

T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*BACILLUS CEREUS*'UN SAFLAŞTIRILMASI, MİKROBİYOLOJİK VE  
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

DUYGU TURAN

Doç.Dr.C.Cem ERGÜL

(Danışman)

Prof.Dr.Sezai TÜRKEL

(İkinci Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
BURSA-2016

TEZ ONAYI

Duygu TURAN tarafından hazırlanan “ *Bacillus cereus*’un Saflaştırılması, Mikrobiyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç.Dr.C.Cem ERGÜL

**İkinci danışman** : Prof.Dr.Sezai TÜRKEKEL

**Başkan** : Prof.Dr.Gönül KAYNAK

U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi

Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Doç.Dr.C.Cem ERGÜL

U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi

Biyoloji Anabilim Dalı

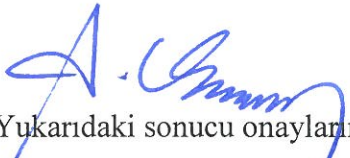
İmza

**Üye** : Yrd.Doç.Dr.Hülya KARACA GENCER

Anadolu Üniversitesi-Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İmza

  
Yukarıdaki sonucu onaylarım  
Prof. Dr. Ali Osman DEMİR  
Enstitü Müdürü ✓

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### *BACILLUS CEREUS*'UN SAFLAŞTIRILMASI, MİKROBİYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

**DUYGU TURAN**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. C. Cem ERGÜL  
**İkinci Danışman:** Prof. Dr. Sezai TÜRKEK

Bu çalışmada, *Bacillus* türlerinin baharatlardaki ve topraktaki varlığının belirlenmesi, mikrobiyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi amacıyla marketlerde ambalajlı olarak satılan farklı markalardan alınan *Piper nigrum* (karabiber), *Capsicum annuum* (tatlı-acı kırmızı biber), *Zingiber officinale* (zencefil), *Cuminum cyminum* (kimyon), *Ocimum basilicum* (fesleğen), *Thymus vulgaris* (kekik), *Salvia officinalis* (adaçayı), *Mentha piperita* (nane), *Origanum majorana* (mercanköşk), *Laurus nobilis* (defne), karışık pizza baharatı ve hazır halde bulunan toprak preparatı incelenmiştir. Baharat örneklerinin petrilere ekimi sonucunda petrilere bazı *Bacillus* türleri gözlenmiştir. Petrilere yaygın olarak *B. cereus* kolonilerinin gözlenmesinin yanısıra sarı renkli, parlak ve sulu koloniler kaydedilmiştir. *B. cereus*'un yanısıra diğer *Bacillus* türlerinin de toksisitelerini belirlemek amacıyla farklı bir materyal olarak hazır toprak preparatları incelenmiştir. İncelenen toprak preparatlarından hazır olarak temin edilen DNA solüsyonlarında toksisiteye neden olan genlerin varlığı araştırılmıştır. *B. cereus* ve *B. thuringiensis*'den izole edildiği bilinen ve Bialystok Üniversitesi Mikrobiyoloji laboratuvarına hazır olarak getirilerek kullanılan DNA solüsyonlarında Hbl, Nhe ve Cry genlerinin varlığının olup olmadığı saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *B. cereus*, gıda analizi, bakteri izolasyonu, baharat, kontaminasyon, gıda zehirlenmesi

2016, viii + 37 sayfa.

## ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF *BACILLUS CEREUS*; PURIFICATION, MICROBIOLOGICAL  
AND BIOCHEMICAL PROPERTIES

**DUYGU TURAN**

Uludağ University  
Science Institute  
Department of Biology

**Supervisor:** Assoc.Dr. C.Cem ERGÜL  
**Second Supervisor:** Prof.Dr. Sezai TÜRKEKEL

In this study, in order to determine the presence of *Bacillus* types in some spices and soil, sold as packaged in the market from different brands *Piper nigrum* (black pepper), *Capsicum annuum* (sweet and hot red pepper), *Zingiber officinale* (ginger), *Cuminum cyminum* (cumin), *Ocimum basilicum* (basil), *Thymus vulgaris* (thyme), *Salvia officinalis* (sage), *Mentha piperita* (mint), *Origanum Majorana* (marjoram), *Laurus nobilis* (bay), mixed pizza spices and ready soil preparation were examined. In the result, in the spices that were planted in the petries were obtained some *Bacillus* species. Widely, *Bacillus cereus* was observed. Besides of these colonies, yellow-colored, bright and wet colonies were recorded. As a different material, prepared soil sample was used for determine the toxicity of *B. cereus* and other *Bacillus* species. In ready DNA solutions that were obtained from the soil samples were examined, the presence of the genes which causes to toxicity were researched. The presence of Hbl, Nhe and Cry genes was observed in these ready DNA solutions.

**Key Words:** *B.cereus*, food analyze, bacteri izolation, spice, contamination, food poisoning.

2016,viii + 37 pages.

## TEŞEKKÜR

Tez alıŐmalarım sırasında ve yazım aŐaması boyunca bana yol gÖsteren danıŐmanım Sayın Do.Dr. C.Cem ERGÜL'e teşekkür ederim.

Tez çalıŐmam da bana yol gÖsteren ikinci danıŐmanım Sayın Prof.Dr. Sezai TÜRKEL'e teŐekkürü bir borç bilirim.

Tüm bu sürecin her anında yanımda olan, gerek laboratuarda gerek tezimin yazım aŐamasında benimle birlikte saatler geçiren sevgili arkadaŐım Uludağ Üniversitesi Doktora ÖĐrencisi Betül Uur'a, yüksek lisans eğitimim boyunca bana yuvalarını aan, beni aileden biri olarak kabul eden sevgili Emine - Bülent ÖĐütçü ve ailesine ve hayatım boyunca beni destekleyen, her zaman beni ileriye adım atmaya teŐvik eden, emeklerinin karŐılıĐını asla ÖdeyemeyeceĐim sevgili aileme sonsuz teşekkür eder ve bu tezi aileme ithaf ederim.

Duygu TURAN

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLERDİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER .....	3
2.1. <i>Bacillus</i> Türlerinin Genel Özellikleri.....	3
2.2. <i>Bacillus cereus</i> 'un Genel Özellikleri.....	5
2.3. <i>Bacillus cereus</i> 'un Taksonomisine Patojenitesi.....	5
2.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Genel Özellikleri .....	6
2.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Kullanım Alanları.....	7
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	11
3. MATERYAL ve METOD .....	12
3.1. Materyal.....	12
3.2. Metod.....	13
4. BULGULAR .....	16
4.1. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	18
KAYNAKLAR .....	25
ÖZGEÇMİŞ.....	29

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kisaltmalar	Açıklama
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
gr	Gram
ml	Mililitre
MYP agar base	Phenol Red Egg Yolk Polymyxin Agar Base
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
API	Analytical Profile Index (Analitik Profil Dizini)
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
DNTP	Deoksiriboz nukleosid trifosfat
V	Volt
NHE	Non-hemolytic enterotoksin
L1- L2	Litik bileşenler
B	Bağlayıcı bileşen
HBL	Hemolizin BL
bceT	<i>B. cereus</i> enterotoxin
cytK	Sitolisin K
entFM	Enterotoksin FM
PI-PLC	Fosfotidilinositol spesifik fosfolipaz
EntS	Enterotoksin
Smase	Sfingomiyelinaz
Clo	Cereolysin O
Cry	Crystal (kristal toksin)
Cyt	Cytolytic (sitolitik)
kDa	Kilodalton

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 3.1.</b> Petride <i>B. cereus</i>	21
<b>Şekil 3.2.</b> API 50CH testi görüntüsü	22





## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge: 2.1.</b> <i>B. cereus</i> 'in yol açtığı iki tip gıda zehirlenmesinin karakteristik özellikleri	8
<b>Çizelge: 2.2.</b> <i>B. cereus</i> 'un ürettiği üç enterotoksinin karakteristik özellikleri	9
<b>Çizelge: 2.3.</b> <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> 'in tanımlanmasında kullanılan karakteristik özellikler	10
<b>Çizelge:3.1.</b> Jel elektroforezde HBL ve NHE sonuçları	23
<b>Çizelge 3.2.</b> Jel elektroforezde CRY genlerinin varlığı	24



## 1. GİRİŞ

Gıda kaynaklı salgınlara bazı sanayileşmiş ülkelerde hayvansal orjinli besinlerdeki geleneksel problemlerle birlikte yeniden yükselişe geçtiği görülmektedir. Mikroorganizmaların değişen karakterleriyle, değişen üretim metodlarıyla, ekolojik değişimlerle ve artan küresel ticaret sebebiyle yeni risklerle karşılaşmaktadır. Besin zincirimiz ve mikroorganizmaların doğası nedeniyle gıda güvenliğini sağlamak için küresel çapta çeşitli tedbirler almak gerekmektedir (Havelaar ve ark., 2010).

