	138,9	5,79	-	38,89	39,26
10 ⁵	45,2	60,5	6,70	-	36,91	38,76
10 ⁶	46,4	62,8	7,70	-	32,69	27,81
10 ⁷	45,1	86,2	8,58	5,78	22,72	23,48

(^v: vorteks, ^s: sonikasyon)

Çizelge 4.29 *B. licheniformis* DSM 13 türüne ait spor stoklarının süte inoküle edilmesi sonrası izole edilen DNA konsantrasyonları, koloni sayım sonuçları ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile kurulan qRT-PCR reaksiyonundan elde edilen ortalama Ct değerleri

Aşılana DSM 13 spor miktarı (KOB/mL)	DNA (ng/μL) ^v	DNA (ng/μL) ^s	TSA log (KOB/mL)	BCP log (KOB/mL)	Ct ^v	Ct ^s
10 ¹	69,8	69,8	2,00	2,48	-	-
10 ²	55,3	55,3	2,79	2,81	-	-
10 ³	44,2	44,2	4,04	4,02	-	-
10 ⁴	63,1	63,1	4,70	5,08	-	-
10 ⁵	44,4	44,4	5,60	5,95	-	33,38
10 ⁶	46,6	46,6	7,00	7,16	35,43	31,65
10 ⁷	49,3	49,3	7,70	8,02	31,04	28,12
10 ⁸	59,7	59,7	8,90	8,78	26,39	24,75
10 ⁹	51,6	51,6	10,00	10,15	23,27	20,26

(^v: vorteks, ^s: sonikasyon)

Çizelge 4.30 *B. subtilis* DSM 1971 türüne ait spor stoklarının süte inoküle edilmesi sonrası izole edilen DNA konsantrasyonları, koloni sayım sonuçları ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile kurulan qRT-PCR reaksiyonundan elde edilen ortalama Ct değerleri

Aşılana DSM 1971 spor miktarı (KOB/mL)	DNA (ng/μL) ^v	DNA (ng/μL) ^s	TSA log (KOB/mL)	BCP log (KOB/mL)	Ct ^v	Ct ^s
10 ¹	147,5	111,7	-	-	-	-
10 ²	77,7	258,3	2,85	-	-	-
10 ³	66,5	187,1	3,51	3,54	-	-
10 ⁴	66,0	178,5	4,41	3,43	-	-
10 ⁵	58,0	61,9	5,40	5,32	-	-
10 ⁶	76,4	83,9	6,04	6,28	-	-
10 ⁷	50,3	92,9	7,15	7,18	-	39,80
10 ⁸	111,1	68,1	8,23	8,43	-	36,08
10 ⁹	58,7	135,3	9,30	9,11	31,45	26,41

(^v: vorteks, ^s: sonikasyon)

Çizelge 4.31 *B. amyloliquefaciens* DSM 7 türüne ait spor stoklarının süte inoküle edilmesi sonrası izole edilen DNA konsantrasyonları, koloni sayım sonuçları ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile kurulan qRT-PCR reaksiyonundan elde edilen ortalama Ct değerleri

Aşılana DSM 7 spor miktarı (KOB/mL)	DNA (ng/μL) ^v	DNA (ng/μL) ^s	TSA log (KOB/mL)	BCP log (KOB/mL)	Ct ^v	Ct ^s
10 ¹	93,3	156,5	2,00	-	-	-
10 ²	42,7	51,7	2,08	2,67	-	-
10 ³	43,3	92,0	3,55	3,91	-	-
10 ⁴	53,9	123,0	4,00	5,08	-	-
10 ⁵	50,7	119,8	5,30	7,16	-	31,23
10 ⁶	58,7	93,7	6,30	7,63	-	28,11
10 ⁷	53,2	89,9	7,00	8,00	30,42	23,69

(^v: vorteks, ^s: sonikasyon)

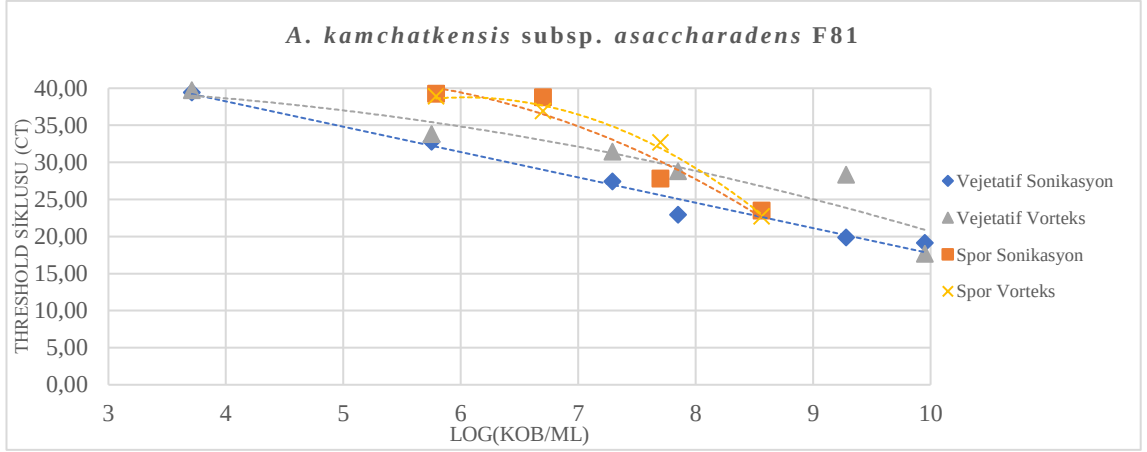
Hem vejetatif hem de spor hücrelerinden elde edilen bu değerler (Çizelge 4.19-4.31), ilerleyen aşamalarda toplu kantifikasyon grafiklerinin oluşturulması ve teorik sayımların bulunması için gerekli formülasyonların çıkarılmasında kullanılmıştır.

İlerleyen aşamalarda ise, aynı spor stokları kullanılarak, 24 saatlik deney kurulumu gerçekleştirilmiştir. TSA ve BCP agar besiyerlerine yapılan inokülasyon sonucu inkübasyon bitimi sonrasında gözlenen koloniler sayılarak KOB/mL hesaplamaları yapılmıştır. Logaritma 10 tabanında KOB/mL değerleri ve hem vejetatif hücrelerinden hem de spor hücrelerinden izole edilen DNA'lara ait spektrofotometrik ölçüm sonuçları ve cinse özgü primer/prob setleriyle kurulan qRT-PCR sonuçlarından elde edilen Ct değerlerinin tamamı Çizelge 4.32-4.38 arasında sunulmuştur.



Şekil 4.19 Süt ve 7 temsilci tür ile kurulan deney düzeneklerinin fotoğrafları

Vejetatif hücrelerden (Çizelge 4.19-4.20), spor hücrelerinden (Çizelge 4.26-4.31) ve saatlik süt örneklem alımlarından (Çizelge 4.32-4.37) elde edilen tüm veriler ile kalibrasyon grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.20-4.28). En uygun matematiksel formülasyonlar Excel üzerinden seçilmiş olup Çizelge 4.20-4.27 arasında sunulan verilerle teorik sayımları hesaplanmıştır.



Şekil 4.20 “*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharadens*” F81 hs. *A. ayderensis*’in, vejetatif hücre ve sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve Asp0A-f/r2, P2-Asp0A2 primer-prob setiyle elde edilen Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği

Ticari süte aşılanan 10^1 ila 10^7 konsantrasyonlarındaki F81 izolatının vejetatif hücre ve sporları, plaka sayım yöntemi kullanılarak log (KOB/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Çizelge 4.32). Aynı zamanda süte aşılanan bu örneklerden yapılan iki farklı DNA izolasyon yöntemi sonrasında Asp0A-f/r2, P2-Asp0A2 seti ile qRT-PCR reaksiyonları yürütülmüştür. Şekil 4.20’deki 4 farklı deney düzeneğine ait Microsoft Office Excel programından elde edilen kalibrasyon eğrisinin formülleri aşağıda sunulmuştur:

1; Vejetatif sonikasyon: koloni sayımına vejetatif hücreler dahildir ve sonikasyon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır.

$$y = -3,4199x + 51,911 \quad (R^2 = 0,9787)$$

2; Vejetatif vorteks: koloni sayımına vejetatif hücreler dahildir ve vorteks yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır.

$$y = -0,2729x^2 + 0,8256x + 39,708 \quad (R^2 = 0,8727)$$

3; Spor sonikasyon: koloni sayımına spor hücreleri dahildir ve sonikasyon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

$$y = -1,287x^2 + 12,17x + 12,736 \quad (R^2 = 0,9368)$$

4; *Spor vorteks*: koloni sayımına spor hücreleri dahildir ve vorteks yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

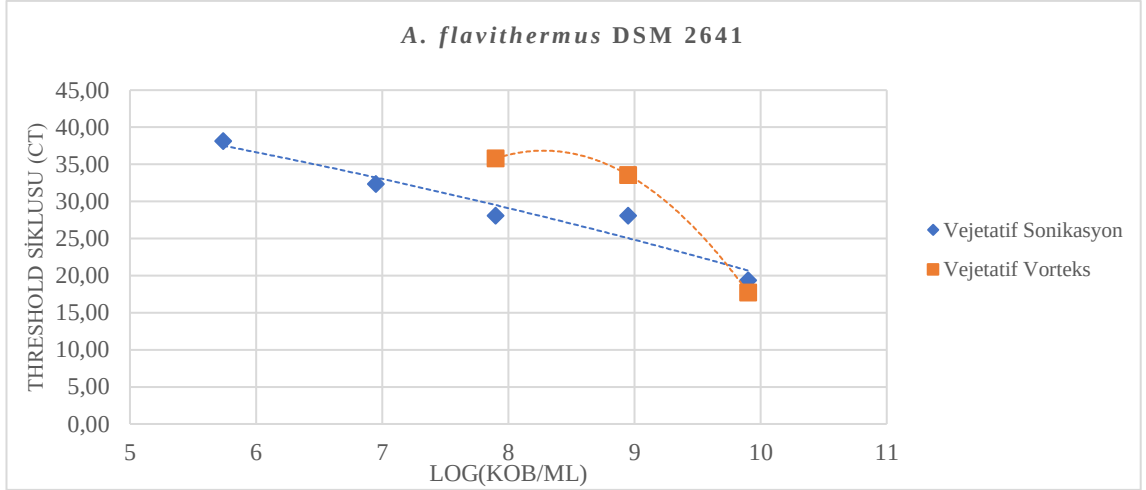
$$y = -2,4663x^2 + 29,755x - 50,977 \quad R^2 = (0,9914)$$

Çizelge 4.32 “*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*” hs. *A. ayderensis* F81’in kültürel sayım ve Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her DNA iki izolasyon yöntemi ile kıyaslanması

Örnekleme	Vejetatif hücre									
	TSA ^v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) ^v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) ^s	Ct ^s	SDEV ^s
6 h	3,17	-	3,37	4,84	37,0	33,45	0,59	51,2	35,33	0,06
12 h	4,00	-	3,55	5,39	21,0	34,56	0,00	64,2	33,47	0,95
18 h	5,00	-	4,05	6,67	174,4	28,26	1,63	276,4	29,10	0,0
24 h	6,00	-	4,12	6,36	222,6	27,26	0,15	239,3	30,14	0,27
Örnekleme	Spor									
	TSA ^v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) ^v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) ^s	Ct ^s	SDEV ^s
0 h	3,76	-	5,06	4,34	29,4	36,49	0,18	41,9	37,33	0,61
6 h	-	-	4,23	4,16	23,7	30,79	0,61	56,6	35,33	0,45
12 h	3,00	-	4,09	3,04	53,7	29,54	0,53	59,4	24,94	0,4
18 h	-	-	4,58	4,16	504	33,65	1,01	512,8	35,39	0,0
24 h	-	-	4,08	4,02	277,8	29,38	0,14	386,1	33,86	1,94

(*log (KOB/mL), ^v: vorteks, ^s: sonikasyon, SDEV: Standart sapma)

A. flavithermus DSM 2641 türü için Bölüm 4.1’de daha önce sözü edildiği üzere sporlar için hedeflenen konsantrasyona çıkılamadığından ötürü, düşük konsantrasyondaki spor stoğu (10⁴ KOB/mL) sadece saatlik deney kurulumunda kullanılmıştır. Söz konusu deneyden elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 4.33’te sunulmuş, ancak sporlar için kalibrasyon grafikleri yapılamadığından teorik sayımları hesaplanamamıştır. Şekil 4.21’de ise sadece vejetatif hücrelerden hazırlanan örnekler kullanılarak yapılan iki farklı izolasyon yönteminin kıyaslandığı kalibrasyon eğrileri sunulmuştur.



Şekil 4.21 *A. flavithermus* DSM 2641'in vejetatif hücre ve sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 seti ile elde Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği

1; Vejetatif sonikasyon: koloni sayımına vejetatif hücreler dahildir ve sonikasyon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır.

$$y = -0,1685x^2 - 1,4079x + 51,142 \quad (R^2 = 0,9248)$$

2; Vejetatif vorteks: koloni sayımına vejetatif hücreler dahildir ve vorteks yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır.

$$y = -7,2815x^2 + 120,57x - 462,23 \quad (R^2 = 1)$$

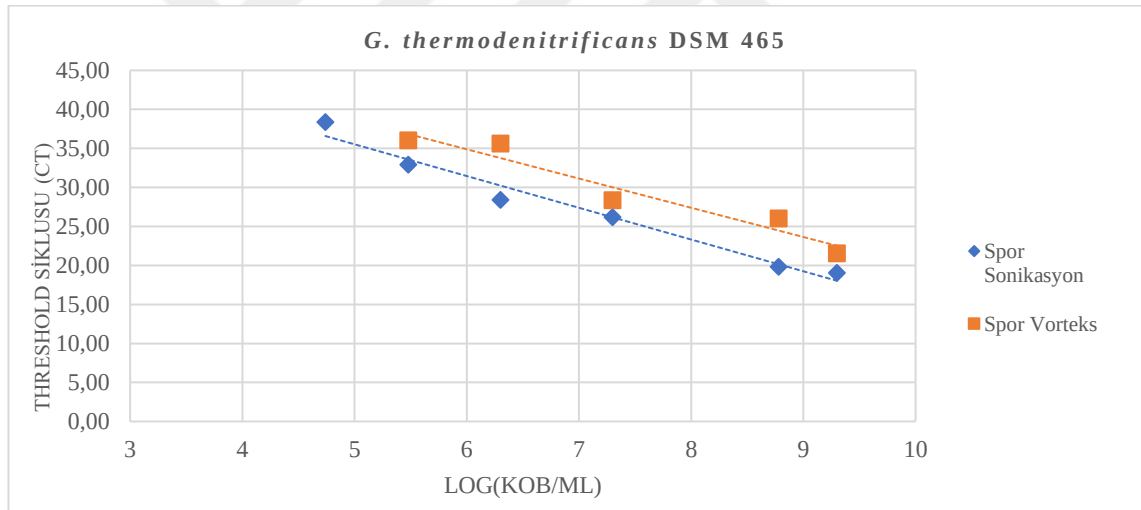
Çizelge 4.33 *A. flavithermus* DSM 2641'in kültürel sayım ve Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her iki DNA izolasyon yöntemi ile kıyaslanması

Örnekleme	Vejetatif hücre									
	TSA ^v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) ^v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) ^s	Ct ^s	SDEV ^s
6 h	3,36	-	0,75	1,17	80	39,97	0,59	166,3	32,24	0,06
12 h	3,47	-	0,7	1,25	117,9	34,67	0,0	167,7	30,84	0,95
18 h	3,00	-	0,2	1,11	91,1	31,13	1,63	168	33,31	0,0
24 h	-	-	0,76	0,91	149,5	36,32	0,15	284,9	36,79	0,27
Örnekleme	Spor									
	TSA ^s	BCP ^s	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) ^v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) ^s	Ct ^s	SDEV ^s
0 h	3,81	-	-	-	70,3	-	0,18	191,7	19,73	0,61
6 h	-	-	-	-	130,7	33,27	0,61	206	27,99	0,45
12 h	-	-	-	-	68,9	37,13	0,53	284,6	27,60	0,4
18 h	-	-	-	-	83,4	25,60	1,01	269,8	32,08	0,0
24 h	-	-	-	-	161	28,50	0,14	185,4	38,36	1,94

(* log (KOB/mL), ^v: Vorteks, ^s: Sonikasyon; SDEV: Standart sapma)

Her iki türe ait Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 seti ile yapılan qRT-PCR çalışmalarında sonuçlar farklılık göstermekle beraber, cins bazında bakıldığında toplu bir yorum yapılabilmekte ve KOB/mL cinsinden teorik ölçüm yapılabilir. Her iki türe ait Aspo0A-f/r2, P2-Aspo0A2 seti ile yapılan qRT-PCR çalışmalarında sonuçlar farklılık göstermekle beraber, cins bazında bakıldığında toplu bir yorum yapılabilmekte ve KOB/mL cinsinden teorik ölçüm yapılabilir.

G. thermodenitrificans DSM 465 durumunda ise, vejetatif hücrelerin yer aldığı örneklerden yapılan izolasyonlar GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 primer/prob seti ile yürütülen qRT-PCR analizlerinde sonuç vermemiş olup, koloni sayımları mevcut olmakla beraber, spor sayımları hem kültürel sayım hem de qRT-pCR reaksiyonlarıyla yapılan teorik sayımların sonuçlarından elde edilmiştir. Bu durumun daha önce bahsedildiği üzere primer ve prob dizilerinde bulunan dejenere bazlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sebeple, Şekil 4.22’de sadece sporlardan yapılan iki farklı izolasyon tekniği karşılaştırılmış olup, sonuçlar Çizelge 4.34’te sunulmuştur.



