

**ANKARA'DAKİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS*
TÜRLERİNİN TANIMLANMASI, MOLEKÜLER DÜZEYDE
TİPLENDİRİLMESİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Fatma ÖZTÜRK

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2007

ANKARA

Fatma ÖZTÜRK tarafından hazırlanan ANKARA'DAKİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* TÜRLERİNİN TANIMLANMASI, MOLEKÜLER DÜZEYDE TIPLENDİRİLMESİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Leyla AÇIK
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: : Prof. Dr. Ayhan TEMİZ

Üye : Prof. Dr. Leyla AÇIK (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Turan GÜVEN

Üye : Prof. Dr. Mesude İŞCAN

Üye : Prof. Dr. Sibel SÜMER

Tarih : 12/07/2007

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Fatma ÖZTÜRK

**ANKARA'DAKİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS*
TÜRLERİNİN TANIMLANMASI, MOLEKÜLER DÜZEYDE
TİPLENDİRİLMESİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ
(Doktora Tezi)**

Fatma ÖZTÜRK

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2007**

ÖZET

Araştırmada Ankara'nın farklı yerlerinden alınan toprak örneklerinden *Bacillus* türlerine ait toplam 60 bakteri izole edilerek, Analitik Profil İndeks (API) test kitleri ile tanımlanmıştır. Biyolojik kontrolde kullanılan *Bacillus thuringiensis* türlerinin tanımlanması 16S rRNA dizi analizi ile yapılmıştır. İzolatların toplam hücre proteinleri izole edilmiş ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile analiz edilmiştir. Her bir izolata ait protein bantları birbiri ile karşılaştırılarak POPGEN istatistik programında izolatlar arasındaki genetik uzaklıklar hesaplanmış ve dendrogram oluşturulmuştur. Bireyler arasındaki genetik uzaklıkların %0- %95 arasında olduğu bulunmuştur. Elde edilen dendrograma göre izolatlar iki ana grupta toplanmıştır. Birinci ana grupta, *B. cereus*, *B. anthracis* ve *B. thuringiensis*' in yer aldığı, ikinci ana grupta ise *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. laterosporus*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. stearrowthermophilus*, *B. brevis*, *B. firmus* ve *B. circulans* türlerinin yer aldığı belirlenmiştir. Bakterilerin plazmit DNA'ları izole edilmiş ve büyüklükleri hesaplanmıştır. İzolatlardan 57 tanesinde plazmit DNA tespit edilmiş, 3 tanesinde ise plazmit DNA tespit edilememiştir. İzolatların 1,1 kb ile 19,3 kb arasında değişen büyüklüklerde 1-9 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir.

Bacillus thuringiensis izolatlarının kristal genlerinin tanımlanması polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PZR-RFLP) ile yapılmıştır. Sonuçlar *B. thuringiensis* FÖ21 izolatının *cry1* (272 bp) ve *cry2* (1556 bp) genlerini içerdiğini göstermiştir. İlave olarak *B. thuringiensis* FÖ16 ve *B. thuringiensis* FÖ19 izolatlarında da sadece 1556 bp'lik *cry2* genini taşıdıkları belirlenmiştir. *cry2* genleri tiplerinin için *DdeI* enzimi ile kesilmiştir. *DdeI* enzimi ile kesimi sonucunda elde edilen fragmentlere göre üç izolatın da *cry2Aa* ve *cry2Ab* genlerini birlikte taşıdıkları belirlenmiştir. Kristal proteinler izole edilmiş ve SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. İzolatların 130 kDa ve 65 kDa büyüklüğünde iki adet kristal protein taşıdıkları belirlenmiştir. *B. thuringiensis* izolatlarının taşıdığı oldukları parasporal kristal yapılarının morfolojik incelemeleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Yapılan inceleme sonunda izolatların hepsinin baklava dilimli, kübik ve yuvarlak şekilli parasporal kristal yapılar taşıdıkları bulunmuştur. Parasporal kristal taşıyan izolatların toksik etkileri *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera) ve *Trogoderma granarium* (Coleoptera) 3. dönem larvaları kullanılarak yapılan biyolojik denemelerle belirlenmiştir. İzolatların LC₅₀ ve LC₉₉ değerleri Probit analizi ile larvaların % ölüm oranları ise Abbot's formülü ile hesaplanmıştır. FÖ21, FÖ16 ve FÖ19 izolatlarının *E. kuehniella* larvaları üzerindeki ölüm oranları sırasıyla % 83, % 80 ve % 57 olarak belirlenmiştir. *Bacillus thuringiensis* FÖ21 ve *Bacillus thuringiensis* FÖ19 izolatlarının test edilen kontrol suşlarından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar bu çalışma kapsamında izole edilen *Bacillus thuringiensis* izolatlarının biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Bilim Kodu : 203.1.104