*Bacillus* genusu genellikle gram pozitif ve aerob spor oluşturan bakteri türlerini içerir (Logan ve ark., 2011). Bu genustaki geniş fenotipik çeşitlilik ve türlerin ekolojik orjini *Bacillus* taksonomisini zorlaştırmıştır. Örneğin; *Bacillus cereus* grubu *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* ve *B. weihenstephanensis* olmak üzere 6 türden oluşmuştur (Maughan ve ark., 2011). Taksonomik sınıflandırmadaki zorluklara rağmen bir grup özel *Bacillus* türü endüstriyel uygulamalarda kullanılır. Buna ek olarak, iki *Bacillus* türü insanları kötü olarak etkiler: *B. cereus* ve *B. anthracis* gıda zehirlenmelerine sebep olan ajanlardır. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus pumilus* cinslerini içeren diğer bir *Bacillus* grubu gıda kaynaklı hastalıklara neden olurlar (From ve ark., 2007; Logan, 2012; Salkinoja-Salonen ve ark., 1999).

*Bacillus* cinsleri toprak, su ve çeşitli gıdalarda bulunurlar. *Bacillus anthracis* insan ve hayvanlarda şarbon hastalığına neden olur. *B. thuringiensis*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae* ve *B. sphaericus* biyolojik olarak böcek kontrolünde kullanılmaktadır. *B. cereus*'un bazı suşları ise insanlarda gıda zehirlenmesine neden olur.

*B. cereus* gıdalarda yaygın olarak bulunur. Bu organizma gıda zehirlenmelerinde geniş bir şekilde tanımlanmıştır (Kramer ve Gilbert, 1992; Stenfors ve ark., 2008). Bulantı, kusma vs. sebep olurlar (Stenfors ve ark., 2008). İshal tipi gıda zehirlenmesinde, zehirlenmeye enterotoksinler sebep olur (Beecher ve ark., Lund ve ark., 1997). Bu enterotoksinler vejetatif büyüme boyunca ince bağırsaklarda üretilir (Granum ve ark., 1994). İshal ve kusma tip gıda zehirlenmeleri de genellikle gıdalarda ısıtma işlemi gerektirir, hayatta kalan sporlarda zehirlenmeye yol açar. Isıtma işlemi spor gelişimine ve rekabetçi floranın yoksunluğuna sebep olmaktadır (Kramer ve ark., 1989). *B. cereus*'ün toksik etkisi hemolysin BL (HBL) ve non-hemolytic enterotoxin (NHE)

protein komplekslerinden (Guinebretiere ve ark., 2002) ve tek proteinler olan entFM (enterotoksin FM), cytK (sitolisin K) ve bceT (*B. cereus* enterotoxin), fosfotidilinositol spesifik fosfolipaz (PI-PLC), enterotoksin S (EntS), sfingomiyelinaz (SMase), cereolysin O (Clo), InhA1, NprA ve HlyII den kaynaklanmaktadır (Kramer ve Gilbert, 1992, Fagerlund ve ark., 2004, Stenfors Arnesen ve ark., 2008). Epitel hücrelerinin adhezyon ve invazyon özellikleri de *B. cereus* strainlerinin toksik etkisinin ortaya çıkmasında önemli rol oynarlar (Minnaard ve ark., 2004, 2007, 2013).

*B. cereus* kusma ve ishal olmak üzere iki tür zehirlenmeye sebep olan toksinler üretir. Emetik toksinler kusmaya sebep olurken enterotoksinler ise ishale sebep olmaktadır (Agata ve ark.,1994,1995). Dört amino asidin üç tekrar yapmasıyla oluşan emetik toksinler ‘cerelid’ olarak adlandırılır ve formülasyonu şöyledir: [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]<sub>3</sub>. Bu yapı dodecadepsipeptit olup moleküler ağırlığı 1.2 kDa dur. Ayrıca kimyasal olarak potasyum iyonofor valinomisin’e yakındır. Emetik toksinler ısıya, Ph’a ve proteolizise karşı dirençlidir.*B. cereus* gıda zehirlenmesine sebep olan hemolizin (HBL), nonhemolitik enterotoksin (NHE) ve sitotoksin K (CytK) olmak üzere üç farklı enterotoksin üretir (Granum, P. E. 2001). Hbl ve Nhe ‘in her ikisi de üç bileşen içerirken CytK tek bir bileşen içerir (Beecher ve ark. 1991, 1994).

*B. cereus*’a benzer olan *Bacillus thuringiensis*’in de enterotoksin ürettiği kaydedilmiştir (Jackson ve ark.,1995) ve gönüllü insan deneklerinde gıda zehirlenmesine sebep olduğu ortaya çıkmıştır (Granum ve ark.,1996).*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) tipik olarak aerobik ve gram pozitif bir bakteridir. Bazı böcekler için toksik olan parasporal kristal proteinleri üretirler (Lecadet ve ark., 1999). Sporulasyon boyunca *Bt*, *cry* ve *cyt* genleri tarafından kodlanan, *cry* ve *cyt* insektisidal kristal proteinlerini üretir (Bechtel ve Bulla, 1976). *Cry* toksinleri aminosit sekans homolojilerine göre temmuz 2009 a kadar 59 familya (*Cry* 1- *Cry* 59) olarak sınıflandırılmıştır. İlk işlevleri orta barsaktaki hedef membrana ve porlara girerek epitel hücreleri parçalamaktır. Bu protein grubu arasında 3-Domain *Cry* ailesi böcek pestisit olarak kullanılmaktadır (Bravo ve ark., 2007).*Bacillus thuringiensis* sık rastlanan spor oluşturan bir bakteridir (Swiecicka ve ark., 2008) ve dünya çapında zirai pestisitlerin kontrolünde ve insan hastalıkları vektörlerini kontrol etmekte kullanılır (Swiecicka ve ark., 2011). Bu türlerin patojeniteleri d-endotoksinler ya da kristal toksin (*Cry*) olarak bilinen yüksek oranda

larvisidal proteinlerinden oluşan kristallerden kaynaklanmaktadır. Bu proteinler spor oluşumu süresince sentezlenir. (Swiecicka ve ark., 2011).

*Cry* proteinlerinin çeşitliliği ve suşlarının ekolojisi iyi bilinmekle birlikte, vejetatif insektisidal proteinler gibi diğer entemosidal toksinler vejetatif büyüme boyunca sentezlenir (Schnepf ve ark. 1998; Swiecicka ve ark., 2008; Crickmore 2010, Estruch ve ark., 1996).

*Bacillus cereus* suşları patojenik yönden önemli olan birçok farklı enzim ve toksin salgılar. HBL ve NHE gıda zehirlenmesine neden olan üç enterotoksin içerir (Beecher ve ark., 1995, Granum ve ark., 2001). Bunlar: HBL A, HBL C, HBL D ve NHE A, NHE B ve NHE C'dir. HBL enterotoksin kompleksi bağlayıcı bileşenlerden (B) ve iki litik (L1 ve L2) bileşenden oluşur. Üç bileşende maksimum aktivite için geçerlidir. Diğer bir enterotoksin olan NHE ise non-hemolitik ve HBL enterotoksin kompleksi ile benzerliklere sahiptir (Kotiranta ve ark., 2000).