Şekil 4.22 *G. thermodenitrificans* DSM 465’in sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 primer/prob seti ile elde edilen Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği

1; *Spor sonikasyon*: koloni sayımına spor hücreleri dahildir ve sonikasyon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

$$y = -4,0688x + 55,869 \quad (R^2 = 0,9709)$$

2; *Spor vorteks*: koloni sayımına spor hücreleri dahildir ve vorteks yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

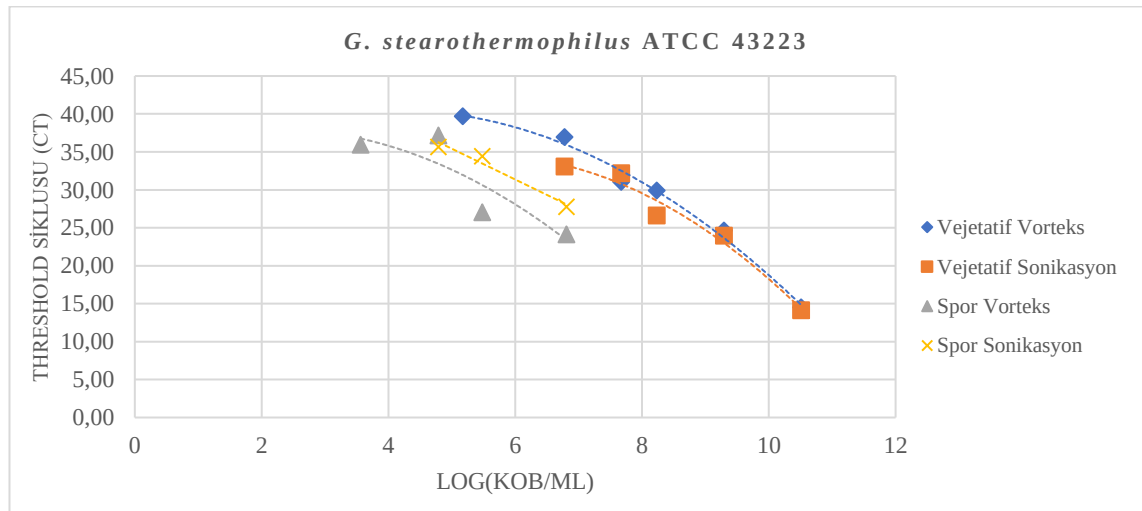
$$y = -3,7476x + 57,372 (R^2 = 0,935)$$

Çizelge 4.34 *G. thermodenitrificans* DSM 465'in kültürel sayım ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her iki DNA izolasyon yöntemi ile kıyaslanması

Örnekleme	Vejetatif hücre									
	TSA _v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) _v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) _s	Ct ^s	SDEV ^s
6 h	4,47	3,47	-	-	98,2	35,78	1,38	148,4	-	-
12 h	4,00	3,00	-	-	73,9	27,32	1,05	53,9	32,57	0,56
18 h	5,00	-	-	-	114	22,77	0,46	141,5	23,83	0,59
24 h	4,00	4,00	-	-	147	29,88	0,67	365,2	28,96	0,64
Örnekleme	Spor									
	TSA _v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) _v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) _s	Ct ^s	SDEV ^s
0 h	3,60	3,55	-	-	69,1	-	-	187	-	-
6 h	3,45	-	-	-	113,1	-	-	126,7	-	-
12 h	3,00	-	6,17	5,24	130,3	34,23	0,45	95,1	34,53	1,09
18 h	3,00	-	7,51	5,91	64,6	29,22	0,48	94,2	31,79	0,36
24 h	3,00	-	5,85	5,17	350,4	35,44	0,0	617,3	34,81	0,0

(* log (KOB/mL), ^v: Vorteks, ^s: Sonikasyon; SDEV: Standart sapma)

G. stearotherophilus ATCC 43223 ile kurulan 4 farklı deney düzeneğinden elde edilen verilerle Microsoft Office Excel programında kalibrasyon eğrileri çizilmiş olup toplu olarak Şekil 4.23'te verilmiştir. Farklı izolasyon tekniklerinin karşılaştırıldığı tüm veriler Çizelge 4.35'te sunulmuştur.



Şekil 4.23 *G. stearotherophilus* ATCC 43223'ün sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 seti ile elde edilen Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği

1; *Vejetatif vortex*: koloni sayımına vejetatif hücreler dahildir ve vorteks yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

$$y = -0,6242x^2 + 5,1166x + 30,017 \quad (R^2 = 0,9897)$$

2; *Vejetatif sonikasyon*: koloni sayımına vejetatif hücreler dahildir ve sonikasyon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır.

$$y = -0,8138x^2 + 9,0002x + 9,6261 \quad (R^2 = 0,971)$$

3; *Spor vorteks*: koloni sayımına spor hücreleri dahildir ve vorteks yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

$$y = -0,6962x^2 + 3,1031x + 34,536 \quad (R^2 = 0,776)$$

4; *Spor sonikasyon*: koloni sayımına spor hücreleri dahildir ve sonikasyon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

$$y = -4,0562x + 55,7 \quad (R^2 = 0,9606)$$

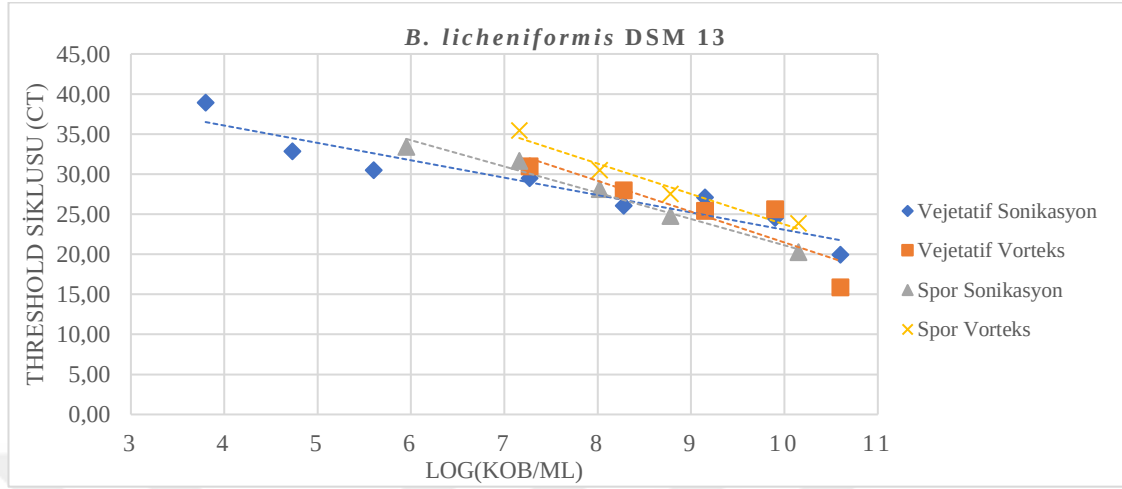
Çizelge 4.35 *G. stearothermophilus* ATCC 43222'ün kültürel sayım ve GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her iki DNA izolasyon yöntemi ile kıyaslanması

Örnekleme	Vejetatif hücre									
	TSA ^v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) ^v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) ^s	Ct ^s	SDEV ^s
6 h	4,63	4,03	8,32	5,52	99,6	36,64	0,0	88,8	36,69	-
12 h	5,00	5,00	8,08	11,64	35,8	35,90	0,0	118,3	35,22	0,0
18 h	8,04	8,27	8,27	8,59	96,9	25,77	0,91	139,6	26,86	4,48
24 h	7,30	7,11	8,24	8,42	223,9	27,69	0,86	286,9	27,68	0,71
Örnekleme	Spor									
	TSA ^v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) ^v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) ^s	Ct ^s	SDEV ^s
0 h	3,79	3,28	4,5	5,667	77,1	38,45	1,88	122,3	32,67	0,0
6 h	3,73	3,69	4,51	6,11	166,2	32,85	0,73	78,3	30,95	0,89
12 h	3,00	3,00	4,43	5,95	198,4	33,95	0,37	124	31,56	5,40
18 h	3,00	3,6	4,42	4,777	86,5	33,42	0,04	106,9	36,32	5,61
24 h	5,30	3,00	4,51	5,08	388,3	36,21	0,13	727,7	32,14	0,04

(* log (KOB/mL), ^v: Vorteks, ^s: Sonikasyon; SDEV: Standart sapma)

İki farklı DNA izolasyon yönteminden elde edilen örneklerin BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda çizilen kalibrasyon grafikleri, tür içerisinde gruplandırılarak (Şekil 4.24, 4.25 ve 4.26) toplu halde sunulmuştur. *B. subtilis* DSM 1971 ve *B. amyloliquefaciens* DSM 7'nin sporlarının vorteksleme işlemi sonrasında elde edilen DNA'ları ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden tür bazında tek bir veri elde edilmiş olup, ilgili grafikler (sırasıyla Şekil 4.25 ve 4.26) üzerinde sadece nokta halinde gösterilmiştir. Her iki DNA

izolasyon yönteminin kıyaslamasından elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 4.36 ve 4.38 arasında sunulmuştur.



Şekil 4.24 *B. licheniformis* DSM 13'ün sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile elde edilen Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği

1; Vejetatif sonikasyon: koloni sayımına vejetatif hücreler dahildir ve sonikasyon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır.

$$y = -2,169x + 44,739 \quad (R^2 = 0,8982)$$

2; Vejetatif vorteks: koloni sayımına vejetatif hücreler dahildir ve vorteks yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

$$y = -3,8457x + 59,923 \quad (R^2 = 0,7939)$$

3; Spor sonikasyon: koloni sayımına spor hücreleri dahildir ve sonikasyon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

$$y = -3,2792x + 53,905 \quad (R^2 = 0,9728)$$

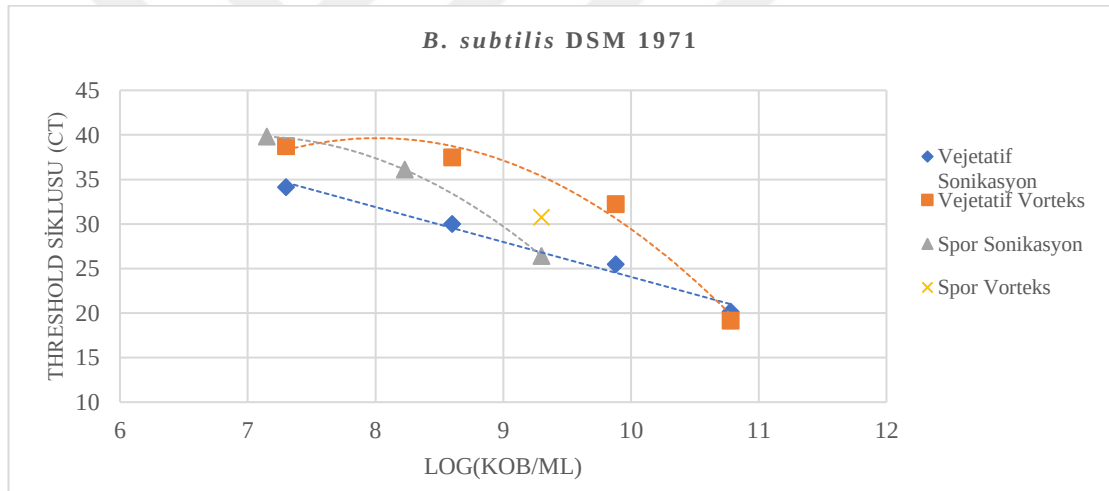
4; Spor vorteks: koloni sayımına spor hücreleri dahildir ve vorteks yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

$$y = -3,7944x + 61,667 \quad (R^2 = 0,9637)$$

Çizelge 4.36 *B. licheniformis* DSM 13'ün, kültürel sayım ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her iki DNA izolasyon yöntemi ile kıyaslanması

Örnekleme	Vejetatif hücre									
	TSA ^v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) ^v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) ^s	Ct ^s	SDEV ^s
6 h	3,90	3,00			101,9	-	-	50,7	-	-
12 h	7,98	8,15	7,06	5,26	71,8	32,75	0,20	71,0	33,33	0,36
18 h	10,30	10,20	6,55	11,69	65,4	34,72	0,0	299,3	19,38	0,26
24 h	10,04	10,16	6,86	12,18	176,2	33,54	1,07	153,3	18,31	0,45
Örnekleme	Spor									
	TSA ^v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) ^v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) ^s	Ct ^s	SDEV ^s
0 h	3,42	3,44	-	-	109,4	-	-	185,5	-	-
6 h	4,78	3,00	-	-	227,4	-	-	72,7	-	-
12 h	-	-	-	8,62	174,1	-	-	101,7	25,62	0,61
18 h	-	-	5,78	10,03	119,6	39,71	0,0	117,1	20,13	0,73
24 h	4,00	4,3	6,24	9,08	188,1	37,96	1,33	687,9	24,12	2,32

(* log (KOB/mL), ^v: Vorteks, ^s: Sonikasyon; SDEV: Standart sapma)



Şekil 4.25 *B. subtilis* DSM 1971'in sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile elde edilen Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği

1; Vejetatif sonikasyon: koloni sayımına vejetatif hücreler dahildir ve sonikasyon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır.

$$y = -3,9223x + 63,282 \quad (R^2 = 0,9812)$$

2; Vejetatif vorteks: koloni sayımına vejetatif hücreler dahildir ve vorteks yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

$$y = -2,745x^2 + 44,131x - 137,61 \quad (R^2 = 0,9771)$$

3; *Spor sonikasyon*: koloni sayımına spor hücreleri dahildir ve sonikasyon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

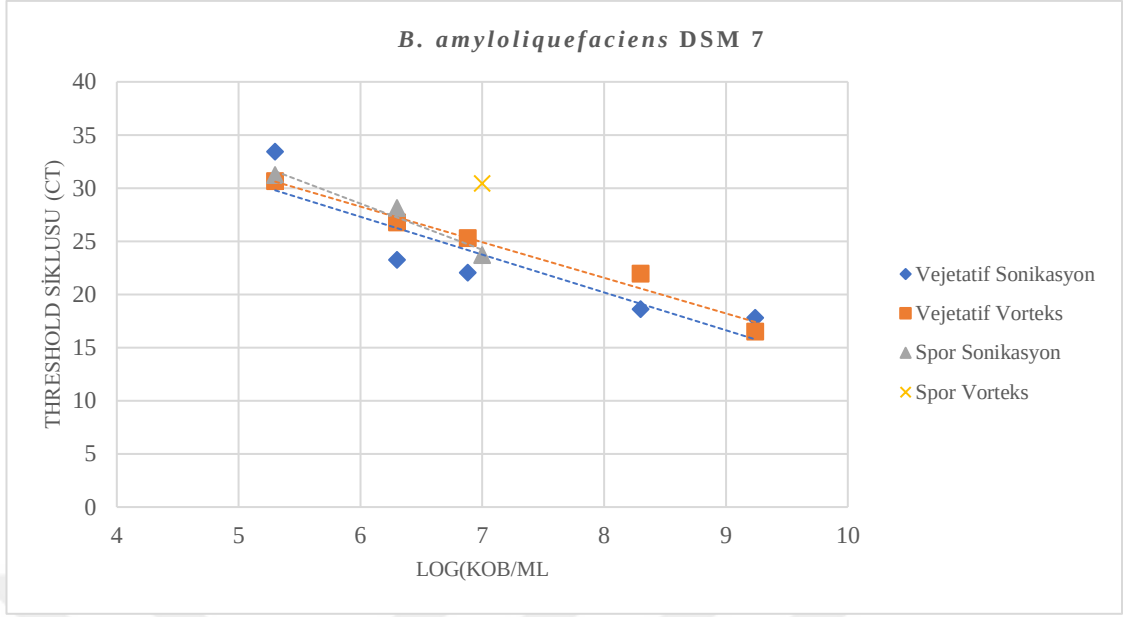
$$y = -6,2236x + 85,296 \text{ (R}^2 = 0,9369\text{)}$$

4; *Spor vorteksten*: elde edilen sonuç tek değer olduğu için nokta şeklinde Şekil 4.25'te yer alan grafik üzerinde verilmiştir ve bundan ötürü Çizelge 4.37'de yer alan teorik sayımlar yapılamamıştır.

Çizelge 4.37 *B. subtilis* DSM 1971'in kültürel sayım ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her iki DNA izolasyon yöntemi ile kıyaslanması

Örnekleme	Vejetatif hücre									
	TSA ^v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) ^v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) ^s	Ct ^s	SDEV ^s
6 h	4,02	3,00	-	-	30,5	-	-	57,0	-	-
12 h	8,32	8,20	16,29	8,97	125,4	38,92	0,0	83,8	28,06	0,18
18 h	10,10	9,95	16,45	10,59	81,7	32,94	0,08	159,5	21,74	0,60
24 h	10,26	10,13	16,31	10,82	77,5	34,49	2,88	124,8	20,84	0,68
Örnekleme	Spor									
	TSA ^v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) ^v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) ^s	Ct ^s	SDEV ^s
0 h	3,18	2,96	-	-	30,8	-	-	140,7	-	-
6 h	-	-	-	-	46,5	-	-	83,9	-	-
12 h	-	-	-	10,14	65,2	34,60	2,76	90,7	22,14	0,33
18 h	8,00	6,48	-	10,22	152,6	26,46	0,38	185,2	21,67	0,72
24 h	7,90	7,60	-	10,10	110,1	30,06	0,31	230,8	22,38	0,24

(* log (KOB/mL), V: Vorteks, S: Sonikasyon; SDEV: Standart sapma)



Şekil 4.26 *B. amyloliquefaciens* DSM 7'nin sporlarının logaritmik koloni sayım sonuçları ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile elde edilen Ct değerlerine göre oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin grafiği

1; Vejetatif sonikasyon: koloni sayımına vejetatif hücreler dahildir ve sonikasyon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır.

$$y = -3,5577x + 48,65 \quad (R^2 = 0,8022)$$

2; Vejetatif vorteks: koloni sayımına vejetatif hücreleri dahildir ve vorteks yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

$$y = -3,3496x + 48,361 \quad (R^2 = 0,9738)$$

3; Spor sonikasyon: koloni sayımına spor hücreleri dahildir ve sonikasyon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır

$$y = -4,3452x + 54,617 \quad (R^2 = 0,9602)$$

4; Spor vorteksten: elde edilen sonuç tek değer olduğu için nokta şeklinde Şekil 4.26'da yer alan grafik üzerinde verilmiştir ve bundan ötürü Çizelge 4.38'de yer alan teorik sayımlar yapılamamıştır.