Anahtar Kelimeler : *Bacillus* spp, SDS-PAGE, Cry proteinler, biyolojik kontrol

Sayfa Adedi : 133

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Leyla AÇIK

**IDENTIFICATION, MOLECULAR TYPING AND DETERMINATION OF
BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *BACILLUS* SPECIES ISOLATED FROM
SOILS IN ANKARA**

(Ph. D. Thesis)

Fatma ÖZTÜRK

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

July 2007

ABSTRACT

In this study, 60 *Bacillus* strain were isolated from different soil samples in Ankara and identified with Analytic Profile Index (API). *Bacillus thuringiensis* was also identified by 16S rRNA sequence analysis. Total proteins of each isolates were isolated and analysed by sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein banding patterns of the isolates were compared with each other, genetic distances were calculated and dendrogram was established. The genetic distances between isolates changed from 0% to 95%. According to the dendrogram isolates were divided into two main clusters. The first cluster contains *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*. The second cluster *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. laterosporus*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *B. brevis*, *B. firmus* and *B. circulans*. Plasmid DNAs of the isolates were isolated and their sizes were calculated. 57 of the isolates contained 1-9 plasmid DNA changing from 1,1 kb and 19,3 kb in size while 3 isolates had no plasmid DNA. A polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for identification of *cry* genes from *B. thuringiensis* was established. The results showed that *Bacillus thuringiensis* FÖ21 contained *cry1* (272 bp) and *cry2* (1556 bp) genes, while *Bacillus thuringiensis* FÖ16 and *Bacillus thuringiensis* FÖ19 contained only *cry2* gene. *cry2* gene was restricted with *DdeI* enzyme in order to

find *cry2* types. All three isolates had *cry2Aa* and *cry2Ab* genes. The crystal proteins of the isolates were analysed by SDS-PAGE. The results showed that isolates had two crystal proteins (130 kDa and 65 kDa weight). The morphological structure of parasporal crystals of the *B. thuringiensis* were investigated by Scanning Electron Microscopy (SEM) morphologically. Results showed that all the isolates carried bipyramidal, spherical and cuboidal structures. The toxic effects of the isolates carrying parasporal crystals were determined by the bioassay using third instars larvae of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera) and *Trogoderma granarium* (Coleoptera). The LC₅₀ and LC₉₉ values of the isolates were determined by Probit analyse and mortality were calculated by Abbot's formula. Mortality of the *Bacillus thuringiensis* FÖ21, *Bacillus thuringiensis* FÖ16 and *Bacillus thuringiensis* FÖ19 against *E. kuehniella* larvae were 83%, 80%, and 57% respectively. Toxic effect of *Bacillus thuringiensis* FÖ21, *Bacillus thuringiensis* FÖ19 were found better than the reference strain tested. In conclusion, the results show that the *B. thuringiensis* isolates obtained in this study could be used as an effective biological control agent.

Science Code : 203.1.104

Key Words : *Bacillus* spp., SDS-PAGE, Cry proteins, biological control

Page Number : 133

Adviser : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Leyla AÇIK'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez izleme Komitesi toplantılarında kıymetli bilgi ve desteklerinden faydalandığım sayın hocalarım Prof. Dr. Turan GÜVEN'e ve Prof. Dr. Ayhan TEMİZ'e,

Elektron mikroskop çalışmalarının yapılmasında yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Zekiye SULUDERE'ye, böcekler üzerine biyolojik denemelerin yapılmasında yardımlarda bulunan Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ'a,

Çalışmalarım ve tez yazım aşamasında dostluk ve desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım S. Selcen BABAOĞLU AYDAŞ'a ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi destekleri ve ilgileriyle hayatım boyunca yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezin yapılmasında 05/2003-41 kodlu proje ile maddi destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
3. MATERYAL VE METOT.....	35
3.1. Materyal.....	35
3.2. Metot.....	40
3.2.1. Toprak örneklerinin alınması.....	40
3.2.2. Bakterilerin izolasyonu.....	41
3.2.3. Bakterilerin muhafazası.....	42
3.2.4. Bakterilerin tanımlanması.....	42
3.2.5. Sodyum dodesil poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	44
3.2.6. Plazmit DNA izolasyonu.....	46
3.2.7. Agaroz jel elektroforezi.....	47
3.2.8. Plazmit DNA büyüklüklerinin hesaplanması.....	47