Bu çalışmada gıda katkısı ve lezzet verici olarak sıklıkla kullanılan baharatlarda ve fizikokimyasal kirlenme etkisinde kalmış toprak örneklerinde tespit edilen, gıdalarda bozulma ve gıda zehirlenmelerine sebep olan, *Bacillus* suşlarının izole edilmesi, tanımlanması ve toksikolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. *Bacillus* Türlerinin Genel Özellikleri

*Bacillus* adı, 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından ilk defa kullanılmıştır (Lin 1997). *Bacillaceae* familyasına dâhil olup, gram pozitif, aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir. Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrotrof ve termofilik türleri de vardır (Çon ve Gökalp 1997). Endospor oluşturlar. Vejetatif hücreler 0,5x1,2 µm ile 2,5x10 µm çapındadır. *Bacillus* cinsinin koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. *Bacillus*'larda, endosporun hücre içindeki yeri farklıdır. Spor, hücre merkezinde veya uçta, ayrıca, vejetatif hücreden daha dar olabildiği gibi, daha geniş de olabilir. Şekerleri fermente ederler ve sonuçta gaz oluşumu görülmeksizin asit üretirler. Proteinleri ise, amonyak oluşturarak parçalarlar ve böylece kokuşmaya neden olurlar. DNA'larındaki G+C mol oranı %32-62'dir (Çon ve Gökalp 1997). Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürer. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol

içeren; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Kaynar ve Beyatlı 2006).

*B. cereus* mannitol negatif olduğu için, MYP Agar besiyerinde pembe koloniler oluştururken, lesitinaz aktivitesi nedeni ile de koloni, etrafında presipitasyon (çökeltme) halkası oluşumuna neden olur. Ancak bu besiyerinde bazı dezavantajlar da vardır. İncelenecek gıda maddesinde mannitolü fermente ederek asit oluşturabilen farklı mikroorganizma grupları mevcut ise, *B. cereus* kolonilerinin karakteristik pembe renkleri azalır veya tamamıyla kaybolur. Bazı *Bacillus* türleri, çok az lesitinaz üretir veya hiç üretmezler. Bu türlere ait kolonilerin etrafında presipitasyon halkası gözlenmez. İdentifikasyon için her bir MYP Agar besiyerinden *B. cereus* olduğu tahmin edilen 5 veya daha fazla sayıda pembe renkli, lesitinaz pozitif koloni seçilir. Petri kutusundaki 20 koloni sayısı 5 adetten az ise, bulunan muhtemel kolonilerin tamamı alınır. Koloniler çok sayıda ve yığın halinde olup tek koloni seçimi mümkün değilse, MYP Agar besiyerinde bulunan 5 şüpheli koloniden tek koloni düşürebilmek için sürme yapılarak 30 °C'de 18– 24 saat inkübasyona bırakılır ve ardından muhtemel koloniler seçilir (Kaleli ve Özkaya 2000).

*Bacillus* türlerinin tanımlanması ve türler arasındaki farklılıkların belirlenmesi için spor ve sporangium morfolojileri temel alınmıştır. Buna göre *Bacillus* türleri 3 grupta toplanmıştır (Kalaylı ve Beyatlı 2006). Birinci grup *Bacillus* türleri kendi içlerinde A ve B olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki grupta gram pozitif olup sporlar elips veya silindirik şekilli, santral veya terminal konumludur. A grubu ve B grubu arasındaki fark ise A alt grubunda hücre genişliği 1 µm'den küçük, B alt grubunda ise 1 µm'den büyüktür. A alt grubuna örnek olarak *B. cereus*, *B. megaterium*, B alt grubuna örnek olarak ise *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus* ve *B. coagulans* verilebilir. İkinci grupta yer alan *Bacillus* türlerinde sporlar elips, santral ve terminaldir. Bu grupta yer alan türlere örnek olarak *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alvei*, *B. laterosporus* ve *B. brevis* verilebilir. Üçüncü grupta yer alan *Bacillus* türlerinde de sporlar küresel, subterminal ve terminal konumludur. *B. sphaericus* bu gruba örnektir.

*Geobacilluslar* çubuk şeklinde, anaerob veya fakültatif anaerobik ve endospor oluşturabilen bakterilerdir. Suşa bağlı olarak, ortalama büyüme sıcaklığı en az 35 °C en

fazla ise 80 °C 'dir. Fakat çoğu izolatları için 45- 70 °C arası sıcaklıklar gereklidir (Nazina ve ark,2001).

## **2.2. *Bacillus cereus*'un Genel Özellikleri**

*Bacillus cereus* 1 x 3-4 µm, büyük, gram pozitif, çubuk şekilli, endospor oluşturabilen fakültatif aerobik bir bakteridir(Vilain ve ark.,2006). Başarılı bir şekilde ilk olarak 1969 yılında ölümcül penomoniye yakalanmış erkek bir hastadan izole edilmiş ve kanda ve plevral sıvıda kültüre alınmıştır (Hoffmaster ve ark., 2006)*Bacillus cereus*daireysel bir kromozoma sahiptir. Genom yapısında 5481 gen, 5234 protein kodu, 147 yapısal RNA ve 5,366 RNA operonu bulunmaktadır (Anonim, 2007).

*Bacillaceae* familyasının *Bacillus* cinsine ait bir bakteri olan *Bacillus cereus*, toprak ve bitki örtüsü üzerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Santral veya subterminal yapıda, elipsoidal spora sahip olan bakteri, peritrik flagellaları sayesinde hareketli ve aerobiktir. Optimum gelişme sıcaklığı, suşlara göre 28–35 °C arasında değişmekle birlikte genellikle 30 °C 'dir. En yüksek üreme sıcaklığı yine suşlara göre 37–48°C arasında değişir. En düşük üreme sıcaklığı da suşa bağlı olarak 10–18°C arasındadır. Bazı kaynaklarda en düşük sıcaklık 4–5°C, en yüksek sıcaklık ise 50°C olarak verilmektedir. Spor germinasyonu için gereken optimum sıcaklık 30 °C, minimum -1°C ve maksimum 59 °C'dir. Gelişebildiği pH aralığı 4,9–9,3 olup optimum 7,0'dir. *Bacillus cereus*; lesitinaz, jelatinaz, proteaz ve amilaz aktivitesine sahip olup nitrat redüksiyonu pozitif ve polimiksine dirençlidir. *Cereus* adını tahıl anlamındaki *cereal*'dan alır (Sekin ve Karagözlü, 1997).

## **2.3. *Bacillus cereus*'un Taksonomik Olarak İncelenmesi ve Patojenitesi**

*Bacillus cereus* taksonomik olarak *Bacillus* genusuna aittir. *B. cereus* grubu altı farklı türe sahiptir: *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* ve *Bacillus anthracis*(Granum., 2010).

*Bacillus cereus* suşları patojenik yönden önemli olan birçok farklı enzim ve toksin salgılar. HBL ve NHE gıda zehirlenmesine neden olan üç enterotoksin içerir. Bunlar: HBL A, HBL C, HBL D ve NHE A, NHE B, NHE C ve sitotoksin K'dir (Beecher ve ark., 1995, Granum ve ark., 1999).

*B. cereus* 'un çok sayıda alınması ile bireylerde gıda zehirlenmesi görülebilir. Özellikle *B. cereus* ile kontamine olmuş gıdalar pişirildikten sonra yeterince ve hızlısoğutulmadıklarında veya gıdaların hazırlanması ile tüketimi arasındaki süre uzadığında, canlı ve ısıya dirençli olan sporların çimlenmesi sonucu mikroorganizma çoğalıp, gıda zehirlenmesine neden olabilecek düzeyde toksin oluşturabilir. Gıda zehirlenmeleri, gıdadaki bakteri sayısı  $\geq 10^6$ /g olduğunda ortaya çıkmaktadır (Sekin ve Karagözlü 1997).

*B. cereus* zehirlenmesinde aracı gıdalar olarak, pişmiş pirinç, makarna, et, kümes hayvanları, sebze yemekleri, çeşitli çorbalar, pudingler, baharat ve soslar sayılabilir. Ayrıca toprak kökenli olması nedeniyle tarla ve bahçe ürünlerine rahatlıkla bulaşabilen *B. cereus*, sporlu bir bakteri olduğu için et ve süt ürünlerinde de bulunabilir (Kaleli ve Özkaya, 2000).