Çizelge 4.38 *B. amyloliquefaciens* DSM 7'nin kültürel sayım ve BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 seti ile yapılan qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden elde edilen teorik sayım (qRT-PCR) sonuçlarının her iki DNA izolasyon yöntemi ile kıyaslanması

Örnekleme	Vejetatif hücre									
	TSA ^v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) ^v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) ^s	Ct ^s	SDEV ^s
6 h	3,85	3,90	-	-	31,3	-	-	96,1	-	-
12 h	4,88	4,65	-	-	31,4	-	-	60,5	-	-
18 h	10,0	9,15	6,61	7,81	122,1	26,20	1,23	181,6	20,89	0,07
24 h	10,08	9,30	4,33	8,46	111,5	33,83	0,11	157,1	18,52	0,81
Örnekleme	Spor									
	TSA ^v	BCP ^v	Teorik sayım ^v	Teorik sayım ^s	DNA (ng/μL) ^v	Ct ^v	SDEV ^v	DNA (ng/μL) ^s	Ct ^s	SDEV ^s
0 h	3,12	3,38	-	-	42,4	-	-	405,8	-	-
6 h	3,00	3,30	-	-	30,9	-	-	92,1	-	-
12 h	4,00	4,60	-	-	58,9	-	-	207	-	-
18 h	3,00	3,00	-	-	283,7	-	-	647,6	-	-
24 h	3,00	3,00	-	3,36	447	32,17	3,89	1081,5	26,96	0,08

(* log (KOB/mL), ^v: Vorteks, ^s: Sonikasyon; SDEV: Standart sapma)

DNA bütünlüğünün özellikle düşük konsantrasyonlarla (KOB/mL) yapılan çalışmalarda dikkate değer değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir. Şekil 4.21 ve 4.28 aralığında yer alan modeller, Microsoft Office Excel programıyla en uygun model veya modeller (lineer, kübik veya her ikisi) seçilerek oluşturulmuştur. İki farklı DNA izolasyon yöntemi kıyaslandığında, süttten izole edilen DNA konsantrasyonlarının nanodrop verilerine göre vorteksleme için vejetatif hücre ve spordan sırasıyla 28,8-990,7 ng/μL ve 30,3- 1255,1 ng/μL minimum ve maksimum aralıklar da izole edilebilmiştir. Bu durum sonikasyon yapıldığı takdirde vejetatif hücreden 30-147,5 ng/μL, spordan ise 44,2-258,3 ng/μL olarak ölçülmüştür.

BCP agar sayımı ISO standartlarında yer almasına karşın, yapılan sayım sonuçlarında farklı tür ve cinslerdeki bakterilerin sayımlarında hassasiyetinin değiştiği görülmüştür. Bu nedenle toplanan süt örneklemelerinden koloni oluşturma birimleri hesaplanırken, TSA ve BCP besiyerlerine inokülasyon prosedürü de uygulanmış, sayımlar hem TSA hem de BCP agar besiyerlerinde eş zamanlı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kültürel sayım sonuçları Çizelge 4.32-4.38'de (kültüre dayalı yöntemde tüm cinsler için tespit limiti: 10²-10⁹ KOB/mL) sunulmuştur. Buna göre, *Anoxybacillus* cinsi için kültüre dayalı olmayan qRT-PCR tekniğiyle de 10⁴-10⁹ KOB/mL (vorteks ve sonikasyon yöntemleriyle DNA izolasyonu sonrası), *Geobacillus* için vorteks sonrası 10³/10⁴-10⁹ KOB/mL ve

sonikasyon sonrası 10^4 - 10^9 KOB/mL toplam hücre ve spor varlığı tespit edilebilmiştir. Buna karşın *Bacillus* cinsi için, hassasiyet daha düşük olup, vorteks ile $10^6/10^7/10^9$ - 10^9 KOB/mL, sonikasyonla ise $10^5/10^7$ - 10^9 KOB/mL’lik daha düşük tespit limitleri elde edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında birlikte,

- Süt ve süt ürünlerinde sıklıkla gözlenen mezofilik ve termofilik çok sayıda sporlu basil türleri ve belirlenen 8 gene ait dizileri, web tabanlı veri bankalarından temin edilmiş,
- Her bir gene özgü diziler cinse ait türler arasında biyoinformatik araçlarla hizalanmış,
- Sporlu basillerin ayrımını yapılabilecek primer ve prob tasarım setlerinin ΔG oranları BeaconDesigner web arayüzü kullanılarak ve manuel olarak tasarlanmış,
- Tüm primer setlerinin doğrulukları, cins içi ve cinsler arası yapılan konvansiyonel PCR ve qRT-PCR çalışmalarıyla tespit edilmiş ve cins içi ve dışı grupların genomik DNA’ları kullanılarak qRT-PCR reaksiyonların kantitatif analizleri gerçekleştirilmiş,
- Ön eliminasyonu yapılan primer/prob setlerinin tekli ve çoklu reaksiyon uyumları optimize edilmiş,
- Süt varlığında spor hücrelerinden iki farklı yöntem olan sonikasyon ve vorteksleme ile DNA izolasyonları yapılmış,
- Elde edilen spor ve hücre DNA’larıyla optimize edilen qRT-PCR çalışmaları sonucunda DNA bütünlükleri kanıtlanarak, kantitatif ölçümleri ve istatistiksel analizleri yapılmış,
- Çoklu qRT-PCR reaksiyonlarının cins bazında etkinlik değerleri (E) ve tespit limitleri, klasik kültürel sayım yöntemiyle kıyaslanmıştır.

Tüm bu elde edilen bilgiler ışığında, *Anoxybacillus*, *Geobacillus* ve *Bacillus* cinslerine ait spordardan izole edilen DNA’lar ile qRT-PCR yöntem optimizasyonu ilk defa bu kadar kapsamlı bir şekilde çalışılmış olup, özellikle süt ve süt ürünleri endüstrisinde işlem gören ürünler içerisindeki sporların belirlenmesi konusunda hızlı ve aynı zamanda tezin amacı olan qRT-PCR yöntem optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve ticari bir ürün ortaya koyulması adına ilk adımlar tamamlanmıştır.

5. TARTIŞMA

Mezofilik ve termofilik bakteriler gibi gıda ürünlerinde bozulmaya neden olan mikroorganizmalar, sütün işlendiği ortamlar da ve süt içerisinde tespit edilmektedirler (Skeie vd. 2019). Sütte tespit edilen *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* ve *Bacillus cereus* gibi mikroorganizmalar yalnızca gıda zehirlenmesine neden olmakla kalmaz, aynı zamanda lipaz ve proteaz üretimi yoluyla süt ürünlerin kalitesini düşürerek, asitleşmesine ve bozulmasına da neden olurlar (Li vd. 2018, Willis vd. 2018). Özellikle spor oluşturan basiller yaygın gıda kontaminantları olarak bilinmektedir. Ürettikleri sporların ürün içerisindeki mevcudiyeti önemli bir problem olup, gıda bozulmasına ve hatta gıda kaynaklı hastalıklara neden olabilmektedirler (Muphy vd. 1999, Lopez-Brea vd. 2017, Ryu vd. 2021). Sütün sahip olduğu içerik sebebiyle (Nicklas vd. 2009, Čuboň vd. 2012, Keresteš 2016), spor oluşumu kolaylıkla gerçekleşebilmekte, kullanılan sterilizasyon yöntemleri bakteriyel yükü tamamıyla giderememekte ve bu da üretici için uzun vadede sorunların oluşmasına sebep olabilmektedir. Gıda sanayinde sıklıkla kullanılan yerinde temizlik prosedürlerinde (CIP-Cleaning In Place) kullanılan kostik (alkali) ve nitrik asit kullanımının, bakteriyostatik koşulların oluşmasına neden olduğu (White ve Rabe 1970, Stewart ve Seiberling 1996), fakat mikroorganizmaların gideriminde yetersiz kaldığı (Hinton vd. 2002, Parkar vd. 2003 ve 2004) kanıtlanmıştır. Başta Türk Gıda Kodeksi'nde yer alan Mikrobiyolojik Kriterler yönetmeliğine ve Avrupa Birliği'nce kabul gören Codex Alimentarius'a göre, süt ve süt ürünleri içerisindeki mikrobiyal yük tayinin yapılması gereklidir. Bu bağlamda ilişkili ISO standartlarında (Örn: ISO/TS 27265:2009| IDF/RM 228:2009) altın standart olarak koloni sayımının yapılması beklenmektedir. Fakat bu yöntem, maliyet artışı (besiyeri kullanımı ve bununla ilgili sarf giderleri, çalışacak inkübatörün uzun süreli kullanımına bağlı elektrik giderinin artması), yetişmiş personel eksikliği, personel hatalarının sonuçları etkilemesi (kontaminasyon ve sayımda oluşabilecek diğer hatalar), uzun zaman gereksinimi (sayım sonuçları için standartlarda istenilen sürenin 3 ila 5 gün ve daha fazla süre gerektirmesi) gibi pek çok dezavantaja sahiptir.

Bu bağlamda ilk olarak, qRT-PCR yöntemiyle tespit yönteminin oluşturulması amacıyla, 7 temsilci basil türü seçilerek, sporları üretilmiştir. Magnezyum, kalsiyum ve potasyum

gibi mineraller, spor oluşum sürecinde kritik bir rol oynamakta, olgun sporların gelişimi için elzem olmasının yanı sıra spor oluşumunu da desteklemektedir (Vinter 1969). Kalsiyum, spor oluşumunun başlangıcında sporun kor bölgesinde birikmekte (Johnstone vd. 1994, Palop vd. 1999) ve sporulasyonu başlatan genlerin ifadelerinde artışa yol açmaktadır (Oomes vd. 2009). Mineral tuzları genellikle sporulasyon için kullanılan besiyerlerine eklenmektedir (Cooney ve Freese, 1976, Kaul ve Singh, 1982, Warriner ve Waites, 1999). Süt ürünlerinde doğal olarak bulunan bu mineraller, termofilik basillerin sporulasyon fazına geçişini teşvik edebilmektedir (Holt 1985). Bu bağlamda seçilen 7 temsilci basil türünün üçü (*G. thermodenitrificans* DSM 465, *A. flavithermus* DSM 2641, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 hs. *A. ayderensis*) için sporulasyon optimizasyonu daha önce yapılmış olup (Karakaya 2019), kalan dördü için (*G. stearothermophilus* ATCC 43223, *B. subtilis* DSM 1971, *B. licheniformis* DSM 13, *B. amyloliquefaciens* DSM 7), spor üretiminin en fazla olduğu besiyerleri tez kapsamında belirlenerek, daha önce yapılan çalışmaları doğrular nitelikte yüksek spor üretimleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1-4.4, Çizelge 4.1, Karakaya 2019, Karakaya vd. 2022).

Süt ve süt ürünlerinden tespit edilen mikroorganizmaların filogenetik sınıflandırmalarına bakıldığında, önemli bir çoğunluğun *Bacillaceae* ve *Anoxybacillaceae* ailelerine mensup üyelerden oluştuğu görülmektedir (Scheldeman vd. 2002, Te Giffel vd. 2002, Rückert vd. 2004, Scheldeman vd. 2005, Durak vd. 2006, Huck vd. 2007, Ranieri vd. 2009, Reginensi vd. 2011, Postollec vd. 2012, Seale vd. 2012, Dhakal vd. 2013, Di pinto vd. 2013, Lücking vd. 2013, Zhao vd. 2013, Burgess vd. 2014, Masiello vd. 2014, Buehner vd. 2015, Sadiq vd. 2016a,b, Zain vd. 2013 ve 2016, Flint vd. 2017, Martinez vd. 2017, Júnior vd. 2018a,b, Mugadza ve Buys 2018, Li vd. 2019). Bu kontaminantların tespiti mikrobiyolojik ve moleküler biyolojik yöntemlerle yapılmıştır. Li ve arkadaşlarının (2019) gerçekleştirdiği çalışmada hem seçici besiyeri hem de 16S rRNA bölgesi baz alınarak, sözü edilen her iki yöntemle birlikte, *Bacillus*, *Geobacillus* ve *Anoxybacillus* cinsine ait süt kontaminantı üyelerin tespiti yapılmıştır. Ivy ve arkadaşlarının (2012) ve birkaç sene sonra Masiello ve arkadaşlarının (2014) *rpoB* gen bölgesiyle gerçekleştirdikleri moleküler araştırmalarda ise *Bacillus cereus* grubu ayırt edilebilmiş ve *Bacillus subtilis* türü ve gruplandırma teşhisleri yapılabilmektedir. Aynı gen bölgesini kullanarak tür ayrımı yapabilen birçok çalışma (Huck vd. 2007, Seale vd. 2012, Dhakal

vd. 2013, Martinez vd. 2017), kullanılan gen bölgesinin ayırt edilebilirlik özelliğini *Bacillus* cinsi bazında kanıtlamıştır. Ancak tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen konvansiyonel PCR analizleri *rpoB* geninin, diğer cinsler ile (*Anoxybacillus* ve *Geobacillus*, Çizelge 4.6) ayırt edici özelliğinin sorgulanabilirliğini koymuştur. Genomda bulundukları yakınlıklardan ve aynı organelin alt ünitelerinin ifadesini sağlayan iki genden biri olan *rpoA* için de aynı durum gözlenmiş olup cins temelinde ayırt edilebilirliklerinin düşük olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6).

Durak ve arkadaşlarının (2006) *gyrB* genini kullanarak yaptığı moleküler tespit ile *Bacillus* ve *Paenibacillus* cinslerine ait türler teşhis edilebilmiş, Zain ve arkadaşlarının (2016) gerçekleştirdiği çalışmada ise, özellikle *Bacillus* cinsine ait türlerin ayırt edilebilirliği kanıtlanmıştır. Bunlara ek olarak *gyrB* geninin benzerlik analizlerinde sıklıkla kullanıldığı (Yamamoto ve Harayama 1995, 1996 ve 1998, Yamada vd. 1999, Kang vd. 2009 ve Tourova vd. 2010) bilinmektedir. Bu tez kapsamında alınan mikroorganizmaların çeşitliliği göz önünde bulundurulduğunda, gerçekleştirilen geniş kapsamlı tarama ile daha önce yapılmış çalışmalara ek olarak, *Anoxybacillus*, *Geobacillus* ve *Bacillus* cinsleri bazında da genel bir ayırımın gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir (Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.8). Ancak, dikkat çekici bir şekilde, genom içerisinde *gyrB* genine yakın bir bölgede bulunan *gyrA* geni için aynı şey söylemek mümkün olmamıştır (Çizelge 4.6).

Firmicutes aleminde yapılan karşılaştırmalı genomik analizler, tüm spor oluşturan türlerde korunmuş spor genlerinin genomik imzası olarak değerlendirebileceğini göstermiştir (Stragier vd. 2002, Onyenwoke vd. 2004, De Hoon vd. 2010, Wu vd. 2019, Galperin vd. 2012). Özellikle sporulasyonun ana başlatıcısı olan *spo0A* üzerinde yapılan çalışmalarla, bu genin sadece Firmicutes alemine özgü olduğu düşünülse de (Galperin 2006), sonraki çalışmalarda spor üreticisi olmayan mikroorganizmalarda da bulunabileceği gösterilmiştir (Farrow vd. 1994, Rainey vd. 1994, Kloos vd. 1998, Bredholt vd. 1999, Miroshnichenko vd. 2008). Bununla birlikte, sahip olduğu korunmuş bölgeler sebebiyle özellikle spor oluşturan mikroorganizmaların belirlenmesinde bir moleküler belirteç olarak kullanımı kabul görmüştür (Wunderlin vd. 2013). Bu gen bölgesi ile yapılan mutasyon çalışmalarında ise (Haman ve Lazazzera 2001) *spo0A* gen

bölgesinin eksikliğinin üç boyutlu biyofilm yapısının oluşturulmasında etkili olduğu kanıtlanmış olup, bu durum bakterilerin canlılıklarını uzun vadede etkilediği sonucunu ortaya çıkarmıştır. Brown ve arkadaşları (1994) ile Brill ve Wiegel'in (1997) gerçekleştirdiği çalışmalarla sporulasyon transkripsiyon faktörü olan *spo0A*'nın PCR tabanlı moleküler araştırmalarda tespit amacıyla kullanabilirliği kanıtlanmıştır. Söz konusu çalışmalarda, gen bölgesinin sadece endospor üreticisi *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerinde bulunduğu da belirtilmiş olup, Brown ve arkadaşlarının (1994) gerçekleştirdiği çalışmada ise bakteri genomunda tek bir kopya olarak bulunduğu dikkat çekilmiştir. Aynı zamanda söz konusu çalışmalarda, gen bölgesine özgü moleküler belirteçlerin, spor üreticisi olmayan cinslerde pozitif sonuç vermediği de belirtilmiştir. Yine Rueckert ve arkadaşları (2006) termofilik basillerin sayımında *spo0A* genini kullanmış olup, dizi uzunluğu ve nükleotid içeriği açısından yüksek bir çeşitlilik gösterdiğini de belirtilerek, termofilik basillerin ayrımının, qRT-PCR'da yer alan erime noktalarındaki (Tm) farklılıklara göre yapılabildiğini belirtmiştir. Tez çalışmasında ise erime noktası farklılığına gereksinim duyulmadan *spo0A* geni kullanılarak, tek bir erime noktasında, tek bir cins (*Anoxybacillus*) tespitine ve sayımına yönelik primer/prob tasarımı yapılabilmektedir.

Diğer sporulasyon transkripsiyon faktörleri olan *spo0B* için ise, Spo0B fostoransferazın, sporulasyon aşamasında oluşan fosforelay ile transkripsiyon aktivasyonu arasında kritik ve temel bir bağlantı sağladığı belirlenmiştir (Tzeng vd. 1998). Ancak *spo0A* ile aynı operon içerisinde yer almalarına karşın, moleküler düzeyde cins ayrımının aynı düzeyde olmadığını bu çalışma kapsamında söyleyebilmek mümkündür.

B. subtilis ve SpoIIIAB proteini üzerinde yapılan yapısal çalışmalarda (Zeytuni vd. 2018), proteinin içeriğindeki atomik yapının, bakteriyel sekresyon sistemlerinde bulunan mekanizmalara benzer bir yapıya sahip olduğu belirtilmiş, ayrıca bu protein yapısının gösterdiği katlanmanın V-ATPaz C-alt birimi ile yapısal benzerlik gösterdiğine dikkat çekilmiştir. Tez çalışmasında *spoIIIAB* gen dizisi temel alınarak yürütülen PCR ve qRT-PCR çalışmalarıyla, bu benzerliğin sadece protein katlanma motifleri düzeyinde değil aynı zamanda moleküler düzeyde de olabileceği öngörülmektedir. Ayrıca, çalışma kapsamında NCBI veritabanından temin edilen *spo0B* ve *spoIIIAB* gen dizilerinin sahip

olduğu dizi kalitesinin düşük olduğu, belirlenen cins gruplarına dahil türler arasında yapılan hizalamalar ile ortaya çıkarılmış olup, bu konudaki literatür açıklığıda tespit edilebilmiştir.