Sayfa

3.2.9. İnsektisidal kristal genlerinin analizi.....	48
3.2.10. İnsektisidal kristal proteinlerin izolasyonu.....	50
3.2.11. <i>Bacillus thuringiensis</i> izolatlarının insektisidal etkisinin belirlenmesi.....	51
3.2.12. <i>Bacillus thuringiensis</i> izolatlarının parasporal kristal yapılarının taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi.....	52
3.2.13. İstatistiksel analizler.....	53
4. DENEYSEL BULGULAR.....	54
4.1. <i>Bacillus</i> İzolatlarının İzolasyonu ve Tanımlanması.....	54
4.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> İzolasyonu ve Tanımlanması.....	56
4.3. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Toplam Hücre Protein Profil Analizleri	65
4.4. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Plazmit DNA Profil Analizleri.....	76
4.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> Türlerinin İnsektisidal Genlerinin Belirlenmesi.....	83
4.6. <i>Bacillus thuringiensis</i> Türlerinin İnsektisidal Kristal Proteinlerinin Belirlenmesi.....	87
4.7. <i>Bacillus thuringiensis</i> Türlerinin İnsektisidal Etkisinin Belirlenmesi.....	88
4.8. <i>Bacillus thuringiensis</i> Türlerinin Parasporal Kristal Yapılarının Taramalı Elektron Mikroskobu ile Belirlenmesi.....	92
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	97
KAYNAKLAR.....	116
ÖZGEÇMİŞ.....	131

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kristal genler tarafından sentezlenen toksinlerin moleküler büyüklüğü, ve etkilediği konakçı grupları.....	29
Çizelge 3.1. Kristal genlerinin belirlenmesi için PZR’ da kullanılan primerler ve çoğaltılan gen bölgelerinin büyüklükleri (bp).....	40
Çizelge 4.1. <i>Bacillus</i> izolatlarının API sonuçları ve izole edildikleri toprak örnekleri.....	54
Çizelge 4.2. 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanan izolatlar ve izole edildikleri toprak örnekleri.....	57
Çizelge 4.3. FÖ21 izolatının <i>Bacillus thuringiensis</i> 2000031508 (AY138286.1) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları.....	58
Çizelge 4.4. FÖ7 izolatının <i>Bacillus thuringiensis</i> 2000032755 (AY138282.1) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları.....	59
Çizelge 4.5. FÖ8 izolatının <i>Bacillus thuringiensis</i> 2000031485 (AY138289.1) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları.....	60
Çizelge 4.6. FÖ16 izolatının kültüre edilmemiş bakteri klonu 8F345r (AY387385.1) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları.....	61
Çizelge 4.7. FÖ19 izolatının <i>Bacillus</i> sp. H-09 (AY461750.1) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları.....	62
Çizelge 4.8. FÖ18 izolatının <i>Bacillus megaterium</i> SAFN-040 (AY167803.1) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları.....	63
Çizelge 4.9. FÖ14 izolatının <i>Bacillus megaterium</i> SAFN-040 (AY167803.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları	64
Çizelge 4.10. FÖ15 izolatının <i>Bacillus cereus</i> 2000031498 (AY138274.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları.....	65
Çizelge 4.11. <i>Bacillus</i> türlerinin toplam hücre protein sonuçlarına göre hesaplanmış genetik uzaklıkları	71
Çizelge 4.12. <i>Bacillus</i> türlerinin plazmit DNA sayısı ve moleküler ağırlıkları.....	77

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.13. <i>cry2</i> geninin <i>DdeI</i> ile kesimi sonucunda beklenen restriksiyon parça büyüklükleri.....	86
Çizelge 4.14. <i>Bacillus thuringiensis</i> suşlarının probit analiz sonuçları.....	90

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Bacillus</i> türlerinde spor oluşumu.....	11
Şekil 2.2. İnsektisidal kristal proteinlerin üç boyutlu kristal yapısı.....	31
Şekil 2.3. <i>B. thuringiensis</i> 'nin hedef böcek üzerindeki etki mekanizması.....	33
Şekil 4.1. <i>Bacillus</i> türlerine ait protein profillerinin POPGEN istatistik programı ile hesaplanmış filogenetik ilişkisini gösteren dendrogram.....	73
Şekil 4.2. <i>E. kuehniella</i> larvaları üzerine etkili olan <i>B. thuringiensis</i> izolatlarının 7. gündeki % ölüm oranları.....	90