#### **2.4. *Bacillus thuringiensis*'in Genel Özellikleri**

*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* kadar yaygın olup birçok fenotipik karakteri bulunan spor formunda bir bakteridir. Bu karakterler hareket, nutrient gereksinimleri, hemolitik aktivite ve ampicillin antibiyotiği dirençliliğidir. Sporulasyon boyunca ya da büyüme döngüsündeki durgun fazda *Bacillus thuringiensis* parasporal kristaller üretir. Bu bakterinin spesifik biyoaktivitesi bu kristallerin üretimidir. Cry proteinleri olarak bilinen bu kristaller polipeptid formundadır. Cry proteinleri böcekler üzerinde entomopatojenik etki gösterirler (Feitelson ve ark., 1992, Schnepf ve ark., 1998, Anonim 1999). Bu protein grubu arasında 3-Domain Cry ailesi böcek kontrolünde geniş çaplı olarak kullanılmaktadır (Bravo ve ark., 2007).

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) tipik olarak aerobik ve gram pozitif bir bakteridir. Cry toksinleri aminosit sekans homolojilerine göre Temmuz 2009 a kadar 59 familya (Cry 1-Cry 59) olarak sınıflandırılmıştı.

#### **2.5. *Bacillus thuringiensis*'in Kullanım Alanları**

Yarım yüzyıldan fazla süren sentetik pestisit uygulamaları tarımsal direncin ortaya çıkmasına ve bu direncin hızlı yayılmasına sebep olmuştur. Bu yayılmayla insanda hastalığa sebep olan ve çevreye zarar veren vektör organizmalar ortaya çıkmıştır. Bu kimyasalların doğada uzun süre kalma ve organizmaların geniş yelpazedeki

toksisitelerine uzun süre etki etmesi gibi birçok özelliği ciddi sorunları beraberinde getirmiştir (Marrone ve ark., Van Frankenhuyzen, K., 1993). Tarım ve orman zararlılarıyla insanlarda hastalığa sebep olan vektörlerle mücadelede çevreyle dost bir alternatif olarak görülen *Bacillus thuringiensis* kullanılmıştır (Lambert ve Peferoen 1992; Schnepf ve ark., 1998).*Bacillus thuringiensis*'in ürettiği insektisidal kristal proteinleri son 30 yıldır biopestisit olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bazı kristal proteinlerin bitki genomu içinde böcek saldırılarına karşı yüksek oranda koruma direncine sahip olduğu bilinmektedir (Perlak ve ark., 1990; Vaeck ve ark., 1987). *Bacillus thuringiensis*'in mikrobiyal insektisit olarak kullanılması kimyasal kontrol ajanlarına nazaran birçok avantaj sağlamıştır (Feitelson ve ark., 1992).





Dihareal sendrom	Emetik sendrom	
Hastalık yapıcı doz	$10^5 - 10^7$ (total)	$10^5 - 10^8$ (hücre $g^{-1}$ )
Toksin üretimi	Konağın ince bağırsağında	Hazır gıdalarda
Toksin tipi	Protein	Siklik peptid
İnkübasyon periyodu	8- 16 saat (nadiren > 24 saat)	0.5- 5 saat
Hastalığın devam süresi	12- 24 saat (nadiren birkaç gün)	6- 24 saat
Semptomlar	Karın ağrısı,sulu ishal,nadiren bulantı	Bulantı,kusma,halsizlik
Gıdalar	Etürünleri,çorbalar,sebzeler,pudingler	Kızartılmış ve pişirilmiş hamur işleri

**Çizelge: 2.1.B.** *cereus*'un yol açtığı iki tip gıda zehirlenmesinin karakteristik özellikleri(Granum ve ark., 1997)

**Çizelge: 2.2.B. cereus**'un ürettiği üç enterotoksinin karakteristik özellikleri(Granum ve ark.,1997)

	Enterotoxin HBL		Enterotoksin NHE		Enterotoksin T	
Birleşen sayısı		3	3	1		
Aktif komponentlerin boyutları (s)						
L <sub>2</sub>	46 kDa	45 kDa		41 kDa		
L <sub>1</sub>		38 kDa		39 kDa		
B		37 kDa		105 kDa		
Hemolitik		Var	Yok		Yok	
Test hücrelerindeki toksisite	80 ng		70 ng			Belirlenmedi
Gıda zehirlenmesi görülebilme			Var	Var	Yok	
Klonlanmış ve dizilenmiş	Var				Yok	Var

**Çizelge: 2.3.***B. cereus*, *B. thuringiensis*'in tanımlanmasında kullanılan karakteristik özellikler (Vilas ve ark., 2007)

<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	
Anaerobik büyüme	+	+
Katalaz aktivitesi	+	+
Sitrat kullanımı	+	+
Kazein hidrolizi	+	+
Nitrat indirgeme	+	+
Voges- Proskauer (VP) reaksiyonu	+	+
VP medyumundaki PH <6	+	+
% 7'lik NaCl içinde büyüme		+
60 °C de büyüme	-	-
Glikoz asidi	+	+
Glikoz asidi+ gazı	-	-
8 fazında parçalanma	-	-
Hareket	+	+
Kan agarda parçalanma		+
B-laktam antibiyotiğine dirençlilik	+	+
Glutamil-polipeptid kapsül-	-	-
Parasporal gövde	-	+

**Not:** -,negatif; +,pozitif. \*: %95'ten fazla suş.

## 2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), DNA replikasyonunun taklit edilmesi olarak kısaca tanımlanır. Bu işlemin tüp içerisinde hızlı bir şekilde ard arda olarak tekrarlanmasıyla başlangıç DNA miktarının milyon kat artırılması söz konusudur.

PZR'da yer alan bileşenler; amplifiye (çoğaltılacak) hedef DNA dizisini içeren *kalıp DNA*, amplifiye edilecek kalıp DNA'nın komplementeri olacak şekilde seçilmiş yaklaşık 20 bazlık sentetik kısa tek zincirli DNA molekülleri oligonükleotid *primerler*, termostabil karakterli *Taq DNA polimeraz*, enzimidir. Taq DNA polimerazın görevi DNA moleküllerinin komplementeriyle eşlenmesine yardımcı olup onların çoğaltılmasını sağlamaktır. İşlemin başlaması için kısa DNA dizilerine ihtiyaç vardır. Bunun içinde primerler kullanılır. *dNTP*'ler (ATP, GTP, TTP, CTP) Taq DNA polimerazın substratlarıdır. Primerler ile başlatılan çift sarmal oluşumu hedef zincirin DNA polimeraz tarafından dNTP'leri kullanılarak uzatılmasıyla devam eder.  $Mg^{+2}$  iyonu da işlemde kofaktör olarak önemlidir. Konsantrasyonu belli oranlarda (her primer için farklı) olmalıdır. Konsantrasyonu aşırı olursa hatalı eşleşmeler olur. Az olursa da yeterli miktarda eşleşme olmaz PZR işleminde hedef DNA'nın çoğaltılması 20-40 döngü arasında gerçekleşir. Her döngü farklı sıcaklıklardan oluşan 3 bölüm içerir. Bunlar; *denatürasyon*, kalıp DNA çift zincirinin açılması olup DNA tek zincirli haline gelir. *Annealing*, tek zincirli kalıp DNA'nın primerlerle birleşme adımıdır ve 50-60°C arasında gerçekleşir. *Extension*, DNA polimeraz enziminin maksimum aktiviteye sahip olduğu 72°C de gerçekleşir. Tek sarmal hedef DNA'nın komplementeri primerle zincir başlar ve Taq polimeraz ortamdaki dNTP'leri kullanarak zinciri uzatır. Tek iplikli DNA çift iplikli forma gelir. İşlem 20-40 döngü olarak bu 3 adımın tekrarıyla devam eder (Okutucu ve Pehlivan, 2003).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmada marketlerden temin edilen paketlenmiş çeşitli baharatlar olası *Bacillus* genusu türler ve özellikle *B. cereus* varlığı bakımından incelenmiştir. Bunun için Bialystok Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında 25 adet baharat örneğiyle çalışılmıştır. Yine olası fizikokimyasal kirlenme etkisinde kalmış toprak örnekleri de toksisite varlık ve tayini için kullanılmıştır.