Bu yöntemler dahilinde, optimum koşulları belirlenen primer ve prob setleri her cins için ayrı ayrı seçilerek ilk olarak cins içi ve cinsler arası çaprazlamaları gerçekleştirilmiştir. Primer ve prob setlerinin tasarlandıkları cinse olan özgüllükleri gerçekleştirilen tekli qRT-PCR analizleriyle kanıtlanmıştır (Bkz. Bölüm 4.7.2). Sonrasında da çoklu qRT-PCR reaksiyon kurulumlarının optimizasyonları yapılarak, primer ve prob setlerinin sağlıklı çalışmaları reaksiyon koşulları belirlenmiş, tek bir sıcaklıkta (58°C) çalışabilirlikleri kanıtlanmış ve kantifikasyon analizleri yapılmıştır. Rueckert ve arkadaşlarının (2006)'da SYBR Green ile gerçekleştirdikleri qRT-PCR çalışmasında, genomik DNA ile gerçekleştirdikleri kantifikasyon analizlerinde en düşük genomik DNA tespit limitinin (hücre başına ortalama 2 ila 8,9 fg DNA) 17 ila 75 hücre arasındaki düşük bir tespit sınırına denk gelmekte olduğunu bulmuşlardır (Bakken ve Olsen, 1989, Rueckert vd. 2006). Aynı zamanda, sulandırılmış süt tozundan 800 KOB g⁻¹ vejetatif hücre ve 6400 KOB g⁻¹ spor tespiti yapabilmişlerdir (Rueckert vd. 2006). Tez çalışması kapsamında belirlenen temsilci türlerle yürütülen qRT-PCR kalibrasyon analizleriyle ise Asp00A-f/r2, P2-Asp00A2 primer/prob setiyle, *Anoxybacillus* türlerinin minimum 0,2 ng/mL konsantrasyondaki DNA'ları, A16S-f/r1, P-A16S1 primer/prob setiyle *Anoxybacillus* türlerinin en az 0,0002 ng/mL'lık DNA'ları, BgyrB-f/r1, P-BgyrB1 primer/prob setiyle, *Bacillus* türlerinin minimum 0,002 - 0,0002 ng/mL DNA'ları GgyrB-f/r1, P-GgyrB1 primer/prob setiyle ise *Geobacillus* türlerinin en az 0,0002 ng/mL DNA'ları (Ct: 36,11-33,21) tespit edilebilmiştir. Tez verilerindeki hassasiyet limitleri Rueckert ve arkadaşlarının (2006) bulduğu sonuçlara nazaran daha yüksek bulunmakla birlikte, tezde cins bazında ayırım sağlanabilirken, Rueckert ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları araştırmada sadece *A. flavithermus*, *G. stearothermophilus*, *B. licheniformis* ve *B. subtilis* türlerinde bulunan *spo0A* gen bölgelerini kullanarak primerleri kümülatif olarak tasarladıklarından *Anoxybacillus*, *Geobacillus* ve *Bacillus* cinslerinin ayırımının erime noktası sıcaklık farklılığından ötürü yapılabildiğini belirtmişlerdir. Yeni geliştirilen bu qRT-PCR yöntemiyle birlikte ise bu duruma gerek kalmamış, tek bir erime sıcaklığında (58°C) üç farklı cinse yönelik ayırım yapılabilmektedir.

Tekli qRT-PCR reaksiyonlarında amplifikasyon verimliliğini belirlemek adına, 7 temsilci basilin 200 ng/μl-2 fg/μl aralığındaki konsantrasyonlarla 4 primer/prob çiftiyle elde edilen Ct değerleri kullanılarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş ve E değeri, $E = [10(-1/\text{slope})] - 1$ formülüyle hesaplanmıştır. Mevcut literatürde, grafiklerde slope (eğim) değerinin -3,1 ile -3,6 arasında olması, yüksek bir qRT-PCR etkinliğinin (%90-%110 etkinlik) olduğuna işaret etmektedir. Buna göre tez çalışmasının lineer grafik denklemlerinde saptanan E ve eğim değerlerinin sırasıyla %62 ile %120 ve -2,9080 ile -4,0370 aralıklarında oldukları görülmüştür. Eğrilerin R^2 değerleri oldukça yüksek olmasına karşın hassasiyetin kabul gören aralıklarının kısmen dışında fakat hedefe yakın eğim ve E değerleri tespit edilebilmiştir. Ancak literatürde kabul gören bu durum genellikle tür tespiti için spesifik grafiklerde beklenen aralıklarda hesaplanabilirken, öneride hedeflenen ve çok sayıda türün tespit edildiği cins spesifik grafiklerde ise hedef aralığı tam olarak yakalanamamaktadır. Bu durum cins spesifik primer/prob tasarımlarında çok sayıda türün teşhisi amacıyla dejenere primer kullanımıyla açıklanmaktadır (Yu vd. 2005, Lim vd. 2011). Buna karşın, tekli qRT-PCR reaksiyonlarında hedeflenen hassasiyet değerlerine yaklaşılmış ve cins temelli primer/probların her durumda çalışılan cinse ait ilgili türü teşhis edebildiği gösterilmiştir.

Hızlı tespit yöntemleri, özellikle gıda endüstrisinde, çiğ ve işlenmiş gıdalardaki patojenlerin varlığını anında ya da kısa sürede tespit edebilme kapasitelerine sahip oldukları için önemlidirler (Law vd. 2015). Geçmiş çalışmalara baktığımızda, mikroorganizma tespitinde özellikle patojeniteye sahip bakterilerin üzerine yoğunlaşıldığı görülmektedir (Oliver vd. 2005, Fusco ve Quero 2014, Stingl vd. 2021, Costa vd. 2022). İnsan sağlığını tehdit eden durumların önüne geçme amacıyla hızlı bir şekilde tespit yöntemlerinin araştırılması ve geliştirilmesi de önemi bir yaklaşım olup, ortamda bulunan bakterilerin oluşturduğu biyofilm benzeri hayatta kalma stratejilerinin oluşturduğu mikrohabitatların diğer bakterilere de bir savunma kalkanı, bir rezervuar görevi görme olasılığı da bulunmaktadır. Tez çalışmaları kapsamında bu süt ve süt ürünlerinde sıklıkla gözlenen bakterilerin sahip olduğu biyofilm oluşturma ve spor üretme yetenekleri onların esas seçim nedenleri arasındadır. Söz konusu cinsler içerisindeki patojen *B. cereus* grubuna dahil bakteriler (Henderson vd.1995, Chen ve Tsen 2002) sahip oldukları bu özellikler sebebiyle hızlı tespit yöntemleri ve kitleri içerisinde yer

almalarına karşın, diğer sporlu basillerin tespit edilmesine yönelik ayırt edici derinlikte bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Özellikle sahip oldukları spor oluşturma yeteneklerinden kaynaklı standart DNA izolasyon yöntemlerine karşı dirençli bir yapı oluşturdıkları göz önünde bulundurulduğunda bu durum daha da karmaşık bir hal almaktadır. Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen qRT-PCR tespit yöntemi için, spor yapılarının harici bir DNA izolasyon kitine gerek duyulmaksızın her laboratuvarında bulunan cihazlarla yapılabilecek izolasyon olanakları önünde bulundurularak iki yöntem seçilmiş ve birbirleriyle karşılaştırılarak en verimli yöntem belirlenmiştir. Elde edilen qRT-PCR bulguları ışığında, sonikatör gerektiren yöntemin aksine kompleks bir cihaz gerektirmeden, her laboratuvarında bulunabilecek cihazlarla yapılabilecek boncuk ile vorteksleme yönteminin, süt varlığında yüksek miktarda spor/hücrel DNA ekstraksiyonu için muhtemeş, kolay ve yüksek hassasiyette qRT-PCR sonuçları sağlayabildiği görülmüştür.

Karaca ve arkadaşlarının (2022a) yürüttüğü çalışmada, SYBR Green kullanılarak *G. thermodenitrificans* DSM 465 ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* F81 türlerine ait hücreler, sporlardan sonikasyonla DNA izolasyonu sonrasında türe özgü primerlerle qRT-PCR ile 10^2 – 10^8 KOB/mL oranında tespit edilebilmiştir. Tez çalışması dahilinde ise temsilci türlerle yürütülen ve elde edilen tespit değerleri (*Anoxybacillus* için 10^3 , *Geobacillus* için 10^5 , *Bacillus* için ise 10^2 KOB/mL) daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, bu çalışmada yalnızca tek bir türe odaklanılmayıp, farklı cinslere yönelik primer ve prob tasarımı gerçekleştirildiğinden, hassasiyet farklılıklarının gözlenmesi beklenebilir bir durumdur. Başka bir araştırma olan, Oliwa-Stasiak ve arkadaşlarının (2011) gerçekleştirdiği çalışmada ise *B. cereus* grubu içerisinde yer alan üyelerin tespitine yönelik bir qRT-PCR yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem ile birlikte 10^4 KOB/mL değeriyle *B. weihenstephanensis* ve *B. pseudomycoides* türlerinin ayrımını sağlayabilmişlerdir.

Tezde elde edilen *Bacillus* cinsine özgü DNA izolasyon sonuçları incelendiğinde, nanodrop ölçümlerinde diğer türlerden elde edilen DNA konsantrasyonları benzer olsa da qRT-PCR'dan elde edilen Ct değerleri ve KOB/mL tespit limitleri arasında farklılıklar gözlenmiştir. Bu durum, kullanılan izolasyon yöntemlerinin cins bazında farklı sonuçlar

verdiğini ve mezofilik *Bacillus* spor formlarının, termofilik *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* sporlarından yapısal olarak farklı olduğu ile açıklanabilmiştir.

Ayrıca, Karaca ve arkadaşlarının (2022a) yaptığı çalışmadan farklı olarak kullanılan primer ve prob tasarımlar, cins bazında tespiti olanak sağlayacak şekilde çok sayıda türün birarada hizalanması sonucu görülen benzer dizilerin yanı sıra dejenere bazların da kullanımını gerektirmiştir. Dejenere baz sayısı (primer dizilerinde en fazla 5, prob dizilerinde ise en fazla 3) göz önünde bulundurulduğunda 10^3 KOB/mL farklılığının bulunması beklenen bir durumdur. Her ne kadar başka bir benzer çalışma olan Rueckert ve arkadaşlarının (2006) SYBR green ile yaptığı tür tespitine yönelik (*Geobacillus* ve *Anoxybacillus*) çalışma sonucunda, Taqman prob kullanımının daha spesifik sonuçlar elde edilmesini sağlayacağı söylenmiş olsa da, bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen yöntemler ile bu durumun cins bazında yapılan tespitte, geçerli olmadığı söylenebilir. Rueckert ve arkadaşları (2006) SYBR Green'i maliyeti düşürmek için çalışmaya içerisine dahil etmişler, ancak kontaminasyon sebebiyle oluşabilecek potansiyel yanlış negatifleri, erime eğrisi yoluyla amplifikasyon ürünlerini ayırt ederek elimine etmişlerdir. Bu çalışmada ise, Taqman prob kullanıldığı için buna gerek kalmaksızın, daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmiştir.

Üç farklı primer prob çiftinin beraber olarak kullanıldığı çoklu qRT-PCR reaksiyonlarında amplifikasyon verimliliğini belirlemek adına, tekli reaksiyonlardakine benzer kantitatif grafikler çizilmiş, slope (eğim), E değeri ve R^2 değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen E değerleri her üç temsilci basil cinsi için de %24 ve %113 aralığında, R^2 değerleri ise 0,89 ve 0,99 aralığında olmakla beraber türe göre değişkenlik göstermektedir. Tek primer ve prob seti içeren reaksiyonlara oranla, E ve R^2 değerleri belirgin bir değişkenlik göstermekte olup, bu durum üç farklı cinse özgü tasarlanan primer ve prob setlerinin reaksiyon karışımı içerisinde birlikte bulunmasıyla açıklanabilir. Bu amaçla belirlenen tez çalışmaları kapsamında, süt ve süt ürünleri endüstrisinde sorunlara sebep olan sporlu basillerin tespitine dayalı qRT-PCR tabanlı bir kit için yöntem optimizasyonu başarılı bir şekilde yapılmıştır. Kuisine ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmada *Anoxybacillus* için *spo0A* gen bölgesine spesifik primer ve prob tasarımıyla, *spo0A* genindeki değişkenliği *Geobacillus* cinsi içerisinde değerlendirerek, taksonomik

amaçlar için kullanılabilirliğini kanıtlamışlardır. Ayrıca, Ohkubo ve arkadaşlarının (2019) yaptıkları *A. flavithermus* ve *G. stearothermophilus* için tür spesifik qRT-PCR düzeneğinde *spo0A* genini temel almaları da bu durumu kanıtlar niteliktedir. Bunların dışında sporulasyon aşamasında benzer göreve hizmet eden genlerin, yakın cinsler arasında bu kadar farklılık göstermesi ilgi çekici bulunmuştur.

Fernández-No ve arkadaşlarının (2010) gerçekleştirdiği çalışmada, 16S rRNA gen bölgesi kullanılarak, *B. cereus*, *B. licheniformis* ve *B. subtilis* türlerinin tespiti başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve gıda örneklerinde bu *Bacillus* türlerini 165 KOB/g oranında tespit edebilmişlerdir. Ancak bu çalışma da tez kapsamında ele alındığı şekliyle spor veya vejetatif hücre ayrımı yapılmamıştır. Ayrıca, uygulanan yöntemin hassasiyet limiti, tez kapsamında elde edilen değerlerden daha düşüktür. Kullanılan gen bölgesinin bu farkta önemli bir rol oynadığı göz önünde bulundurulduğunda, tez çalışmasından elde edilen sonuçların bu durumla uyumlu olduğu görülmektedir.

Çalışılan diğer bir gen bölgesi olan *gyrB*, pek çok housekeeping gende görüldüğü üzere genellikle tüm genomda yalnızca bir veya iki kopya olarak bulunmaktadır (Liu vd. 2022). Mikrobiyal çeşitliliğin tespitinde, yüksek kopya sayılarına sahip genlere kıyasla düşük kopya sayısına sahip genlerin kullanımı, farklı gen kopyalarındaki tek nükleotid polimorfizmlerinden (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) kaynaklanan çeşitliliğin yüksek şekilde tahmin edilmesini önleyerek daha doğru bir çeşitlilik analizi yapılmasını sağlayabilmektedir (Liu vd. 2022). Çalışma kapsamında seçilen *gyrB* geniyle ilgili literatüre bakıldığında, Lee ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışma dikkat çekmektedir. Öncelikle *Pseudomonas aeruginosa* türünün aerosol halde ortaya salınımını ve daha sonra jelatin filtre kullanarak ortamdan toplanmasını takiben *gyrB* bazlı qRT-PCR aşamaları gerçekleştirilmiştir (Lee vd. 2011). Araştırma bulgularında seçilen gen bölgesine spesifik tasarlanan qRT-PCR çalışmasının, 10^4 - 10^5 KOB/mL oranında tespit yapılabildiği ifade edilmiştir (Lee vd. 2011). qRT-PCR ile ilgili tespit yapılan diğer çalışmalarda ise (Ruan vd. 2017) *gyrB* geninin uygunluğu tıpkı çoklu reaksiyonlarda gözlenen şekilde kullanılmaya uygun bir aday gen olduğuna işaret etmektedir.

qRT-PCR ile ilgili tespit araştırmalarının yapıldığı literatüre bakıldığında (Fernández-No vd. 2010, Lee vd. 2011, Oliwa-Stasiak vd. 2011, Ruan vd. 2017) hücrelerden DNA izolasyonlarının ticari kitler kullanılarak gerçekleştirildiği görölmüştür. Bu durum qRT-PCR etkinliğini büyük oranda etkilemekte olup, ek olarak ölü hücrelerden gelen DNA'lar ile ilgili ilave bir ayırım yapılmadığı da görölmüştür. Süt ortamında bu çalışma kapsamında belirlenen kantifikasyon grafiklerinden teorik koloni sayımları belirlenmekle beraber, benzer şekilde Rueckert ve arkadaşlarının (2006) söz ettiği şekilde çeşitli nedenlerle eşdeğer qRT-PCR yanıtını daha az veya daha fazla temsil edebilmektedir. Bir bakteri költürü içerisindeki gen ve hücre sayısı arasındaki korelasyon, büyüme fazına bağlı olarak değişiklik gösterdiği bilinen bir fenomendir (Ludwig ve Schleifer 2000). Böylelikle Rueckert ve arkadaşlarının (2006) söz ettiği bu durum çalışma kapsamından elde edilen verilerle uyumlu bulunmuştur. Ayrıca ölü hücrelerden gelebilecek DNA'ları Dnaz I kullanılarak eliminasyonu bu aşamada önemli olmakla beraber, elde edilen veriler çerçevesinde kullanılan yöntem sebebiyle ölü hücrelerden gelen DNA'ların tamamen tespiti mümkün olamamaktadır.

qRT-PCR ile yapılan teorik sayım ile költürel sayım arasındaki korelasyonu belirleyebilmek için, süte aşılan her bir vejetatif hücre ve spor), konsantrasyonundan TSA (Tryptik Soy Agar) besiyeriyle paralel olarak BCP (ISO 27265:2009| IDF/RM 228:2009 standardında yer alır) besiyeri kullanılmış olup, bu sonuçlara göre cins bazında költür temelli koloni oluşturma birimlerinde farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılıklar arasınada *Anoxybacillus* cinsine mensup kolonilerin TSA besiyerinde gelişmesine karşılık BCP besiyerinde koloni oluşumu gözlenmemiş olması gelmektedir. *Geobacillus* ve *Bacillus*'a ait türlerde ise anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Spor yapılarının çimlenme durumlarında değişkenlik gösterdiği göz önünde bulundurulduğunda ve uygun koşulların oluşması durumunda dahi spor formundan vejetatif duruma geçemeyebildikleri ve buna ek olarak VBNC (viable but not culturable) durumundaki bakterilerin koloni oluşturma birimlerinin gözlenebilmesi için, çoğu ISO standardı da dahil olmak üzere ön zenginleştirme olarak belirtilen basamağın araştırmalarda kullanılmasına gerek duyulduğu bilinmektedir (Parichehr vd. 2019, Wang vd. 2023). Yine de sadece sporlarla yapılacak bu ön zenginleştirme durumunda dahi istenilen çimlenme sonucu alınamayabilmektedir. Bundan dolayı moleküler yaklaşımlar daha

doğru bir sonuç sağlamaktadır. İçeriği sebebiyle, TSA besiyerine göre daha kısıtlı bir yapıya sahip olan BCP besiyerinin, farklı cinslerde farklı sonuçlar vermesi, söz konusu ISO standardında yer alan besiyeri içeriğinin tekrar gözden geçirilmesi gerekliliğini de gözler önüne sermektedir.