Örnekler:

1. Karabiber ( *Piper nigrum* ) (black pepper )
2. Karabiber(*Piper nigrum* ) (black pepper)
3. Tatlı kırmızı toz biber ( *Capsicum annuum* ) (Sweet red pepper)
4. Acı kırmızı toz biber ( *Capsicum annuum* ) (hot red pepper)
5. Zencefil (*Zingiber officinale*) (imbir)
6. Kimyon (*Cuminum cyminum*) (cumin)
7. Kimyon (*Cuminum cyminum* ) (cumin)
8. Kimyon (*Cuminum cyminum*) (cumin)
9. Fesleğen (*Ocimum basilicum*)(basil)
10. Fesleğen (*Ocimum basilicum*) (basil)
11. Kekik (*Thymus vulgaris* )(thymus)
12. Kırmızı toz biber (*Capsicum Annum*) (red pepper)
13. Karabiber (*Piper nigrum*) (black pepper)
14. Karabiber (*Piper nigrum*) (black pepper)
15. Karabiber (*Piper nigrum*) (black pepper)
16. Karabiber (*Piper nigrum*) (black pepper)
17. Çili biberi (Chile pepper)
18. Adaçayı (*Salvia officinalis*) (common sage)
19. Nane (*Mentha piperita*) (mint)
20. Mercanköşk (*Origanum majorana*) (sweet marjoram)
21. Pizza baharatı (pizza spices)
22. Defne (*Laurus nobilis*) (laurel)

23. Çeşitli otlar (mixed herbs)
24. Karabiber (*Piper nigrum*) (black pepper)
25. Karabiber (*Piper nigrum*) (black pepper)

Çalışmada kullanılan *Bacillus* türleri analizi için MYP agar hazırlanmıştır. MYP agar için kullanılan materyaller aşağıda sıralanmıştır.

- 21,5 gr MYP agar base ( x 5)
- 475 mL H<sub>2</sub>O ( x 5)
- Otoklav ( 1.5 h , 100 – 121 °C)
- Sterilizasyon 50 °C, after 80 °C
- Egg yolk emülsiyonu
- Antibiyotik

Tartılan 21,5 gr MYP agar base ve 475 mL H<sub>2</sub>O agarın suda çözünmesi için çalkalanmıştır. Daha sonra otoklavda 25 °C bekletildikten sonra sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Hazırlanan egg yolk emulsion'u antibiyotik eklendikten sonra agar steril olan petrilere dökülmüş ve agarın soğuması beklenmiştir. Hazırlanan petrilere mevcut baharat örneklerinin ekimi için sodyum klorid çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti için,

- 200 mL distile su
- 1.7 g sodyum klorid kullanılmıştır.

### 3.2. Metod

*B.cereus* yönünden analiz edilmek üzere Bialystok Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilen numuneler için 200 mL distile su ve 1.7 g sodyum klorid karıştırıldıktan sonra cam tüplerin her birinde 900 µl sodyum klorid çözeltisi ve 0.09 g baharat numunesi olacak şekilde 60 cam tüp hazırlanmıştır. Hazırlanan bu tüpler 30 dakika boyunca çalkalanmıştır. Hazırlanan sodyum klorid ve baharat solusyonundan ilk petriye % 10'luk, ikinci petriye % 1'lik ve üçüncü petriye % 0.1'lik olmak üzere seyreltilerek her örnek için 3 petri olacak şekilde MYP agar'a yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petriler 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petriler incelenerek koloni sayımı ve tanımlanması yapılmıştır. Çeşitli baharat

örneklerinde *B. cereus* taranması yapıldıktan sonra seçilen 12 petri kabındaki koloniler API 20E ve API 50CH (Biomerieux) testine tabi tutulmuştur.

Koloni sayımı;

% 1	% 10	% 0.1
0.01g- 1ml	0.1 g- 1 ml	0.001 g- 1ml
10 mg 1000µl	100 mg 1000µl	1 mg 1000 µl
1 mg 100 µl	10 mg 100 µl	0.1 mg 100 µl

hesabıyla yapılmıştır.

Örneğin; 10 mg' da 4 bakteri varsa 1 mg' da 0.4 bakteri vardır.

*B. cereus*'un toksisitesini çalışmak için Çernobil nükleer santrali patlaması sonrası nükleer serpinti etkisinde kalmış olan ve hazır preparat halinde temin edilen toprak örneği kullanılmıştır. Bu işlem için MYP agar içeren 14 tane petri kabı kullanılmıştır. Ekim yapılan bu petriler 37 C<sup>0</sup> de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu üreme görülen petri materyali DNA izolasyonu, PCR ve jel elektroforez uygulamasına tabi tutulmuştur.

NHE A, NHE B, NHE C ve HBL A, HBL C, HBL D genleri *B. cereus*; CRY 1, CRY 2, CRY 4 ve CRY 9 genlerinin varlığı ise *B. thurigiensis* primerleri tasarlanarak araştırılmıştır. Çalışılan NHE için 15505G HD1, HBL için ATCC 14579 genleri, CRY1, CRY2 için 15505G HD1, CRY4 için ONRGO ve CRY9 için HD133 genleri pozitif kontrol olarak belirlenmiştir.

Cry genleri primer dizileri aşağıdaki gibidir,

<b>Cry 1</b>	<b>Tm</b>	<b>Product</b>
<b>(bp)</b>		
Un1(d), CATGATTCATGCGGCAGATAAAC	55.2	276
Un1(r), TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT	54.5	
<b>Cry 2</b>		
Un2(d), GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG	52.8	700
Un2(r), CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT	51.1	

#### **Cry 4**

Un4(d), GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC	52.2	439
Un4(r), GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC	50.2	

#### **Cry9**

Un9(d), CGGTGTTACTATTAGCGAGGGCGG	60.2	354
Un9(r), GTTTGAGCCGCTTCACAGCAATCC	58.2	

Genomik DNA, *B. cereus* ve *B. thuringiensis* suşlarından izole edilen hazır solüsyonlar şeklinde temin edilmiştir.

PZR'ın amplifikasyon reaksiyonu için 7.7 µl H<sub>2</sub>O, 1.5 µl buffer, her bir primerden 1.5 µl, 1.5 µl DNTP ve 1.2 µl MgCl<sub>2</sub> ve Taq polimeraz kullanılmıştır. Her bir DNA için amplifikasyon için hazırlanan solusyondan 13.5 µl ve her bir DNA'dan 1.5 µl falcon tüplere alınmış ve PZR'a başlanmıştır. PZR işleminden sonra jel elektroforez yöntemiyle hangi genler olup olmadığı saptanmıştır.

PCR da her bir gen için ayrı ayrı annealing sıcaklığı belirlenmiştir. Annealing sıcaklığı CRY 1 için 60 °C, CRY 2 için 58 °C, CRY 4 için 57 °C, CRY 9 için 64 °C olarak belirlenmiştir. Her bir PCR basamağı için de belli bir sıcaklık ve zaman belirlenmiştir.

Jel elektroforez işleminde kullanılacak jeli hazırlamak için 1,2 g agar, 120 µl buffer kullanılmıştır. Yapılan karışım mikrodalga fırında hızlıca kaynatılıp soğutulduktan sonra jel kabına dökülerek kalıbın şeklini alması sağlanmıştır. Jel elektroforezi her bir PZR için 70 V 'da yaklaşık 2 saat yürütülmüştür.