Sonuç olarak;

Günümüzde, 2020 yılında başlayan COVID-19 pandemisinin ardından neredeyse her tahlil ve tespit laboratuvarında bir zorunluluk haline gelen Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) cihazlarının varlığı, bu çalışmanın temel ilham kaynağını oluşturmuştur. Pandeminin sona ermesiyle âtıl kalma riski taşıyan bu cihazların kullanım alanlarını genişletmek amacıyla yola çıkılan bu inovatif çalışmada, bakterilerin en dirençli yapıları olan sporların doğru izolasyon teknikleriyle elde edilen DNA'larının qRT-PCR ile başarıyla tespit edilebileceği gösterilebilmiştir. Bu doğrultuda, literatürde ilk kez bu kadar geniş bir sporlu basil grubunu kapsayan, yenilikçi bir kit prototipi geliştirilebilmiştir.

Böylece tek bir mütipleks qRT-PCR reaksiyonu ile *Anoxybacillaceae* (*Anoxybacillus*, *Anoxybacteriodes*, *Geobacillus*, *Parageobacillus* ve *Thermaerobacillus* cinsleri) ve *Bacillaceae* (*Bacillus*) familyalarından 6 farklı cinse ait üyeler spesifik olarak tespit limitleri doğrultusunda ve yüksek etkinlikte teşhis edebilen bir prototip yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yaklaşımın ileride süt ve süt ürünleri ile ilişkili endüstrilerde önemli bir kullanım potansiyeli oluşturması beklenmektedir.

Geliştirilen yöntem, yalnızca tekli primer ve prob setlerini değil, aynı zamanda birden fazla primer ve probun bir arada uyumlu çalışmasını da sağlamakta ve tek bir reaksiyonla birden fazla sporlu basil cinsini tespit edebilme pratikliği sunmaktadır. Bu özgün tasarımı yaklaşım, kit üretiminde maliyeti düşürmekle kalmayıp, içerdiği yenilikçi planlama sayesinde özellikle süt ve süt ürünleri üreticileri için daha yüksek kâr potansiyeli sunmaktadır.

Prototipin optimizasyon sürecinin tamamlanmasının ardından, patent başvurusunun yapılması ve üretim için sanayi ortaklıklarının kurulması hedeflenmektedir. Özellikle süt endüstrisinde sporlu basillerin kontaminasyonunun tespiti gibi kritik bir sorunu çözmek için geliştirilen bu yöntem, değişmesi gerektiği gözlenen ISO standartlarına da yeni çözüm öneri sunmaktadır. Ayrıca, bu sistemin, diğer mikroorganizma cinslerinin ve/veya türlerinin tekli veya çoklu tespiti için yapılacak optimizasyon çalışmaları için de bir model oluşturarak öncülük edebileceği öngörülmektedir. Bu kapsamlı ve yenilikçi yaklaşım hem bilimsel hem de endüstriyel açıdan öncül bir çalışma mahiyeti taşımaktadır.



KAYNAKLAR

- Adam, K. H., Brunt, J., Brightwell, G., Flint, S. H. and Peck, M. W. 2011. Spore germination of the psychrotolerant, red meat spoiler, *Clostridium frigidicarnis*. Letters in Applied Microbiology, 53(1), 92-97.
- Adékambi, T., Drancourt, M. and Raoult, D. 2009. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. Trends in Microbiology, 17(1), 37-45.
- Aebisher, D., Bartusik, D. and Tabarkiewicz, J. 2017. Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine. Biomedicine & Pharmacotherapy, 85, 434-443.
- Ahmad, S., Scopes, R. K., Rees, G. N. and Patel, B. K. 2000. *Saccharococcus caldxylosilyticus* sp. nov., an obligately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(2), 517-523.
- Alsufyani, A. T. 2018. Biocide inhibition of microbial sulfur reduction in fracking fluids. Doktora tezi, University of British Columbia, İngiltere
- Aliyu, H., Lebre, P., Blom, J., Cowan, D. and De Maayer, P. 2016. Phylogenomic re-assessment of the thermophilic genus *Geobacillus*. Systematic and Applied Microbiology, 39(8), 527-533.
- Aliyu, H., Lebre, P., Blom, J., Cowan, D. and De Maayer, P. 2018. Corrigendum to "Phylogenomic re-assessment of the thermophilic genus *Geobacillus*"[Syst. Appl. Microbiol. 39 (2016) 527–533]. Systematic and Applied Microbiology, 41, 529-530.
- Andersson, A., Ronner, U. and Granum, P. E. 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*. International Journal of Food Microbiology, 28(2), 145-155.
- Anonymous. 2001a. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 50, part 6 of the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51:267-268.
- Anonymous. 2001b. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 51, part 2 of the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51:795-796.
- Anonymous. 2001c. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 51, part 5 of the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51:1947-1948
- Anonymous. 2002. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 51, part 6 of the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52:5-6.
- Anonymous. 2003. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 52, part 6 of the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53:375-376.

- Atanassova, M., Derekova, A., Mandeva, R., Sjöholm, C. and Kambourova, M. 2008. *Anoxybacillus bogrovensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Dolni Bogrov, Bulgaria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(10), 2359-2362.
- Baker, G. C., Smith, J. J. and Cowan, D. A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541-555.
- Banat, I. M., Marchant, R. and Rahman, T. J. 2004. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2197-2201.
- Barnes, M. H., LaMarr, W. A. and Foster, K. A. 2003. DNA gyrase and DNA topoisomerase of *Bacillus subtilis*: expression and characterization of recombinant enzymes encoded by the *gyrA*, *gyrB* and *parC*, *parE* genes. *Protein Expression and Purification*, 29(2), 259-264.
- Batchelor, M. D. 1919. Aerobic spore-bearing bacteria in the intestinal tract of children. *Journal of Bacteriology*, 4(1), 23-34.
- Bavykin, S. G., Lysov, Y. P., Zakhariev, V., Kelly, J. J., Jackman, J., Stahl, D. A. and Cherni, A. 2004. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3711-3730.
- Baylis, C. L. 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 293-307.
- Beacon Designer, Premier Biosoft Interpairs, Palo Alto, CA, https://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/index.html Son Erişim Tarihi: Kasım 2024.
- Beck, K. L. and Coad, J. 2017. Dairy product (calcium) consumption and iron nutrition. In *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease* (pp. 149-160). Academic Press.
- Belduz, A. O., Dulger, S., and Demirbag, Z. 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1315-1320.
- Bénézech, T. and Faille, C. 2018. Two-phase kinetics of biofilm removal during CIP. Respective roles of mechanical and chemical effects on the detachment of single cells vs cell clusters from a *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *Journal of Food Engineering*, 219, 121-128.
- Berendsen, E. M., Zwietering, M. H., Kuipers, O. P. and Wells-Bennik, M. H. 2015. Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiology*, 45, 18-25.

- Berliner, E. 1915. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. Zeitschrift für Angewandte Entomologie Berlin; 2:29-56.
- Bird, T. H., Grimsley, J. K., Hoch, J. A. and Spiegelman, G. B. 1993. Phosphorylation of Spo0A activates its stimulation of in vitro transcription from the *Bacillus subtilis* *spoIIG* operon. Molecular Microbiology, 9(4), 741-749.
- Blocher, J. C. and Busta, F. F. 1983. Bacterial spore resistance to acid. Food Technology (USA).
- Bocchetta, M., Gribaldo, S., Sanangelantoni, A. and Cammarano, P. 2000. Phylogenetic depth of the bacterial genera Aquifex and Thermotoga inferred from analysis of ribosomal protein, elongation factor, and RNA polymerase subunit sequences. Journal of Molecular Evolution, 50, 366-380.
- Borukhov, S. and Nudler, E. 2003. RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. Current Opinion in Microbiology, 6(2), 93-100.
- Bottone, E. J. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Clinical Microbiology Reviews, 23(2), 382-398.
- Branda, S. S., González-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R. and Kolter, R. 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(20), 11621-11626.
- Branquinho, R., Sousa, C., Osorio, H., Meirinhos-Soares, L., Lopes, J., Carriço, J. A., Busse, H., Abdulmawjood, A., Klein, G., Kampfer, P., Pintado, M.E. and Peixe, L. V. 2014. *Bacillus invictae* sp. nov., isolated from a health product. International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology, 64(Pt_11), 3867-3876.
- Bredholt, S., Sonne-Hansen, J., Nielsen, P., Mathrani, I. M. and Ahring, B. K. 1999. *Caldicellulosiruptor kristjanssonii* sp. nov., a cellulolytic, extremely thermophilic, anaerobic bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 49(3), 991-996.
- Bremer, P. J., Fillery, S. and McQuillan, A. J. 2006. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. International Journal of Food Microbiology, 106(3), 254-262.
- Brill, J. A., and Wiegel, J. 1997. Differentiation between spore-forming and asporogenic bacteria using a PCR and Southern hybridization based method. Journal of Microbiological Methods, 31(1-2), 29-36.
- Brown, D. P., Ganova-Raeva, L., Green, B. D., Wilkinson, S. R., Young, M. and Youngman, P. 1994. Characterization of *spo0A* homologues in diverse *Bacillus* and *Clostridium* species identifies a probable DNA-binding domain. Molecular Microbiology, 14(3), 411-426.
- Bryanskaya, A. V., Rozanov, A. S., Slynko, N. M., Shekhovtsov, S. V. and Peltek, S. E. 2015. *Geobacillus icigianus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a

- hot spring. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65(Pt_3), 864-869.
- Burgess, S. A., Lindsay, D. and Flint, S. H. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. International Journal of Food Microbiology, 144(2), 215-225.
- Burgess, S. A., Flint, S. H. and Lindsay, D. 2014. Characterization of thermophilic bacilli from a milk powder processing plant. Journal of Applied Microbiology, 116(2), 350-359.
- Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. Biological Reviews, 73(3), 203-266.
- Cavalier-Smith, T. 2006. Rooting the tree of life by transition analyses. Biology direct, 1, 1-83.
- Cavalier-Smith, T. and Chao, E. E. Y. 2020. Multidomain ribosomal protein trees and the planctobacterial origin of neomura (eukaryotes, archaeobacteria). Protoplasma, 257(3), 621-753.
- Ceuppens, S., Boon, N., Rajkovic, A., Heyndrickx, M., Van de Wiele, T., and Uyttendaele, M. 2010. Quantification methods for *Bacillus cereus* vegetative cells and spores in the gastrointestinal environment. Journal of Microbiological Methods, 83(2), 202-210.
- Chanda, K. and MM, Brindha. 2018. Biosensors for pathogen surveillance. Environmental Chemistry Letters, 16, 1325-1337.
- Checinska, A., Paszczynski, A. and Burbank, M. 2015. *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival, Annual Review of Food Science and Technology, 6, 351-369.
- Chen, L. D. R. M., Daniel, R. M. and Coolbear, T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. International Dairy Journal, 13(4), 255-275.
- Cheng, J. H., and Sun, D. W. 2015. Recent applications of spectroscopic and hyperspectral imaging techniques with chemometric analysis for rapid inspection of microbial spoilage in muscle foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 14(4), 478-490.
- Chester, F. D. 1901. A manual of determinative bacteriology. Macmillan Company.
- Christie, G. and Setlow, P. 2020. *Bacillus* spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn. Cellular Signalling, 74, 109729.
- Chun, J. and Bae, K. S. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. Antonie Van Leeuwenhoek, 78, 123-127.
- Chuvochina, M., Mussig, A. J., Chaumeil, P. A., Skarszewski, A., Rinke, C., Parks, D. H. and Hugenholtz, P. 2023. Proposal of names for 329 higher rank taxa defined in the Genome Taxonomy Database under two prokaryotic codes. FEMS Microbiology Letters, 370, fnad071.

- Cihan, A. C., Ozcan, B. and Cokmus, C. 2011. *Anoxybacillus salavatliensis* sp. nov., an α -glucosidase producing, thermophilic bacterium isolated from Salavatli, Turkey. *Journal of Basic Microbiology*, 51(2), 136-146.
- Cihan, A.C., Cokmus, C., Koc, M., and Ozcan, B. 2014a. *Anoxybacillus calidus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from soil near a thermal power plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64:211-219.
- Cihan, A. C., Koc, M., Ozcan, B., Tekin, N. and Cokmus, C. 2014b. *Thermolongibacillus altinsuensis* gen. nov., sp. nov. and *Thermolongibacillus kozakliensis* sp. nov., aerobic, thermophilic, long bacilli isolated from hot springs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_1), 187-197.
- Cooney, P.H. and Freese, E. 1976. Commitment to sporulation in *Bacillus megaterium* and uptake of specific compounds. *Microbiology*, 95(2), 381-390.
- Cortesao, M., Fuchs, F. M., Commichau, F. M., Eichenberger, P., Schuerger, A. C., Nicholson, W. L., Setlow, S. and Moeller, R. 2019. *Bacillus subtilis* spore resistance to simulated Mars surface conditions. *Frontiers in Microbiology*, 10, 333.
- Cowan, S. T. 1968. A dictionary of microbial taxonomic usage. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Cohn, F. 1875. Untersuchungen über Bakterien. In: Cohn F (eds), Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1 (Heft 2), 1872, Max Müller, Breslau, p. 127-224.
- Coorevits, A., Dinsdale, A. E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A. and Logan, N. A. 2012. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt7), 1470-1485.
- Cozzarelli, N. R. 1980. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science*, 207(4434), 953-960.
- Crawshaw, A. D., Serrano, M., Stanley, W. A., Henriques, A. O. and Salgado, P. S. 2014. A mother cell-to-forespore channel: current understanding and future challenges. *FEMS Microbiology Letters*, 358(2), 129-136.
- Čuboň, J., Haščík, P. and Kačániová, M. 2012. Evaluation of raw materials and foodstuffs of animal origin (Hodnotenie surovín a potravín živočíšneho pôvodu). Nitra, Slovak Republic: Slovak University of Agriculture in Nitra, 381 p. ISBN-13: 978-80-552-0870-1 (Slovakça)
- Çağlayan, M. and Bilgin, N. E. 2011. Cloning and sequence analysis of novel DNA polymerases from thermophilic *Geobacillus* species isolated from hot springs in Turkey: Characterization of a DNA polymerase I from *Geobacillus kaue* strain NB. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165, 1188-1200.

- Davis, C. 2014. Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 9-17.
- Da Mota, F. F., Gomes, E. A., Paiva, E., Rosado, A. S. and Seldin, L. 2004. Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene. *Letters in Applied Microbiology*, 39(1), 34-40.
- De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Vanhoutte, T., Heyrman, J., Logan, N.A. and De Vos, P. 2004. *Anoxybacillus contaminans* sp. nov. and *Bacillus gelatini* sp. nov., isolated from contaminated gelatin batches. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:941-946.
- De Hoon, M. J., Eichenberger, P., and Vitkup, D. 2010. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Current biology*, 20(17), R735-R745.
- Den Besten, H. M., Wells-Bennik, M. H. and Zwietering, M. H. 2018. Natural diversity in heat resistance of bacteria and bacterial spores: impact on food safety and quality. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9(1), 383-410.
- Depince-Berger, A. E., Aanei, C., Iobagiu, C., Jeraiby, M. and Lambert, C. 2016. New tools in cytometry. *Morphologie*, 100(331), 199-209.
- Derekova, A., Sjöholm, C., Mandeva, R. and Kambourova, M. 2007. *Anoxybacillus rupiensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria). *Extremophiles*, 11(4), 577-583.
- Dhakal, R., Chauhan, K., Seale, R. B., Deeth, H. C., Pillidge, C. J., Powell, I. B., Craven, H. and Turner, M. S. 2013. Genotyping of dairy *Bacillus licheniformis* isolates by high resolution melt analysis of multiple variable number tandem repeat loci. *Food Microbiology*, 34(2), 344-351.
- Di Pinto, A., Bonerba, E., Bozzo, G., Ceci, E., Terio, V. and Tantillo, G. 2013. Occurrence of potentially enterotoxigenic *Bacillus cereus* in infant milk powder. *European Food Research and Technology*, 237(2), 275-279.
- Doan, T., Morlot, C., Meisner, J., Serrano, M., Henriques, A. O., Moran Jr, C. P. and Rudner, D. Z. 2009. Novel secretion apparatus maintains spore integrity and developmental gene expression in *Bacillus subtilis*. *PLoS genetics*, 5(7), e1000566.
- Doyle, C. J., Gleeson, D., Jordan, K., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. and Cotter, P. D. 2015. Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 197, 77-87.
- Drancourt, M. and Raoult, D. 2002. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1333-1338.
- Dulger, S., Demirbag, Z. and Belduz, A. O. 2004. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1499-1503.

- Durak, M. Z., Fromm, H. I., Huck, J. R., Zadoks, R. N. and Boor, K. J. 2006. Development of molecular typing methods for *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. isolated from fluid milk products. *Journal of Food Science*, 71(2), M50-M56
- Ehling-Schulz, M., Messelhäuser, U. and Granum, P. E. 2011. *Bacillus cereus* in milk and dairy production. Rapid Detection, Characterization, and Enumeration of Foodborne Pathogens, 275-289.
- Eijlander, R. T., van Hekezen, R., Bienvenue, A., Girard, V., Hoornstra, E., Johnson, N. B., Meyer, R., Wagendorp, A., Walker, C. D. and Wells-Bennik, M. H. 2019. Spores in dairy—new insights in detection, enumeration and risk assessment. *International Journal of Dairy Technology*, 72(2), 303-315.
- Errington, J. 1990. Gene cloning techniques. *Molecular Biological Methods for Bacillus*.
- Etoa, F. X. and Michiels, L. 1988. Heat-induced resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Letters in Applied Microbiology*, 6(3), 43-45.
- Euzeby, J. 2004a. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 53, part 5 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:3-6.
- Euzeby, J. 2004b. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 54, part 3 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:1427-1428.
- Euzeby, J. 2005a. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 54, part 6 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:551-554.,
- Euzeby, J. 2005b. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 54, part 5 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:3-5.
- Euzeby, J. 2006a. Validation list no. 109. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:925-927.
- Euzeby, J. 2006b. Validation list no. 110. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:1459-1460
- Euzeby, J. 2006c. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 56, part 7 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:2251-2252
- Euzeby, J. 2006d. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 56, part 8 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:2509-2510.
- Euzeby, J. 2008. Validation list no. 119. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58:1-2.

- Euzeby, J. 2009. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 58, part 10 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59:3-4.
- Euzeby, J. 2011a. Validation list no. 138. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61:475-476.
- Euzeby, J. 2011b. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 61, part 1 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61:701-702.
- Euzeby, J. 2011c. Validation list no. 140. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61:1499-1501.
- Euzeby, J. 2011d. Validation list no. 141. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61:2025-2026.
- Euzeby, J. 2012a. Validation list no. 144. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62:473-475
- Euzeby, J. 2012b. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 62, part 7 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62:2313-2314
- Euzeby, J. 2013. Validation list no. 151. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63:1577-1580.
- Faille, C., Benezech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., Ronse, A. and Slomianny, C. 2014. Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. *Food Microbiology*, 40, 64-74.
- Farrow, J. A., Wallbanks, S. and Collins, M. D. 1994. Phylogenetic interrelationships of round-spore-forming bacilli containing cell walls based on lysine and the non-spore-forming genera *Caryophanon*, *Exiguobacterium*, *Kurthia*, and *Planococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(1), 74-82.
- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R. and Youngman, P. 2000. The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 8063-8068.
- Filippidou, S., Jaussi, M., Junier, T., Wunderlin, T., Jeanneret, N., Palmieri, F. and Junier, P. 2016. *Anoxybacillus geothermalis* sp. nov., a facultatively anaerobic, endospore-forming bacterium isolated from mineral deposits in a geothermal station. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(8), 2944-2951.

- Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J. and Crawford, R. 2001. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel, *Journal of Applied Microbiology*, 90(2), 151-157.
- Flint, S., Gonzaga, Z. J., Good, J. and Palmer, J. 2017. *Bacillus thermoamylovorans*—A new threat to the dairy industry—A review *International Dairy Journal*, 65, 38-43.
- Flügge, C. 1886. *Die Mikroorganismen Teil 1, Auflage 3.* F.C.W. Vogel, Leipzig,
- Fraisse, A., Coudray-Meunier, C., Martin-Latil, S., Hennechart-Collette, C., Delannoy, S., Fach, P. and Perelle, S. 2017. Digital RT-PCR method for hepatitis A virus and norovirus quantification in soft berries. *International Journal of Food Microbiology*, 243, 36-45.
- Frankland, G. C. and Frankland, P. F. 1887. XI. Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.(B.)*, (178), 257-287.
- Fritze, D. 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, 94(11), 1245-1248.
- Frolov, E. N., Lebedinsky, A. V., Elcheninov, A. G. and Kublanov, I. V. 2023. Taxonomic proposal for a deep branching bacterial phylogenetic lineage: transfer of the family Thermodesulfobiaceae to Thermodesulfobiales ord. nov., Thermodesulfobiia classis nov. and Thermodesulfobiota phyl. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 46(1), 126388.
- Food and Drug Administration 2011. Grade “A” Pasteurised Milk Ordinance. In 2011 Revision. US department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, USA.
- Fortina, M. G., Mora, D., Schumann, P., Parini, C., Manachini, P. L. and Stackebrandt, E. 2001. Reclassification of *Saccharococcus caldoxylosilyticus* as *Geobacillus caldoxylosilyticus* (Ahmad et al. 2000) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), 2063-2071.
- Fukushima, M., Kakinuma, K. and Kawaguchi, R. 2002. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2779-2785.
- Galperin, M. Y. 2006. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4169-4182.
- Galperin, M. Y., Mekhedov, S. L., Puigbo, P., Smirnov, S., Wolf, Y. I. and Rigden, D. J. 2012. Genomic determinants of sporulation in Bacilli and Clostridia: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental Microbiology*, 14(11), 2870-2890.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H. and Nash, H. A. 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(11), 3872-3876.

- Gerhardt, P. and Marquis, R.E. 1989. Spore thermoresistance mechanisms. In Regulation of Prokaryotic Development. Smith, I., Slepecky, R.A. and Setlow, P. (eds.) pp. 43–63. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Gleeson, D., O'Connell, A. and Jordan, K. 2014. Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. Irish Journal of Agricultural and Food Research, 217-227.
- Golovacheva, R. S., Loginova, L. G., Salikhov, T. A., Kolesnikov, A. A. and Zaitseva, G. N. 1991. *Bacillus thermocatenulatus* sp. nov. Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB, List, (36), 178-179.
- Gottheil, O. 1901. Botanische Beschreibung einiger bodenbakterien. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II; 7:680-691.
- Govan, V. A., Allsopp, M. H. and Davison, S. 1999. A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus* larvae. Applied and Environmental Microbiology, 65(5), 2243-2245.
- Gowen, A. A., Feng, Y., Gaston, E. and Valdramidis, V. 2015. Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. Talanta, 137, 43-54.
- Gracia, M. and Diaz, M. 2011. Cleaning in place. Comprehensive Biotechnology. 2:983-997
- GraphPad Prism, Versiyon 10.4.0 for Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com, Son Erişim Tarihi Aralık 2024
- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N. and Chen, S. 2020. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(11), 5753-5798.
- Guillot, C. and Moran Jr, C. P. 2007. Essential internal promoter in the spoIIIA locus of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 189(20), 7181-7189.
- Gürtler, V. and Mayall, B. C. 2001. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51(1), 3-16.
- Hammer, P., Lembke, F., Suhren, G. and Heeschen, W. 1995. Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT-milk-a preliminary report.
- Hamon, M. A., and Lazazzera, B. A. 2001. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology, 42(5), 1199-1209.
- Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E. and Wagner, M. 2001. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time

- quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3122-3126.
- Hernández, R., Vallés, C., Benito, A. M., Maser, W. K., Rius, F. X. and Riu, J. 2014. Graphene-based potentiometric biosensor for the immediate detection of living bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 553-557.
- Heyndrickx, M. and Scheldeman, P. 2002. Bacilli associated with spoilage in dairy products and other food. In: *Applications and systematics of Bacillus and relatives*, Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N., De Vos, P. (eds), Blackwell Science Ltd, 64-82.
- Heyndrickx, M. 2011. The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. *Applied and Environmental Soil Science*, 2011.
- Hinton, A.R., Trinh, K.T., Brooks, J.D. and Manderson, G.J. 2002. Thermophile survival in milk fouling and on stainless steel during cleaning. *Food and Bioproducts Processing*, 80(4), 299-304.
- Higgins, D. and Dworkin, J. 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 131-148.
- Hoch, J. A. 1993. Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Microbiology*, 47, 441-466.
- Holt, C. 1985. The milk salts: their secretion, concentrations and physical chemistry. In *Developments in Dairy Chemistry 3* (pp. 143-181). Springer, Dordrecht.
- Horneck, G., Klaus, D. M. and Mancinelli, R. L. 2010. Space microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 121-156.
- Hoyle, L., Honda, H., Logan, N. A., Halket, G., La Ragione, R. M. and McCartney, A. L. 2012. Recognition of greater diversity of *Bacillus* species and related bacteria in human faeces. *Research in Microbiology*, 163(1), 3-13.
- Huang, Z., Lin, Y., Ren, F., Song, S. and Guo, H. 2019. Benzalkonium bromide is effective in removing *Bacillus cereus* biofilm on stainless steel when combined with cleaning-in-place. *Food Control*, 105, 13-20.
- Huck, J. R., Hammond, B. H., Murphy, S. C., Woodcock, N. H. and Boor, K. J. 2007. Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-processing systems. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4872-4883.
- Hurtle, W., Bode, E., Kulesh, D. A., Kaplan, R. S., Garrison, J., Bridge, D., House, M., Frye, M.S., Loveless, B. and Norwood, D. 2004. Detection of the *Bacillus anthracis* gyrA gene by using a minor groove binder probe. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 179-185.
- Hussain, T., and Khan, A. A. 2020. *Bacillus subtilis* HussainT-AMU and its Antifungal activity against Potato Black scurf caused by *Rhizoctonia solani* on seed tubers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101443.

- Illing, N. and Errington, J. 1991. The spoIIIA operon of *Bacillus subtilis* defines a new temporal class of mother-cell-specific sporulation genes under the control of the σ^E form of RNA polymerase. *Molecular Microbiology*, 5(8), 1927-1940.
- Inan, K., Belduz, A. O. and Canakci, S. 2013. *Anoxybacillus kaynarcensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylanase producing bacterium. *Journal of basic Microbiology*, 53(5), 410-419.
- Inan Bektas, K., Nalcaoglu, A., Guler, H. İ., Canakci, S. and Belduz, A. O. 2022. Genome-based reclassification of *Anoxybacillus kamchatkensis* Kevbrin et al. 2005 as a later heterotypic synonym of *Anoxybacillus ayderensis* Dulger et al. 2004. *Archives of Microbiology*, 204(10), 613.
- Inan Bektas, K., Guler, H. İ., Canakci, S., and Belduz, A. O. 2023. Genome-based reclassification of *Anoxybacillus salavatliensis* Cihan et al. 2011 as a later heterotypic synonym of *Anoxybacillus gonensis* Belduz et al. 2003. *Antonie van Leeuwenhoek*, 116(5), 415-423.
- Inan Bektas, K., Nalcaoglu, A., Guler, H. İ., Canakci, S., and Belduz, A. O. 2024. Genome-Based Reclassification of *Anoxybacillus geothermalis* Filippidou et al. 2016 as a Later Heterotypic Synonym of *Anoxybacillus rupiensis* Derekova et al. 2007. *Current Microbiology*, 81(4), 102.
- ISO 27265:2009| IDF/RM 228:2009. Dried milk — Enumeration of the specially thermoresistant spores of thermophilic bacteria", (<https://www.iso.org/standard/44083.html> Son Erişim Tarihi: 14. 07.2023)
- Janda, J. M. and Abbott, S. A. 2014. Culture-independent diagnostic testing: have we opened Pandora's box for good? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(3), 171-176.
- Jensen, N. 1999. *Alicyclobacillus*: a new challenge for the food industry. *Food Australia*, 51(1-2), 33-36.
- Johnstone, K. 1994. The trigger mechanism of spore germination: current concepts. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, pp.17S-24S.
- Jordan, E.O. 1890. A report on certain species of bacteria observed in sewage. In: A Report of the Biological Work of the Lawrence Experiment Station, Including an Account of Methods Employed and Results Obtained in the Microscopical and Bacteriological Investigation of Sewage and Water. Sedgewick WT (eds). Report on Water Supply and Sewerage (Part II). The Report of the Massachusetts Board of Health, Massachusetts Board of Public Health, 821-844. Boston.
- Júnior, J. R., De Oliveira, A. M., Silva, F. D. G., Tamanini, R., De Oliveira, A. L. M. and Beloti, V. 2018a. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 75-83.
- Júnior, J. R., Tamanini, R., De Oliveira, A. L. M., Alfieri, A. A., and Beloti, V. 2018b. Genetic diversity of thermotolerant spoilage microorganisms of milk from Brazilian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6927-6936.

- Jin, D. J. and Gross, C. A. 1989. Three *rpoBC* mutations that suppress the termination defects of *rho* mutants also affect the functions of *nusA* mutants. *Molecular and General Genetics MGG*, 216, 269-275.
- Kalogridou-Vassiliadou, D. 1992. Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. *Journal of Dairy Science*, 75(10), 2681-2686.
- Karaca, B., Karakaya, A. B., Ozcan, B. and Coleri Cihan, A. 2022a. Rapid detection of *Geobacillus* and *Anoxybacillus* species by quantitative qPCR (qPCR) in commercial dairy products. *Journal of Food Safety*, 42(2), e12964.
- Karaca, B., Karakaya, A. B., Gursoy, G. E., and Cihan, A. C. 2022b. Evaluation of Clean-in-Place Agents on the Removal of Thermophilic Biofilms Formed under Partially Simulated Conditions Associated with the Dairy Industry. *Food Protection Trends*, 42(1).
- Karakaya A.B. 2019. Termofilik bakterilerin biyofilmlerindeki vejetatif hücrelerin ve sporların abiyotik çeşitli yüzeylere adezyonları ve tutunan bu hücre- sporların yüzeylerden eliminasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı, 155, Ankara.
- Kang, Y., Takeda, K., Yazawa, K. and Mikami, Y. 2009. Phylogenetic studies of *Gordonia* species based on *gyrB* and *secA1* gene analyses. *Mycopathologia*, 167, 95-105.
- Karel, M. and Lund, D. B. 2003. *Physical principles of food preservation: revised and expanded*, CRC Press.
- Kasai, H., Watanabe, K., Gasteiger, E., Bairoch, A., Isono, K., Yamamoto, S. and Harayama, S. 1998. Construction of the *gyrB* database for the identification and classification of bacteria. *Genome Informatics*, 9, 13-21.
- Kasai, H., Ezaki, T. and Harayama, S. 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 301-308.
- Kaul, A. and Singh, R.S. 1982. Production of stable *Bacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Food Protection*, 45(9), 795-796.
- Keresteš, J. 2016. *Milk in human nutrition (Mlieko vo výžive ľudí)*. Bratislava, Slovak Republic: Cad Press, 649 p. ISBN-13: 978-80-88969-72-3. (Slovakça)
- Kevbrin, V. V., Zengler, K., Lysenko, A. M. and Wiegel, J. 2005. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka. *Extremophiles*, 9(5), 391-398.
- Khan, I. U., Habib, N., Xiao, M., Devi, A. M., Habib, M., Hejazi, M. S. and Li, W. J. 2018. *Anoxybacillus sediminis* sp. nov., a novel moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(12), 2275-2282.
- Klerks, M. M., Zijlstra, C. and Van Bruggen, A. H. C. 2004. Comparison of real-time PCR methods for detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:

- H7, and introduction of a general internal amplification control. *Journal of Microbiological Methods*, 59(3), 337-349.
- Kloos, W. E., Ballard, D. N., George, C. G., Webster, J. A., Hubner, R. J., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Fiedler, F. And Schubert, K. 1998. Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equiperfcus* sp. nov., *Macrococcus bovis* sp. nov. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3), 859-877.
- Ko, K. S., Kim, J. M., Kim, J. W., Jung, B. Y., Kim, W., Kim, I. J. and Kook, Y. H. 2003. Identification of *Bacillus anthracis* by rpoB sequence analysis and multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 2908-2914.
- Koichiro, T., Stecher, G., and Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027
- Konstantinidis, K. T. and Tiedje, J. M. 2005. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6258-6264.
- Kubicová, L., Predanocyová, K. and Kádeková, Z. 2019. The importance of milk and dairy products consumption as a part of rational nutrition. *Slovak Journal of Food Sciences/Potravinárstvo*, 13(1).
- Kuisiene, N., Raugalas, J. and Chitavichius, D. 2004. *Geobacillus lituanicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 1991-1995.
- Kumari, S. and Sarkar, P. K. 2016. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, 69, 20-29.
- La Duc, M. T., Satomi, M., Agata, N. and Venkateswaran, K. 2004. gyrB as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 383-394.
- Laaberki, M. H., Pfeffer, J., Clarke, A. J. and Dworkin, J. 2011. O-Acetylation of peptidoglycan is required for proper cell separation and S-layer anchoring in *Bacillus anthracis*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5278-5288.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. and Pace, N. R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959.
- Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G. and Lee, L. H. 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5, 770.
- Lee, C. S., Wetzel, K., Buckley, T., Wozniak, D., and Lee, J. 2011. Rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated water and aerosols targeting gyrB gene using real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 111(4), 893-903.

- Lee, J. Y., Kim, B. K., Kang, M. and Park, J. H. 2016. Label-free detection of single living bacteria via electrochemical collision event. *Scientific Reports*, 6(1), 30022.
- Leggett, M. J., McDonnell, G., Denyer, S. P., Setlow, P. and Maillard, J. Y. 2012. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113(3), 485-498.
- Levican, A., Collado, L. and Figueras, M. J. 2013. *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(1), 22-27.
- Levin, P. A. and Losick, R. 1996. Transcription factor Spo0A switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, 10(4), 478-488.
- Levin, R. E. 2004. The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. *Food Biotechnology*, 18(1), 97-133.
- Lewis, M. J. and Heppell, N. J. 2000. Continuous thermal processing of foods: pasteurization and UHT sterilization (pp. 128-130). Gaithersburg, MD: Aspen Publishers
- Li, N., Wang, Y., You, C., Ren, J., Chen, W., Zheng, H. and Liu, Z. 2018. Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.
- Li, F., Hunt, K., Van Hoorde, K., Butler, F., Jordan, K. and Tobin, J. T. 2019. Occurrence and identification of spore-forming bacteria in skim-milk powders. *International Dairy Journal*, 97, 176-184.
- Lim, J., Shin, S. G., Lee, S., and Hwang, S. 2011. Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*, 5, 28-39.
- Lima, L. J., Kamphuis, H. J., Nout, M. R. and Zwietering, M. H. 2011. Microbiota of cocoa powder with particular reference to aerobic thermoresistant spore-formers. *Food Microbiology*, 28(3), 573-582.
- Liu, X. Y., Hu, Q., Xu, F., Ding, S. Y. and Zhu, K. 2020. Characterization of *Bacillus cereus* in dairy products in China. *Toxins*, 12(7), 454.
- Liu, Y., Štefanič, P., Miao, Y., Xue, Y., Xun, W., Zhang, N., Shen, Q., Zhang, R., Xu, Z. and Mandić-Mulec, I. 2022. Housekeeping gene *gyrA*, a potential molecular marker for *Bacillus* ecology study. *AMB Express*, 12(1), 133.
- Logan, N. A. 2009. *Bacillus*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer Nature.
- Logan, N. A. and De Vos, P. 2011. Family I. Bacillaceae. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 20.
- Logan, N. A. 2012. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology*, 112(3), 417-429.

- Logan, N. A. and De Vos, P. 2015. *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1-163.
- Lopez-Brea, S. G., Gómez-Torres, N., and Arribas, M. Á. 2017. Spore-forming bacteria in dairy products. Microbiology in Dairy Processing: Challenges and Opportunities, 11-36.
- Luu-Thi, H., Grauwet, T., Vervoort, L., Hendrickx, M. and Michiels, C. W. 2014. Kinetic study of *Bacillus cereus* spore inactivation by high pressure high temperature treatment. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 26, 12-17.
- Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J. and Ehling-Schulz, M. 2013. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. International Journal of Food Microbiology, 166(2), 270-279.
- Madani, M., Subbotin, S. A. and Moens, M. 2005. Quantitative detection of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using real-time PCR with SYBR green I dye. Molecular and Cellular Probes, 19(2), 81-86.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 1997. Brock Biology of Microorganisms (Vol. 11), 87-90, Upper Saddle Riandr, NJ: Prentice hHall.
- Mandal, P. K., Biswas, A. K., Choi, K. and Pal, U. K. 2011. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. American Journal of Food Technology, 6(2), 87-102.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M. and Herman, L. 2012. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11(2), 133-147.
- Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J. and Berzano, M. 2002. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. Environmental Microbiology, 4(10), 595-602.
- Márquez, M. C., Sánchez-Porro, C. and Ventosa, A. 2011. Halophilic and haloalkaliphilic, aerobic endospore-forming bacteria in soil. Endospore-forming Soil Bacteria, 309-339.
- Martinez, B. A., Stratton, J. and Bianchini, A. 2017. Isolation and genetic identification of spore-forming bacteria associated with concentrated-milk processing in Nebraska. Journal of Dairy Science, 100(2), 919-932.
- Masiello, S. N., Martin, N. H., Watters, R. D., Galton, D. M., Schukken, Y. H., Wiedmann, M. and Boor, K. J. 2014. Identification of dairy farm management practices associated with the presence of psychrotolerant sporeformers in bulk tank milk. Journal of Dairy Science, 97(7), 4083-4096.
- Mattoo, A. R., Saif Zaman, M., Dubey, G. P., Arora, A., Narayan, A., Jailkhani, N., Rathore, K., Maiti, S. and Singh, Y. 2008. Spo0B of *Bacillus anthracis*—a protein with pleiotropic functions. The FEBS Journal, 275(4), 739-752.

- McHugh, A. J., Feehily, C., Hill, C. and Cotter, P. D. 2017. Detection and enumeration of spore-forming bacteria in powdered dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 8, 109.
- Meer, R. R., Baker, J., Bodyfelt, F. W. and Griffiths, M. W. 1991. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *Journal of Food Protection*, 54(12), 969-979.
- Menard, A., Buissonnière, A., Prouzet-Mauléon, V., Sifré, E. and Mégraud, F. 2016. The GyrA encoded gene: a pertinent marker for the phylogenetic revision of *Helicobacter* genus. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(2), 77-87.
- Meintanis, C., Chalkou, K. I., Kormas, K. A., Lymperopoulou, D. S., Katsifas, E. A., Hatzinikolaou, D. G. and Karagouni, A. D. 2008. Application of *rpoB* sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillus*. *Letters in Applied Microbiology*, 46(3), 395-401.
- Minana-Galbis, D., Pinzon, D. L., Loren, J. G., Manresa, A. and Oliart-Ros, R. M. 2010. Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz et al. 1988) Banat et al. 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(7), 1600-1604.
- Miroshnichenko, M. L., Kublanov, I. V., Kostrikina, N. A., Tourova, T. P., Kolganova, T. V., Birkeland, N. K. and Bonch-Osmolovskaya, E. A. 2008. *Caldicellulosiruptor kronotskyensis* sp. nov. and *Caldicellulosiruptor hydrothermalis* sp. nov., two extremely thermophilic, cellulolytic, anaerobic bacteria from Kamchatka thermal springs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(6), 1492-1496.
- Mohtar, N. S., Rahman, M. B. A., Abd Rahman, R. N. Z. R., Leow, T. C., Salleh, A. B. and Isa, M. N. M. 2016. Expression and characterization of thermostable glycogen branching enzyme from *Geobacillus mahadia* Geo-05. *PeerJ*, 4, e2714.
- Montville, T. J. 1982. Metabiotic effect of *Bacillus licheniformis* on *Clostridium botulinum*: implications for home-canned tomatoes. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(2), 334-338.
- Moriconi, M., Acke, E., Petrelli, D. and Preziuso, S. 2017. Multiplex PCR-based identification of *Streptococcus canis*, *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus dysgalactiae* subspecies from dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 50, 48-53.
- Morse, R., Collins, M. D., O'Hanlon, K., Wallbanks, S. and Richardson, P. T. 1996. Analysis of the β 'subunit of DNA-dependent RNA polymerase does not support the hypothesis inferred from 16S rRNA analysis that *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) is a tachytelic (fast-evolving) bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(4), 1004-1009.

- Mugadza, D. T. and Buys, E. 2018. *Bacillus* and *Paenibacillus* species associated with extended shelf life milk during processing and storage, International Journal of Dairy Technology, 71(2), 301-308.
- Murphy, P.M., Lynch, D. and Kelly, P.M. 1999. Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. International Journal of Dairy Technology, 52(2), 45-50.
- Nagaraj, S., Ramlal, S., Kingston, J. and Batra, H. V. 2016. Development of IgY based sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin G (SEG), an egc toxin. International Journal of Food Microbiology, 237, 136-141.
- Najar, I. N., Sherpa, M. T., Das, S., Verma, K., Dubey, V. K. and Thakur, N. 2018. *Geobacillus yumthangensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a north-east Indian hot spring. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 68(11), 3430-3434.
- Najar, I. N., Das, S. and Thakur, N. 2020. Reclassification of *Geobacillus galactosidasius* and *Geobacillus yumthangensis* as *Parageobacillus galactosidasius* comb. nov. and *Parageobacillus yumthangensis* comb. nov., respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(12), 6518-6523.
- Nakamura, L. K. 1984. *Bacillus amylolyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus pabuli* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus validus* sp. nov., nom. rev. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 34(2), 224-226.
- Nakamura, L. K., Blumenstock, I. and Claus, D. 1988. Taxonomic Study of *Bacillus coagulans* Hammer 1915 with a Proposal for *Bacillus smithii* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 38(1), 63-73.
- Namsaraev, Z. B., Babasanova, O. B., Dunaevsky, Y. E., Akimov, V. N., Barkhutova, D. D., Gorlenko, V. M. and Namsaraev, B. B. 2010. *Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, central Mongolia. Microbiology, 79(4), 491-499.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko A. M., Petrunyaka V.V., Osipov G. A., Belyaev S.S. and Ivanov, M. V. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, G. th.. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51(2), 433-446.
- Nazina, T. N., Lebedeva, E. V., Poltarau, A. B., Tourova, T. P., Grigoryan, A. A., Sokolova, D. S., Lysenko, A.M. and Osipov, G. A. 2004. *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(6), 2019-2024.

- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. and Setlow, P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548-572.
- Nicklas, T. A., O'Neil, C. E. and Fulgoni III, V. L. 2009. The role of dairy in meeting the recommendations for shortfall nutrients in the American diet. *Journal of The American College of Nutrition*, 28(sup1), 73S-81S.
- Nielsen, P., Fritze, D. and Priest, F. G. 1995. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology*, 141(7), 1745-1761.
- Niemann, S., Harmsen, D., Rüscho-Gerdes, S. and Richter, E. 2000. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by gyrB DNA sequence polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3231-3234.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W. and Backhaus, H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178(19), 5636-5643.
- Nystrand, R. 1984. *Saccharococcus thermophilus* gen. nov., sp. nov. isolated from beet sugar extraction. *Systematic and applied microbiology*, 5(2), 204-219.
- O'Callaghan, T. F., Sugrue, I., Hill, C., Ross, R. P. and Stanton, C. 2019. Nutritional aspects of raw milk: A beneficial or hazardous food choice. In *Raw milk* (pp. 127-148). Nero, E.A., De Carvalho, A. F. (eds.), Academic Press.
- Ogier, J. C., Pagès, S., Galan, M., Barret, M. and Gaudriault, S. 2019. rpoB, a promising marker for analyzing the diversity of bacterial communities by amplicon sequencing. *BMC Microbiology*, 19, 1-16.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M. and Ugene Team. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166-1167.
- Oliver, J. D. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415-425.
- Onyenwoke, R. U., Brill, J. A., Farahi, K. and Wiegel, J. 2004. Sporulation genes in members of the low G+ C Gram-type-positive phylogenetic branch (Firmicutes). *Archives of Microbiology*, 182, 182-192.
- Oomes, S. J. C. M., Van Zuijlen, A. C. M., Hehenkamp, J. O., Witsenboer, H., Van der Vossen, J. M. B. M. and Brul, S. 2007. The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), 85-94.
- Oomes, S. J. C. M., Jonker, M. J., Wittink, F. R. A., Hehenkamp, J. O., Breit, T. M. and Brul, S. 2009. The effect of calcium on the transcriptome of sporulating *B. subtilis* cells. *International Journal of Food Microbiology*, 133(3), 234-242.
- Oren, A. and Garrity, G.M. 2014a. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 64, part 1 of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64:1075-1076.

- Oren, A. and Garrity, G.M. 2014b. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 63, part 11 of the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64:313-315.
- Oren, A., da Costa, M. S., Garrity, G. M., Rainey, F. A., Rossello-Mora, R., Schink, B., Sutcliffe, I., Trujillo, M.E. and Whitman, W. B. 2015a. Proposal to include the rank of phylum in the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65(Pt_11), 4284-4287.
- Oren, A. and Garrity, G.M. 2015b. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 64, part 11 of the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65:323-324.
- Oren, A. and Garrity, G.M. 2015c. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 65, part 3 of the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65:1701-1702.
- Oren, A. and Garrity, G.M. 2016. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 66, part 8 of the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66:4306-4309.
- Oren, A. and Garrity, G.M. 2019a. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 68, part 11 of the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 69:297-298.
- Oren, A. and Garrity, G.M. 2019b. Validation list no. 186. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 69:597-599.
- Oren, A. and Garrity, G.M. 2020. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 69, part 10 of the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70:6-8
- Oren, A. and Garrity, G.M. 2021. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 71(10), 005056.
- Oren, A. and Garrity, G.M. 2022. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 71, part 10 of the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 72:5165.
- Orsburn, B., Melville, S. B. and Popham, D. L. 2008. Factors contributing to heat resistance of *Clostridium perfringens* endospores. Applied and Environmental Microbiology, 74(11), 3328-3335.
- Oslizlo, A., Stefanic, P., Vatovec, S., Beigot Glaser, S., Rupnik, M. and Mandic-Mulec, I. 2015. Exploring ComQXPA quorum-sensing diversity and biocontrol potential of *Bacillus* spp. isolates from tomato rhizoplane. Microbial Biotechnology, 8(3), 527-540.
- Pahlow, S., Meisel, S., Cialla-May, D., Weber, K., Rösch, P. and Popp, J. 2015. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy. Advanced Drug Delivery Reviews, 89, 105-120.

- Palop, A., Manas, P. and Condon, S. 1999. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. *Journal of Food Safety*, 19(1), 57-72.
- Palmisano, M. M., Nakamura, L. K., Duncan, K. E., Istock, C. A. and Cohan, F. M. 2001. *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*, 51(5), 1671-1679.
- Panosyan, H., Margaryan, A. and Birkeland, N. K. 2021. *Anoxybacillus karvacharensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from the Karvachar geothermal spring in Nagorno-Karabakh. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10).
- Park, H. K., Yoon, J. W., Shin, J. W., Kim, J. Y. and Kim, W. 2010. rpoA is a useful gene for identification and classification of *Streptococcus pneumoniae* from the closely related viridans group streptococci. *FEMS Microbiology Letters*, 305(1), 58-64.
- Parkar, S. G., Flint, S. H. and Brooks, J. D. 2003. Physiology of biofilms of thermophilic bacilli—potential consequences for cleaning. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 553-560.
- Parkar, S.G., Flint, S.H. and Brooks, J.D., 2004. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), pp.110-116.
- Parks, D. H., Chuvochina, M., Waite, D. W., Rinke, C., Skarszewski, A., Chaumeil, P. A. and Hugenholtz, P. 2018. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature biotechnology*, 36(10), 996-1004.
- Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C. and Göker, M. 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5607-5612.
- Parichehr, M., Mohammad, K., Abbas, D., and Mehdi, K. 2019. Developing a multiplex real-time PCR with a new pre-enrichment to simultaneously detect four foodborne bacteria in milk. *Future Microbiology*, 14(10), 885-898.
- Patel, J. R., Bhagwat, A. A., Sanglay, G. C., and Solomon, M. B. 2006. Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR. *Food Microbiology*, 23(1), 39-46.
- Patel, S. and Gupta, R. S. 2020. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 406-438.
- Patel, I., Bello, S. and Gupta, R. S. 2024. Phylogenomic and molecular marker based studies to clarify the evolutionary relationships amongst *Anoxybacillus* species and demarcation of the family *Anoxybacillaceae* and some of its constituent

- genera. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 74(9), 006528.
- Penfield, M. P. and Campbell, A. M. 1990. In: Milk and milk products Penfield, M. P., Campbell, A.M., Taylor, S. (eds.) 162-183. Experimental Food Science.
- Peng, J. S., Tsai, W. C. And Chou, C. C. 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. International Journal of Food Microbiology, 77(1-2), 11-18.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. and Laurinavichius, K. 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(6), 2109-2117.
- Piggot, P. J. and Coote, J. G. 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. Bacteriological Reviews, 40(4), 908-962.
- Poirier, S., Ru  , O., Peguilhan, R., Coeuret, G., Zagorec, M., Champomier-Verges, M. C., Loux, V. and Chaillou, S. 2018. Deciphering intra-species bacterial diversity of meat and seafood spoilage microbiota using gyrB amplicon sequencing: A comparative analysis with 16S rDNA V3-V4 amplicon sequencing. PLoS One, 13(9), e0204629.
- Poli, A., Romano, I., Caliendo, G., Nicolaus, G., Orlando, P., De Falco, A. and Nicolaus, B. 2006a. *Geobacillus toebii* subsp. decanicus subsp. nov., a hydrocarbon-degrading, heavy metal resistant bacterium from hot compost. The Journal of General and Applied Microbiology, 52(4), 223-234.
- Poli, A., Esposito, E., Lama, L., Orlando, P., Nicolaus, G., de Appolonia, F., Gambacorta, A., and Nicolaus, B. 2006b. *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica). Systematic and Applied Microbiology 29:300-307.
- Poli, A., Romano, I., Cordella, P., Orlando, P., Nicolaus, B. and Ceschi Berrini, C. 2009. *Anoxybacillus thermarum* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from thermal mud in Euganean hot springs, Abano Terme, Italy. Extremophiles, 13(6), 867-874.
- Poli, A., Laezza, G., Gul-Guven, R., Orlando, P. and Nicolaus, B. 2011. *Geobacillus galactosidasius* sp. nov., a new thermophilic galactosidase-producing bacterium isolated from compost. Systematic and Applied Microbiology, 34(6), 419-423
- Poli, A., Guven, K., Romano, I., Pirinccioglu, H., Guven, R. G., Euzeby, J. P. M. and Nicolaus, B. 2012. *Geobacillus subterraneus* subsp. *aromaticivorans* subsp. nov., a novel thermophilic and alkaliphilic bacterium isolated from a hot spring in S  nak, Turkey. The Journal of General and Applied Microbiology, 58(6), 437-446.

- Popova, N. A., Nikolaev, Y. A., Tourova, T. P., Lysenko, A. M., Osipov, G. A., Verkhovtseva, N. V. and Panikov, N. S. 2002. *Geobacillus uralicus*, a new species of thermophilic bacteria. *Microbiology*, 71, 335-341.
- Postollec, F., Mathot, A. G., Bernard, M., Divanac'h, M. L., Pavan, S. and Sohier, D. 2012. Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. *International Journal of Food Microbiology*, 158(1), 1-8.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A. and Berkeley, R. C. W. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(1), 69-71.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. and Cotter, P. D. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664-698.
- Radchenkova, N., Tomova, A. and Kambourova, M. 2011. Biosynthesis of an exopolysaccharide produced by *Brevibacillus thermoruber* 438. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(sup1), 77-79.
- Rahman, R. N. Z. R. A., Leow, T. C., Salleh, A. B. and Basri, M. 2007. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. *BMC microbiology*, 7(1), 1-10.
- Ranieri, M. L., Huck, J. R., Sonnen, M., Barbano, D. M. and Boor, K. J. 2009. High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4823-4832.
- Reginensi, S. M., González, M. J., Olivera, J. A., Sosa, M., Juliano, P. and Bermúdez, J. 2011. RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *International Journal of Food Microbiology*, 148(1), 36-41.
- Rainey, F. A., Donnison, A. M., Janssen, P. H., Saul, D., Rodrigo, A., Bergquist, P. L., Daniel, R.M., Stackebrandt, E. and Morgan, H. W. 1994. Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 120(3), 263-266.
- Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., and Dedysh, S. 2015. In: *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria* (Vol. 410). W. B. Whitman (Ed.). Hoboken, NJ: Wiley.
- Riley, E. P., Schwarz, C., Derman, A. I., and Lopez-Garrido, J. 2020. Milestones in *Bacillus subtilis* sporulation research. *Microbial Cell*, 8(1), 1.
- Rinke, C., Chuvochina, M., Mussig, A. J., Chaumeil, P. A., Davín, A. A., Waite, D. W., Whitman B. W., Parks, D.H. and Hugenholtz, P. 2021. A standardized archaeal taxonomy for the Genome Taxonomy Database. *Nature Microbiology*, 6(7), 946-959.
- Roberts, T. A. and Hitchins, A. D. 1969. Resistance of spores. The bacterial spore. Gould, GW y Hurst, A., Academic Press, New York.

- Romano, I., Poli, A., Lama, L., Gambacorta, A. and Nicolaus, B. 2005. *Geobacillus thermoleovorans* subsp. stromboliensis subsp. nov., isolated from the geothermal volcanic environment. The Journal of General and Applied Microbiology, 51(3), 183-189.
- Ronimus, R. S., Parker, L. E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A. and Morgan, H. W. 2003. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders, International Journal of Food Microbiology, 85(1-2), 45-61.
- Rowland, G. C., Aboshkiwa, M. and Coleman, G. 1993. Comparative sequence analysis and predicted phylogeny of the DNA-dependent RNA polymerase β subunits of *Staphylococcus aureus* and other eubacteria.
- Rosenkvist, H. and Hansen, Å. 1995. Contamination profiles and characterisation of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. International Journal of Food Microbiology, 26(3), 353-363.
- Roszak, D. B. and Colwell, R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiological Reviews, 51(3), 365-379.
- Rückert, A., Ronimus, R. S. and Morgan, H. W. 2004. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. International Journal of Food Microbiology, 96(3), 263-272.
- Rueckert, A., Ronimus, R. S. and Morgan, H. W. 2005a. Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders, Journal of Microbiological Methods, 60(2), 155-167.
- Rueckert, A., Ronimus, R. S. and Morgan, H. W. 2005b. Rapid differentiation and enumeration of the total, viable vegetative cell and spore content of thermophilic bacilli in milk powders with reference to *Anoxybacillus flavithermus*, Journal of Applied Microbiology, 99(5), 1246-1255.
- Rueckert, A., Ronimus, R. S. and Morgan, H. W. 2006. Development of a real-time PCR assay targeting the sporulation gene, *spo0A*, for the enumeration of thermophilic bacilli in milk powder. Food Microbiology, 23(3), 220-230.
- Russell, A. D. 1990. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. Clinical Microbiology Reviews, 3(2), 99-119.
- Ryter, A. 1965, January. Morphologic study of the sporulation of *Bacillus subtilis*. In Annales de l'Institut Pasteur, Vol. 108, pp. 40-60.
- Ryu, J. H. and Beuchat, L. R. 2005. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. Journal of Food Protection, 68(12), 2614-2622.
- Ryu, S., Park, W. S., Yun, B., Shin, M., Go, G. W., Kim, J. N., Oh S. and Kim, Y. 2021. Diversity and characteristics of raw milk microbiota from Korean dairy farms using metagenomic and culturomic analysis. Food Control, 127, 108160.
- Sadiq, F. A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G. and He, G. 2016a. A RAPD based study revealing a previously unreported wide range of mesophilic and thermophilic

- spore formers associated with milk powders in China. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 200-208.
- Sadiq, F. A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., Yuan, L., Pei, Z. and He, G. 2016b. The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *International Journal of Food Microbiology* 238:193-201
- Sadiq, F. A., Flint, S. and He, G. 2018. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. *International Dairy Journal*, 85, 159-168.
- Saptalena, L. G., Kuklya, A. and Telgheder, U. 2015. Gas chromatography–differential mobility spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry for the detection of coliform bacteria. *International Journal of Mass Spectrometry*, 388, 17-25.
- Saravanan, A., Kumar, P. S., Hemavathy, R. V., Jeevanantham, S., Kamalesh, R., Sneha, S. and Yaashikaa, P. R. 2021. Methods of detection of food-borne pathogens: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 189-207.
- Satomi, M., La Duc, M. T. and Venkateswaran, K. 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1735-1740.
- Seale, R. B., Dhakal, R., Chauhan, K., Craven, H. M., Deeth, H. C., Pillidge, C. J., Powell I.B. and Turner, M. S. 2012. Genotyping of present-day and historical *Geobacillus* species isolates from milk powders by high-resolution melt analysis of multiple variable-number tandem-repeat loci. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 7090-7097.
- Scheldeman, P., Herman, L., Goris, J., De Vos, P. and Heyndrickx, M. 2002. Polymerase chain reaction identification of *Bacillus sporothermodurans* from dairy sources. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 983-991.
- Scheldeman, P., Rodriguez-Diaz, M., Goris, J., Pil, A., De Clerck, E., Herman, L. and Heyndrickx, M. 2004. *Bacillus farraginis* sp. nov., *Bacillus fortis* sp. nov. and *Bacillus fordii* sp. nov., isolated at dairy farms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1355-1364.
- Scheldeman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P. and Heyndrickx, M. 2005. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1480-1494.
- Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S. and Heyndrickx, M. 2006. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 542-555.
- Schmidt-Dannert, C., Rua, M. L., Wahl, S. and Schmid, R. D. 1997. *Bacillus thermocatenulatus* lipase: a thermoalkalophilic lipase with interesting properties. *Biochemical Society Transactions*.