#### 4. BULGULAR

Yayma ekim yöntemiyle ekim yapılan petrilere *B. cereus* pembe renkli koloniler oluşturmuştur. 25 baharat numunesinden alınarak yapılan ekimlerde yalnızca *Piper nigrum* (karabiber) ekstratı ekili olan %1 'lik seyreltilmiş 1.petrilde *B. cereus* yoğun bir şekilde görülmüştür. Diğer petrilere *B. cereus*'un yanısıra genellikle sarı renkli, parlak ve sulu koloniler kaydedilmiştir. *B. cereus* 'unda petrilere gözlenen sarı renkli, parlak ve sulu olarak tanımlanan kolonilerin hangi bakteri türüne veya türlerine ait olduğu saptamak için herhangi bir analiz yapılmamıştır. Bütün petrilere 24 saat inkübasyon sonucu presipitasyon halkasının olduğu gözlenmiştir. *B. cereus* kolonilerinin çoğunlukla % 10'luk ve % 1'lik seyreltmelerde gözlenmesine rağmen birkaç % 0,1'lik seyreltme yapılan petrilere de *B. cereus* üremesi saptanmıştır ancak *B. cereus* petrilere diğer kolonilerle birlikte olup sayılamayacak derecede olduğundan yalnızca 1 numaralı *Piper nigrum* (karabiber) ekstratı ekili % 1'lik seyreltilmiş petriden *B. cereus* kolonisi elde edilmiştir. Elde edilen bu *Bc* kolonisi seyreltilmek üzere yeni bir MYP agar içeren petriye yayma ekim yöntemiyle ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonucunda petrideki kolonilerin tek tek düşmesiyle bir koloniye API 50 CH testi uygulanmıştır. API 50 CH testinde 24 saatlik inkübasyondan sonra sonuçlara bakılmıştır. Bu teste göre sarı renkli tüpler pozitif (+) *B. cereus* varlığına işaret etmektedir. Pembe renkli koloniler ise negatif (-) olarak yorumlanmıştır. API 50 CH testindeki pembe ve sarı kolonilerin hangi *Bacillus* cinslerine ait olduğu API 20 E testiyle belirlenmiştir. API 20 E test sonuçlarında *B. cereus* dışında bazı *Bacillus* cinslerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre % 99 oranında *B. pumilus*, *B. subtilis* saptanmıştır. % 0,1'lik kısım *B. lentus*, *B. laterosporus* ve % 26 oranında ise *Geobacillus* varlığı gözlenmiştir. API 20 E test sonuçlarına göre hangi petrilere hangi *Bacillus* türleri olduğu yüzde olarak aşağıda verilmiştir.

- 1 no'lu petri : % 99 *Bacillus pumilus* - %0.1 *Bacillus lentus*
- 3 no'lu petri : % 99.9 *Bacillus pumilus* - %0.1 *Bacillus lentus*
- 9 no'lu petri : % 99.5 *Bacillus pumilus* - % 0.2 *Brevibacillus laterosporus*

- 12 no'lu petri : % 99.8 *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* - % 0.1 *Bacillus megaterium*
- 13 no'lu petri : % 62.7 *Brevibacillus laterosporus* - % 26.1 *Geobacillus thermoglucosidasius* - % 3.9 *Bacillus cereus*
- 14 no'lu petri : % 99.9 *Bacillus pumilus* - % 0.1 *Brevibacillus laterosporus*
- 15 no'lu petri : *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* - *Geobacillus thermoglucosidasius*
- 16 no'lu petri : % 99 *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* - % 0.7 *Geobacillus stearothermophilus*
- 19 no'lu petri : %99.9 *Bacillus pumilus* - % 0.1 *Brevibacillus laterosporus*

*Bacillus* suşlarının toksisitesine yönelik çalışma daha önce belirttiğimiz üzere nükleer radyasyon serpintisi etkisinde kalmış bir alandan temin edilen toprak örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaç ile 14 tane petri kabı MYP agar dökülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan petrilere hazır olarak temin edilen DNA solusyonu, PZR ve jel elektroforez çalışmalarında kullanılmıştır. NHE, HBL ve CRY genlerinin varlığı bu DNA solusyonları çalışılarak saptanmıştır. Bu genlerin varlığı çalışılan suşların toksik özellikte olduğunu göstermiştir. Hazırlanan 14 petri kabından 13 tane *Bacillus* suşu elde edilmiştir. Elde edilen bu 13 *Bacillus* suşu ağırlıklı olarak *B. cereus* ve *B. thuringiensis*'tir. CRY 1, CRY 2, CRY 4 ve CRY 9 genleri *B. thuringiensis* de bulunmaktadır. Çizelge 3.2' deki jel elektroforez sonuçlarında HBL A, HBL C, HBL D, NHE A, NHE B, NHE C genlerinin (+) işaretiyle gösterildiği suşlar toksik özellik göstermektedir. Aynı zamanda çizelge 3.3' te gösterilen jel elektroforez sonuçlarında da CRY genlerinin varlığı (+), yokluğu ise (-) işaretleriyle gösterilmiştir.

#### 4.1. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, marketlerde ambalajlı olarak satılan farklı markalardan temin edilen baharatlar ve çeşni verici otlar *B. cereus* varlığı bakımından, nükleer serpinti etkisinde kalmış toprak örneği *Bacillus* suşlarının toksik özellikleri yönünden incelenmiştir. Farklı markaların karabiber, tatlı-acı kırmızı toz biber, zencefil, kimyon, kekik, çili biberi, pizza baharatı ürünleri ile nane, mercanköşk, adaçayı, fesleğen gibi hazır olarak satılan kuru otlarda *B. cereus* aranması, sayımı ve identifikasyonu yapılmıştır. Nükleer serpintili toprak örneğinde ise *Bacillus* türlerinin toksisitesine hangi genlerin sebep olduğu araştırılmıştır.

Ülkemizde Temelli ve Şanar'ın (2002) yaptığı çalışmada yaygın olarak tüketilen çeşitli baharatların ve çeşni verici otların *B. cereus* varlığı yönünden kontaminasyon düzeyini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada, toplam 105 adet baharat ve ot örneği bu mikroorganizma yönünden incelenmiştir. İncelenen baharat ve çeşni verici otlarda, *B. cereus* sayısının ortalama olarak  $10^2-10^5$  kob/g düzeyinde bulunmuştur. *B. cereus* ile en yüksek kontaminasyon düzeyinin kırmızı toz biber, pul biber, karabiber, nane ve zencefil örneklerinde olduğu saptanmıştır. Ayrıca kırmızı toz biber, pul biber, karabiber, kişniş, zencefil ve kekik örneklerinin tamamının değişen düzeylerde *B. cereus* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Boer ve ark. (1995), Hollanda'da 3 farklı satış noktasından aldıkları 54 farklı baharat, ıtırılı bitki ve baharat karışımından oluşan 150 örneği mikrobiyolojik yönden incelemişlerdir. Araştırmacılar *B. cereus* sayısını baharat karışımı, zencefil ve beyaz biberde  $> 104$  kob/g düzeyinde tespit etmişlerdir. Banerjee ve Sarkar (2003) Hindistan'ın 20 eyaletindeki 27 satış noktasından topladıkları tane karabiber, toz karabiber, kimyon, kişniş, zencefil, sarımsak, frenk kimyonu, kırmızı chili biberinden oluşan 154 çeşit baharat ve ıtırılı bitki numunesini mikrobiyolojik yönden incelemişlerdir. *B. cereus*, *C. perfringens*, *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*, sırasıyla örneklerin % 85, % 59, % 11 ve % 85'inde tespit edilmiştir. *B. cereus* toz karabiber, frenk kimyonu, sarımsak ve kırmızı acı biberde tespit edilmemiş, ancak küçük kakule ve toz kimyon örneklerinin tümünde tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada sayılamayacak kadar çok koloni olmasının yanısıra bazı petrilere hiç üreme görülememesine istinaden sağlıklı bir koloni sayımı yapılamamıştır.

API 50 CH testi yayma yöntemiyle MYP agara ekim yapılan petrilerden karabiber (*Piper nigrum*) ekili %1'lik seyreltilmiş petriden izole edilen pembe renkli koloniye uygulanmıştır. API (analytical profile index) testi hızlı bir tanımlamayla bakteri sınıflandırılmasında kullanılan bir yöntemdir. API 50 CH testi mikroorganizmaların karbonhidrat metabolizmasını belirlemek için yapılan çalışmalarda 50 biyokimyasal testle ilişkilendirilen standart bir sistemdir. API 20E testi gram negatif enterobakter veya non-enterobakter organizmaları tanımlama da kullanılan bir yöntemdir. API 20 E test sonuçlarında *Bc* dışında varlığı saptanan *Bacillus* türleri sonuç bölümünde verilmiştir.