- Schmidt, T. R., Scott, E. J. and Dyer, D. W. 2011. Whole-genome phylogenies of the family *Bacillaceae* and expansion of the sigma factor gene family in the *Bacillus cereus* species-group. *BMC Genomics*, 12(1), 1-17.
- Scott, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M. R. and Flint, S. H. 2007. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology* 60(2):109-117
- Seiler, H., Wenning, M. and Scherer, S. 2013. *Domibacillus robiginosus* gen. nov., sp. nov., isolated from a pharmaceutical clean room. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_6), 2054-2061.
- Semenova, E. M., Sokolova, D. S., Grouzdev, D. S., Poltarau, A. B., Vinokurova, N. G., Tourova, T. P. and Nazina, T. N. 2019. *Geobacillus proteiniphilus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a high-temperature heavy oil reservoir in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(10), 3001-3008.
- Setlow, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 514-525.
- Setlow, P. 2007. I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*, 15(4), 172-180.
- Setlow, P. 2014. Spore Resistance Properties, In: *The Bacterial Spore: From Molecules to Systems*. Eichenberger, P., and Driks, A. (eds), American Society for Microbiology, 201-215, Washington DC.
- Setlow, P. 2019. Observations on research with spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species. *Journal of applied microbiology*, 126(2), 348-358.
- Setlow, P. and Johnson, E. A. 2019. Spores and their significance. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 23-63.
- Shahdordizadeh, M., Taghdisi, S. M., Ansari, N., Langroodi, F. A., Abnous, K. and Ramezani, M. 2017. Aptamer based biosensors for detection of *Staphylococcus aureus*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241, 619-635.
- Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M. A., Christiansson, A. and Salkinoja-Salonen, M. 2010. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology*, 27(3), 347-355.
- Sharp, R. J., Riley, P. W. and White, D. 2021. Heterotrophic thermophilic bacilli. In *Thermophilic bacteria*, 19-50. CRC Press.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M. and Bhargava, P. M. 2006. *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*, 56(7), 1465-1473
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D. and Higgins, D. G.

2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539.
- Simmonds, P., Mossel, B. L., Intaraphan, T. and Deeth, H. C. 2003. Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *Journal of Food Protection*, 66(11), 2070-2075.
- Singh, D., Sharma, A. and Saini, G. K. 2013. Biochemical and molecular characterisation of the bacterial endophytes from native sugarcane varieties of Himalayan region. *3 Biotech*, 3, 205-212.
- Skeie, S. B., Håland, M., Thorsen, I. M., Narvhus, J. and Porcellato, D. 2019. Bulk tank raw milk microbiota differs within and between farms: A moving goalpost challenging quality control. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 1959-1971.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V. and Sneath, P.H.A. 1980. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 30:225-420.
- SnapGene® Software for Windows, Dotmatic, www.snapgene.com, Son Erişim Tarihi Aralık 2024.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 846-849.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, Trüper, G.H., Vauterin, L., Ward, A.C. and Whitman, W. B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1043-1047.
- Staley, J. T. and Krieg, N. J. 1984. Classification of prokaryotic organisms: an overview, p. 1–3. *In* N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Stefanic, P. and Mandic-Mulec, I. 2009. Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* phenotypes at microscale. *Journal of Bacteriology*, 191(6), 1756-1764.
- Stefanic, P., Decorosi, F., Viti, C., Petito, J., Cohan, F. M. and Mandic-Mulec, I. 2012. The quorum sensing diversity within and between ecotypes of *Bacillus subtilis*. *Environmental microbiology*, 14(6), 1378-1389.
- Stefanic, P., Kraigher, B., Lyons, N. A., Kolter, R. and Mandic-Mulec, I. 2015. Kin discrimination between sympatric *Bacillus subtilis* isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(45), 14042-14047.
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A. and Granum, P. E. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 579-606.
- Stewart, J.C. and Seiberling, D.A., 1996. Clean in place. *Chemical Engineering*, 103(1), p.72.

- Stragier, P. and Losick, R. 1996. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. Annual Review of Genetics, 30(1), 297-341.
- Stragier, P. 2001. A gene odyssey: exploring the genomes of endospore-forming bacteria. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells, 519-525.
- Strauch, M., Webb, V., Spiegelman, G. and Hoch, J. A. 1990. The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(5), 1801-1805.
- Sung, M. H., Kim, H., Bae, J. W., Rhee, S. K., Jeon, C. O., Kim, K. and Baek, D. H. 2002. *Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52(6), 2251-2255.
- Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S. and Yamamoto, S. 2001. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51(5), 1639-1652.
- Suzuki, N., Seki, M., Nakano, Y., Kiyoura, Y., Maeno, M. and Yamashita, Y. 2005. Discrimination of *Streptococcus pneumoniae* from viridans group streptococci by genomic subtractive hybridization. Journal of Clinical Microbiology, 43(9), 4528-4534.
- Swick, M. C., Koehler, T. M. and Driks, A. 2016. Surviving between hosts: sporulation and transmission. Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, 567-591.
- Tai, S. K., Lin, H. P. P., Kuo, J. and Liu, J. K. 2004. Isolation and characterization of a cellulolytic *Geobacillus thermoleovorans* T4 strain from sugar refinery wastewater. Extremophiles, 8, 345-349.
- Takami, H., Takaki, Y., Chee, G. J., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, H., Matsui, S. and Uchiyama, I. 2004. Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. Nucleic Acids Research, 32(21), 6292-6303.
- Te Giffel, M. T., Wagendorp, A., Herrewegh, A. and Driehuis, F. 2002. Bacterial spores in silage and raw milk. Antonie van Leeuwenhoek, 81, 625-630.
- Thissen, J. B., McLoughlin, K., Gardner, S., Gu, P., Mabery, S., Slezak, T. and Jaing, C. 2014. Analysis of sensitivity and rapid hybridization of a multiplexed Microbial Detection Microarray. Journal of Virological Methods, 201, 73-78.
- Thomas, A. and Sathian, C. T. 2014. Cleaning-in-place (CIP) system in dairy plant-review. IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology, 8, 41-44.
- Tourova, T. P., Korshunova, A. V., Mikhailova, E. M., Sokolova, D. S., Poltarau, A. B. and Nazina, T. N. 2010. Application of *gyrB* and *parE* sequence similarity analyses for differentiation of species within the genus *Geobacillus*. Microbiology, 79, 356-369.

- Tringe, S. G. and Hugenholtz, P. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), 442-446.
- Tzeng, Y. L., Zhou, X. Z. and Hoch, J. A. 1998. Phosphorylation of the Spo0B response regulator phosphotransferase of the phosphorelay initiating development in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(37), 23849-23855.
- Vaishampayan, P., Probst, A., Krishnamurthi, S., Ghosh, S., Osman, S., McDowall, A., Ruckmani A., Mayilraj S. and Venkateswaran, K. 2010. *Bacillus horneckiae* sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly clean room. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(5), 1031-1037.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407-438.
- VanderKelen, J. J., Mitchell, R. D., Laubscher, A., Black, M. W., Goodman, A. L., Montana, A. K., Dekhtyar, A.M., Jimenez-Flores, R. and Kitts, C. L. 2016. Typing and tracking *Bacillaceae* in raw milk and milk powder using pyroprinting. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 146-151.
- Van Asselt, E. D. and Zwietering, M. H. 2006. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International journal of food microbiology*, 107(1), 73-82.
- Veening, J. W., Murray, H. and Errington, J. 2009. A mechanism for cell cycle regulation of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, 23(16), 1959-1970.
- Verma, A., Pal, Y., Ojha, A. K., Kumari, M., Khatri, I., Rameshkumar, N. and Krishnamurthi, S. 2019. Taxonomic insights into the phylogeny of *Bacillus badius* and proposal for its reclassification to the genus *Pseudobacillus* as *Pseudobacillus badius* comb. nov. and reclassification of *Bacillus wudalianchiensis* Liu et al., 2017 as *Pseudobacillus wudalianchiensis* comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(3), 360-372.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M. and Schué, F. 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), 377-410.
- Vieille, C. and Zeikus, G. J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 1-43.
- Vinter, V. 1969. Physiology and biochemistry of sporulation. *The Bacterial Spore*, 1, 73-123.
- Whitman, W. B., Oren, A., Chuvochina, M., da Costa, M. S., Garrity, G. M., Rainey, F. A., Rossello-Mora, R., Schink, B., Sutcliffe, I. and Ventura, S. 2018. Proposal of the suffix-ota to denote phyla. Addendum to 'Proposal to include the rank of phylum in the International Code of Nomenclature of Prokaryotes'. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology*, 68(3), 967-969.

- Vlková, H., Babák, V., Seydlová, R., Pavlík, I. and Schlegelová, J. 2008. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms-a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(5), 309-323.
- Vos, M., Quince, C., Pijl, A. S., de Hollander, M. and Kowalchuk, G. A. 2012. A comparison of *rpoB* and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. *PloS one*, 7(2), e30600.
- Watanabe M, Fukui M, and Kuever J. 2019. *Desulfocucumaceae* fam. nov. In: Bergey's Manual of Systematics of *Archaea* and *Bacteria*, Anonymous NNe (eds), John Wiley & Sons, 1-2, New York.
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., and Kasai, H. 2007. 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*, 57(8), 1846-1850.
- Wang, Y. and Qian, P. Y. 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PloS one*, 4(10), e7401.
- Wang, M., Zheng, N., Li, X., Zhao, K., and Xie, B. B. 2023. Enrichment Pretreatment Expands the Microbial Diversity Cultivated from Marine Sediments. *Microorganisms*, 11(11), 2771.
- Warriner, K. and Waites, W.M. 1999. Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose: ribose. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 97-102.
- Warth, A. D. 1978. Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*, 134(3), 699-705.
- Wells-Bennik, M. H., Eijlander, R. T., Den Besten, H. M., Berendsen, E. M., Warda, A. K., Krawczyk, A. O., Groot, M.N.N., Xiao, Y., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P. and Abee, T. 2016. Bacterial spores in food: survival, emergence, and outgrowth. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), 457-482.
- Werner, W. E. G. 1933. Botanische Beschreibung häufiger am Buttersäureabbau beteiligter sporenbildender Bakterienspezies. Mitzlaff.
- Wheeler, D. L., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L. Y., Helmber, W., Kapustin, Y., Khovayko, O., Landsman, D., Lipman, D.J., Maddem, T.L., Maglott, D. R., Miller, V., Ostell, J., Pruitt, K.D., Schuler, G.D., Shumway, M., Sequirira, E., Sherry, S.T., Sirotkin, K., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusov, R.L., Tatusova, T.A., Wagner, L. and Yaschenko, E. 2007. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl_1), D13-D21.
- White, J.C., and Rabe, G.O. 1970. Evaluating the use of nitric acid as a detergent in dairy cleaned-in-place systems. *Journal of Milk and Food Technology*, 33(1), 25-28.

- Willis, C., Jørgensen, F., Aird, H., Elviss, N., Fox, A., Jenkins, C., Fenelon, D., Sadler-Reeves, L. and McLauchlin, J. 2018. An assessment of the microbiological quality and safety of raw drinking milk on retail sale in England. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 535-546.
- Witthuhn, M., Luecking, G., Atamer, Z., Ehling-Schulz, M. and Hinrichs, J. 2011. Thermal resistance of aerobic spore formers isolated from food products. *International Journal of Dairy Technology*, 64(4), 486-493.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221-271.
- Wu, D., Hugenholtz, P., Mavromatis, K., Pukall, R., Dalin, E., Ivanova, N. N., Kunin, V., Goodwin, L., Wu, M., Tindall, B.J., Hooper, S.D., Pati, A., Lykidis, A., Spring, S., Anderson, I.J., D'Haeseleer, P., Zemla, A., Singer, M., Lapidus, A., Nolan, M., Copeland, A., Han, C., Chan, F., Chang, J.F., Lucas, S., Kerfeld, C., Lang, E., Gronow, S., Chain, P., Bruce, D., Rubin, E.M., Kyrpides, N.C., Klenk, H.P. and Eisen, J. A. 2009. A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature*, 462(7276), 1056-1060.
- Wunderlin, T., Junier, T., Roussel-Delif, L., Jeanneret, N. and Junier, P. 2013. Endospore-enriched sequencing approach reveals unprecedented diversity of Firmicutes in sediments. *Environmental Microbiology Reports*, 6(6), 631-639.
- Xiao, Y., van Hijum, S. A., Abee, T. and Wells-Bennik, M. H. 2015. Genome-wide transcriptional profiling of *Clostridium perfringens* SM101 during sporulation extends the core of putative sporulation genes and genes determining spore properties and germination characteristics. *PLoS One*, 10(5), e0127036.
- Xu, D. and Coté, J. C. 2003. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 695-704.
- Xue, Z. and Marco, M. L. 2022. Improved assessments of bulk milk microbiota composition via sample preparation and DNA extraction methods. *PLOS One*, 17(9), e0267992.
- Yamada, S., Ohashi, E., Agata, N. and Venkateswaran, K. 1999. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1483-1490.
- Yamamoto, S. and Harayama, S. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1104-1109.
- Yamamoto, S. and Harayama, S. 1996. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(2), 506-511.
- Yamamoto, S. and Harayama, S. 1998. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA

- genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3), 813-819.
- Yamamoto, S., Bouvet, P. J. and Harayama, S. 1999. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 87-95.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A. and Harayama, S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, 146(10), 2385-2394.
- Yanez, M. A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M. J. and Martínez-Murcia, A. J. 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 875-883.
- Yoo, S. M. and Lee, S. Y. 2016. Optical biosensors for the detection of pathogenic microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 7-25.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J. and Hwang, S. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(6), 670-679.
- Yumoto, I., Hirota, K., Kawahara, T., Nodasaka, Y., Okuyama, H., Matsuyama, H. and Hoshino, T. 2004. *Anoxybacillus voinovskiensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a hot spring in Kamchatka. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1239-1242.
- Zain, S. N. M., Flint, S. H., Bennett, R. and Tay, H. S. 2016. Characterisation and biofilm screening of the predominant bacteria isolated from whey protein concentrate 80. *Dairy Science and Technology*, 96(3), 285-295.
- Zarilla, K. A. and Perry, J. J. 1987. *Bacillus thermokovorans*, sp. nov., a species of obligately thermophilic hydrocarbon utilizing endospore-forming bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 9(3), 258-264.
- Zeigler, D. R. 2005. Application of a *recN* sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1171-1179.
- Zeleňáková, L., Golian, J. and Zajác, P. 2008. Application of ELISA tests for the detection of goat milk in sheep milk. *Milchwissenschaft*, 63(2), 137-141.
- Zeytuni, N., Flanagan, K. A., Worrall, L. J., Massoni, S. C., Camp, A. H. and Strynadka, N. C. J. 2018. Structural characterization of SpoIIIAB sporulation-essential protein in *Bacillus subtilis*. *Journal of Structural Biology*, 202(2), 105-112.
- Zhang, C. M., Huang, X. W., Pan, W. Z., Zhang, J., Wei, K. B., Klenk, H. P. and Zhang, K. Q. 2011. *Anoxybacillus tengchongensis* sp. nov. and *Anoxybacillus eryuanensis* sp. nov., facultatively anaerobic, alkalitolerant bacteria from hot springs. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology*, 61(1), 118-122.

- Zhang, X. Q., Zhang, Z. L., Wu, N., Zhu, X. F. and Wu, M. 2013. *Anoxybacillus vitaminiphilus* sp. nov., a strictly aerobic and moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63(Pt_11), 4064-4071.
- Zheng, J., Su, C., Zhou, J., Xu, L., Qian, Y., and Chen, H. 2017. Effects and mechanisms of ultraviolet, chlorination, and ozone disinfection on antibiotic resistance genes in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants. Chemical Engineering Journal, 317, 309-316.
- Zhao, Y., Caspers, M. P., Metselaar, K. I., de Boer, P., Roeselers, G., Moezelaar, R., Groot M. N., Montijn R. C., Abee T. and Kort, R. 2013. Abiotic and microbiotic factors controlling biofilm formation by thermophilic sporeformers. Applied and Environmental Microbiology, 79(18), 5652-5660.
- Zhao, Y., Zhang, X., Wang, Y., Wu, Z., An, J., Lu, Z., Mei, L. and Li, C. 2014. In situ cross-linked polysaccharide hydrogel as extracellular matrix mimics for antibiotics delivery. Carbohydrate polymers, 105, 63-69.