Liang H. ve ark. (2011) Çin'in Sichuan havzasının farklı yerlerinden ve vejetasyonlarından izole ettikleri 791 *Bt* izolatını CRY2 tip genlerinin varlığını analiz etmek için kullanmışlardır. SDS-PAGE ve SEM metodlarıyla suşların ihtiva ettiği CRY2 tip genlerini karakterize etmişlerdir. Elde edilen sonuçlarda *Bt* suşlarının CRY proteinlerine sahip olduğu kaydedilmiştir.

Swiecicka ve ark.'nin (2013) Polonya'nın kuzeydoğusundaki Białowieza ve Biebrza milli parklarıyla Jasienowka'da bir çiftlikten temin ederek çalıştıkları toprak örneklerinde *Bacillus* türleri farklı yoğunlukta dağılımlar göstermiştir. Ayrıca *Bc* ve *Bt* her örnekten izole edilmiştir ancak *B. mycoides* çiftlik toprağı ve bataklık numunelerinde saptanmıştır. Çalışmamızdaki bulgularda ise nükleer serpintili toprak örneğı kullanmamıza rağmen izole edilen örneklerin çoğı *Bt* ve *Bc* olarak saptanmıştır. Bazı *Bacillus* türlerinin gıda zehirlenmelerine yol açtığı bilinmektedir. Gıda zehirlenmelerine sebep olan genlerin varlığı ile ilgili de çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Guinebretiere ve ark. gıda zehirlenmesine sebep olan HBL ve NHE genlerinin varlığını araştırmıştır. Araştırmacılar, *Bc* ile kontamine olmuş bazı hazır pişmiş gıdalardan ve sebzelerden HBL ve NHE genlerini izole etmeye çalışmışlardır. Çalışmalar sonucunda elde edilen *Bc* suşlarında HBL (A, C, D) ve NHE (A, B, C) genlerinin varlığı saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada, elde ettiğimiz *Bacillus* suşlarının ağırlıklı olarak *B. cereus* ve *B. thuringiensis* olduğunu saptadıktan sonra bu suşlarda HBL, NHE ve CRY genlerinin varlığı belirlenmiştir. Ortaya çıkan sonuçlarda suşların tamamına yakınında bu genlerin varlığına rastlanmıştır.

Sonuç olarak incelenen baharat ve otlarda sayılamayacak kadar çok *B. cereus* kolonisine rastlanması her ne kadar ambalajlı da olsa baharatların bu bakteriyle kontamine

olduğunu göstermektedir. API 50 CH ve 20 E test sonuçlarına göre incelenen baharatlarda *B. cereus* dışında da farklı *Bacillus* türleri olduğu gözlenmiştir. Çalışılan nükleer serpintili toprak örneğinde de toksik özellik gösteren türlerin bulunması da *Bacillus* türlerinin ne kadar geniş bir alana yayıldığının göstermektedir.





Şekil 3.1.Petride *B. cereus*



Şekil 3.2. API 50CH Testi görüntüsü

**Çizelge 3.1.**Jel elektroforezde HBL ve NHE genlerinin varlığı

NO	STRAIN	HBL A	HBL C	HBL D	NHE A	NHE B	NHE C
1	BC BYD1-1	+	+	+	+	+	+
2	BC BYD1-2	+	+	+	+	+	-
3	BC BYD2-1	+	+	+	+	+	+
4	BC BYD2-2	+	+	+	+	+	+
5	BC BYD2-3	+	+	+	+	+	+
6	BC BYM1-2	+	+	+	+	+	-
7	BC BYM2-1	+	+	+	+	+	+
8	BC BYM2-2	+	+	+	+	+	+
9	BC BYM2-3	+	+	+	+	+	-
10	BC BYM2-4	+	+	+	+	+	-
11	BM BYD1-U3	+	+	+	+	-	-
12	BM M1-U2	+	+	+	+	+	-
13	BM BYM2-U1	+	+	+	+	-	-
14	Positif Kontrol	+	+	+	+	+	+
15	Negatif Kontrol	-	-	-	-	-	-



**Çizelge 3.2.**Jel elektroforezde CRY genlerinin varlığı

NO	STRAIN	CRY1	CRY2	CRY4	CRY9
1	BC BYD1-1	+	+	-	+
2	BC BYD1-2	+	+	+	+
3	BC BYD2-1	+	+	+	+
4	BC BYD2-2	+	+	+	+
5	BC BYD2-3	+	+	+	+
6	BC BYM1-2	+	+	+	+
7	BC BYM2-1	+	+	+	+
8	BC BYM2-2	+	+	+	+
9	BC BYM2-3	+	+	+	+
10	BC BYM2-4	+	+	+	+
11	BM BYD1-U3	+	+	+	+
12	BM M1-U2	+	+	-	+
13	BM BYM2-U1	+	+	+	+
14	Positif Kontrol	+	+	+	+
15	Negatif Kontrol	-	-	-	-

## KAYNAKLAR

- Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtari, I., Isobe, M. 1994.** A novel dodecadepsipeptide, cereulide, Hep-2 cells. *Fems Microbiol. Lett.* 121,31-34.
- Agata, N., Ohta, M., Arakoawa, Y., Mori, N. 1995.** The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiology* 141, 983-988.
- Anonim, 1999.** International Programme on Chemical Safety (IPCS): Microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. WHO ( World Health Organization). *Environ.Health Criteria*, 217: 1-105.
- Anonim, 2007.** *Bacillus cereus*. NCBI website. Accessed on August 18, 2007.
- Banerjee, M., SARKAR, K. P. 2003.** Microbiological Quality of Some Retail Spices in India. *Food Res. Int.* 36: S 469-474.
- Bechtel, D.B., Bulla, L.A. JR. 1976.** Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J Bact.*, 127: 1472-1481.
- Beecher, D. J., MacMillan, J.D. 1991.** Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 59, 1778–1784.
- Beecher, D. J., Wong, A. C. 1994.** Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 62, 980–986.
- Beecher, D. J., Pulido, J. S., Barney, N. P., Wong, A. C. 1995.** Extracellular virulence factors in *Bacillus cereus* endophthalmitis: methods and implication of involvement of hemolysin BL. *Infect. Immunol.* 63, 632–639.
- Beecher, D.J., Wong, A.C.L, 1997.** Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interaction and model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J. Biol. Chem.* 272, 233-239
- Boer, E., Spielenberg, W. M., Janssen, F. W. 1995.** Microbiology spices and herbs. *Antonie van Leeuwenhoek.* 51: S 435-438.
- Bravo, A., Sarjeet S. Gill, Mario Soberón. 2007.** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4): 423–435.
- Bukhari, D.A., Shakoori, A.R. 2010.** Isolation and Molecular Characterization of cry4 Harboring *Bacillus thuringiensis* Isolates from Pakistan and Mosquitocidal Activity of their Spores and Total Proteins.
- Crickmore, N. 2010.** *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. URL [www.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).
- Çon, A. H., Gökalp, H. Y. 1997.** Gıda Mikrobiyolojisi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Notları Yayın no: 007, 23 s. Mühendislik Fakültesi Basım Ünitesi. Denizli.
- De Barjac, H., Bonnefoi, A. 1962.** Essai de classification biochimique et serologique de 24-souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. *Entomophaga* 7, 5-31.
- De Barjac, H., Franchon, E. 1990.** Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga* 35, 233–240.
- Estruch, J.J., Warren, G.G., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A. 1996.** Vip3A, a Novel *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein with a Wide Spectrum of Activities against *Lepidoptera* Insects, Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 93, 5389\_5394.

- Fagerlund, A., Ween, O., Lund, T., Hardy, S.P., Granum, P.E. 2004.** Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* 150, 2689e2697.
- Feitelson, J. S., Payne, J., Kim, L. 1992.** *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio. Technology* 10: 271-275.
- From, C., Hormazabal, V., Granum, P.E. 2007.** Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 319–324.
- Granum, P.E. 1994.** *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 76, 61S-66S.
- Granum, P.E., Anderson, A., Gayther, C., te Giffel, M.C., Larsen, H., Lund, T., O’Sullivan, K. 1996.** Evidence for a further enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *Fems Microb. Lett.* 141,145-149.
- Granum, P.E., Lund, T. 1997.** *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems Microbiology Letters* 157, 223-238.
- Granum, P.E., O’Sullivan, K., Lund, T. 1999.** The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *Fems Microbiol. Lett.* 177: 225-229.
- Granum, P. E. 2001.** *Bacillus cereus*. Food microbiology: fundamentals and frontiers.p. 373–381. ASM Press, Washington, D.C.
- Guinebretiere, M.H., Broussolle, V., Nguyen-The, C. 2002.** Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3053e3056.
- Havelaar, A.H., Brul, S., Jong, A., Jonge, R., Zwietering, M.H., Kuile, B.H. 2010.** “Future challenges to microbial food safety.” *International Journal of Food Microbiology* 139; S79–S94.
- Hoffmaster, A., Hill, K., Gee, J., Marston, C., Popovic, D.B., Sue, T., Wilkins, D., Avashia, P., Drumgoole, S., Helma, R., Ticknor, C., Okinaka, L.R., Jackson, J. 2006.** “Characterization of *Bacillus cereus* Isolates Associated with Fatal Pneumonias: Strains Are Closely Related to *Bacillus anthracis* and Harbor *B. anthracis* Virulence.” *Journal of Clinical Microbiology*. Volume 44(9). p. 3352-3360.
- Hoton, F.M., Andrup, L., Swiecicka, I., Mahillon, J. 2005.** The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. <http://mic.sgmjournals.org-28.03.2015>.
- Ibrahim, M., Griko, N., Junker, M., Bulla, LA. 2010.** *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs* 1 (1):31-50.
- Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Ahmed, R., Kasatiya, S. 1995.** *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 103-105.
- Kalaylı, E., Beyath, Y. 2003.** *Bacillus* cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB üretimleri ve Plazmid DNA'ları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi.* 01(12), 24–35.
- Kaleli, D., Özkaya, F. 2000.** *Bacillus cereus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, 395–401.
- Kaynar, P., Beyath Y. 2006.** Balıklardan İzole Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi,* 4(3), s.1-30.
- Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. 2000.** Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect,* 2:189–198.

- Kramer, J.M., Gilbert, R.J. 1989.** *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Foodborne Bacterial Pathogens ( Doyle, M.P., Ed), pp. 21-70. Marcel Dekker, New York.
- Kramer, J.M., Gilbert, R.J. 1992.** *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: Tu, A.T. (Ed.), Food Poisoning. Handbook of Natural Toxins, vol. 7. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Lambert, B., and M. Peferoen. 1992.** Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience* 42:112–122.
- Lecadet, M.M., Frachon, E., Dumanoir, V.C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P., Thiéry, I. 1999.** Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* 86, 660–672.
- Liang, H. ve ark. 2011.** Characterization of cry2-type genes of *Bacillus thuringiensis* strains from soil isolated of sichuan basin. China, *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011 Jan; 42(1):140-6.
- Lindbäck, T., Granum, P.E. 2010.** Detection and Purification of *Bacillus cereus* Enterotoxins. *Methods in Biotechnology*, Vol. 21: Food-Borne.
- Lin, S. 1997.** Identification of Contamination Sources of *B. cereus* in Pasteurized Milk. A Thesis Presented to Faculty of Graduate Studies of University of Guelph. 109 p. Canada.
- Logan, N.A., Halket, G. 2011.** Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endospore-Forming Bacteria. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 1–29.
- Logan, N.A. 2012.** *Bacillus* and relatives in food borne illness. *J. Appl. Microbiol.* 112, 417–429.
- Lopez, A.C., Minnaard, J., Perez P.F., Alippi, A.M. 2015.** A case of intoxication due to a highly cytotoxic *Bacillus cereus* strain isolated from cooked chicken. *Food Microbiology*, 46 195-199.
- Lund, T., Granum ve P.E. 1997.** Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strain of *Bacillus cereus*. *Microbiology* 143, 3329-3339.
- Marrone, P. G., MacIntosh, S.C. 1993.** Resistance to *Bacillus thuringiensis* and resistance management. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom. 221–235 s.
- Maughan, H., Auwera, G.V. 2011.** *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect. Genet. Evol.* 11, 789–797.
- Minnaard, J., Lievin-Le Moal, V., Coconnier, M., Servin, A., Perez, P.F. 2004.** Disassembly of F-Actin cytoskeleton after interaction of *Bacillus cereus* with fully differentiates human intestinal caco-2 cells. *Infect. Immun.* 72, 3106e3112.
- Minnaard, J., Delfederico, L., Vasseur, V., Hollmann, A., Rolny, I., Semorile, L., Perez, P.F. 2007.** Virulence of *Bacillus cereus*: a multivariate analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 197-206.
- Minnaard, J., Rolny, I.S., Perez, P.F. 2013.** Interaction between *Bacillus cereus* and cultured human enterocytes: effect of calcium, cell differentiation, and bacterial extracellular factors. *J. Food Prot.* 76, 820e826.
- 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., 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* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 433–446.

**Okutucu, B., Pehlivan S. 2003.** Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. 12:138

**Papazisi, L., Rasko, D.A., Ratnayake, S., Bock, G.R., Remortel, B.G., Appalla, L., Liu, J., Dracheva, T., Braisted, J. C., Shallom, S., Jarrahi, B., Snesrud, E. 2011.** Investigating the genome diversity of *B. cereus* and evolutionary aspects of *B. anthracis* emergence. *Genomics* 98; 26–39.

**Perlak, F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T., Fishhoff, D. A. 1990.** Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8:939- 943. *Environ. Microbiol.* 54:2010-2017.

**Quesada-Moraga, E., García-Tóvar, E., Santiago-Alvarez, C. 2004.** Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain. *Microbiological Research* 159; 59-71.

**Salkinoja-Salonen, M.S., Vuorio, R., Andersson, M.A., Kämpfer, P., Andersson, M.C., Honkanen-Buzalski, T., Scoging, A.C. 1999.** Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4637–4645.

**Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 775\_806.

**Sekin, Y., Karagözlü, N. 1997.** Gıda Mikrobiyolojisi Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar. Literatür yayınları, İstanbul. s 358.

**Stenfors, A., Fagerlund, L.P., Granum, P.E. 2008.** From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems Microbiol. Rev.* 32, 579e606.

**Swiecicka I., Bideshi D.K., Federici B.A. 2008.** Novel isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* that produces a quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to larvae of *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:923–930.

**Swiecicka I., Sztachelska M., Czajkowska M., Bideshi D.K., Federici, B.A. 2011.** Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from soil and small mammals that harbour vip3A gene homologues. *Biocontrol Sci Technol*, vol. 21(4), s. 461-473.

**Swiecicka, I., Drewnowska, J.M. 2013.** Eco-Genetic Structure of *Bacillus cereus* sensu lato Populations from Different Environments in Northeastern Poland. *Plos One* 8(12): e80175.

**Temelli, S., Anar, Ş. 2002.** Bursa’da Tüketime Sunulan Baharat ve Çeşni Verici Otlarda *Bacillus cereus*’un Yaygınlığı. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.* 28 (2) . 459-465.

**Vaeck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansens, S., DeBeuckeller, M., Dean, C., Zabeau, M., Montagu M.V., Leemans., J. 1987.** Gene Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* (London) 328: 33-37.

**Van Frankenhuyzen, K., J. L. Gringorten, D. Gauthier, R. E. Milne, L. Masson, and M. Peferoen. 1993.** Toxicity of activated CryI proteins from *Bacillus thuringiensis* to six forest *Lepidoptera* and *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 62:295–301.

**Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M., Brozel. 2006.** V. Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Applied Environmental Microbiology*. volume 72(7). p. 4970–4977.

**Vilas-Bôas, G.T., Peruca, A.P.S., Arantes, OMN. 2007.** Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* 53: 673-687.

**Zhao, X., Zhou, Z.J., Han, Y., Wang, Z.Z., Fan, J., Xiao, H.Z.2013.** Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. *Microbiological Research*, 168;598– 606.



Adı Soyadı : Duygu TURAN  
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul 04.07.1986  
Yabancı Diller: İngilizce, Lehçe

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl) : Üniversite ( Ege Üniversitesi 2012)  
Lise : Mareşal Fevzi Çakmak Lisesi 2003  
Lisans : Ege Üniversitesi 2012

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Kavaklıdere Şarapları A.Ş. 2015  
İletişim (e-posta) : duyguturan35@gmail.com