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Bazı <i>Bacillus</i> türlerine ait koloni şekilleri.....	8
Resim 2.2. Baklava dilimi şeklindeki kristal yapıların SEM görüntüsü.....	24
Resim 4.1. <i>B. cereus</i> 'un API 20E ve API 50CHB test kitleri ile verdiği reaksiyonlar.....	56
Resim 4.2. <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> ve kontrol <i>B. thuringiensis</i> suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri.....	66
Resim 4.3. <i>B. brevis</i> , <i>B. sterarothemophilus</i> ve <i>B. sphaericus</i> türlerinin SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri.....	67
Resim 4.4. <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> ve <i>B. laterosporus</i> türlerinin SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri.....	68
Resim 4.5. <i>B. cereus</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. circulans</i> ve <i>B. licheniformis</i> , türlerinin SDS- PAGE ile elde edilen protein profilleri	69
Resim 4.6. <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> ve <i>B. antracis</i> türlerine ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi	79
Resim 4.7. <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> ve <i>B. laterosporus</i> türlerine ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi.....	80
Resim 4.8. <i>B. brevis</i> , <i>B. sterarothemophilus</i> ve <i>B. sphaericus</i> türlerine ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi	81
Resim 4.9. <i>B. circulans</i> , <i>B. licheniformis</i> ve <i>B. firmus</i> türlerine ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi	82
Resim 4.10. <i>B. thuringiensis</i> türlerine ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi	83
Resim 4.11. <i>cryI</i> genel primeri ile elde edilen PZR ürünleri.....	84
Resim 4.12. <i>cry2</i> genel primeri ile elde edilen PZR ürünleri.....	85

Resim	Sayfa
Resim 4.13. <i>cry2</i> genleri <i>DdeI</i> enzimi ile kesim sonucunda elde edilen restriksiyon fragmentleri.....	86
Resim 4.14. <i>B. thuringiensis</i> suşlarına ait kristal proteinlerin elektroforezi.....	88
Resim 4.15. <i>B. thuringiensis</i> spor-kristal protein karışımının <i>E. kuehniella</i> larvaları üzerine uygulanması.....	89
Resim 4.16. FÖ21 izolatının elektron mikroskop fotoğrafları.....	93
Resim 4.17. FÖ19 izolatının kristal yapılarının elektron mikroskop fotoğrafı.....	94
Resim 4.18. FÖ16 izolatının kristal yapılarının elektron mikroskop fotoğrafları.....	94
Resim 4.19. Kontrol <i>B. thuringiensis</i> suşlarının kristal yapılarının elektron mikroskop fotoğrafları.....	95

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
bp	Baz çifti
β	Beta
cry	Kristal
cyt	Sitolitik
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
δ	Delta
λ	Lambda
gr	Gram
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
Mbp	Mega baz çifti
mM	Milimolar
M	Molar
N	Normal
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
L	Litre
rpm	Devir sayısı
Md	Megadalton
%	Yüzde

Kısaltmalar**Açıklama**

AP	Amonyum per Sülfat
API	Analitik Profil İndeks
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamit Tetra asetik asit
GATA	Gülhane Askeri Tıp Akademisi
ICP	İnsektisidal Kristal Protein
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
PAGE	Poliakrilamit Jel Elektroforezi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Scanning Electron Microscopy
TCA	Triklor Asetik Asit
TEMED	Tetra Etilen Diamit
UV	Ultraviyole
VIP	Vejetatif İnsektisidal Protein

1. GİRİŞ

Hızlı nüfus artışının beraberinde getirmiş olduğu kentleşmeyle birlikte her geçen gün tarım alanları azalmakta ve kişi başına düşen tarım ürünü miktarında düşüş olmaktadır. Geçmişte tarımsal ürün bakımından kendi kendine yeten ülke konumunda olan Türkiye şimdi birçok ülkeden tarımsal ürün ithal etmektedir. Bunun en önemli sebeplerinden biri de ekonomik olarak önemli bitkilerde zararlı böcekler ile mücadelenin bilinçli ve tam bir şekilde yapılamamasıdır [1] .

Ülkemizde tarım alanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olan zararlı böcekler ile mücadele daha çok kimyasal insektisitler kullanılarak yapılmaktadır. Kullanılan insektisitler hem böceklerin bu ilaçlara karşı direnç kazanmalarına neden olmakta hem de çevredeki faydalı böcekleri, bal arılarını, kuşları, balıkları ve insanları etkileyerek çevresel dengeyi bozmaktadır [2, 3]. Kimyasal insektisitler zararlılardan daha çok, onların tabii düşmanları olan predatör ve parazitleri ortadan kaldırarak zararlıların sayısının daha fazla artmasına neden olmaktadır. Bunların besinler üzerindeki kalıntıları da insanlarda birikerek gelecek nesilleri tehdit etmektedir [4] .

Kimyasal mücadelenin dışındaki mücadele yöntemleri yeteri kadar geliştirilemediğinden ve geliştirilen yöntemlerin zararlı, pahalı ve ilkel olması nedeniyle kimyasal insektisitlerin uygulanmasının daha uzun yıllar devam edeceği düşünülmektedir [4] .

Kimyasal insektisitlerin kullanımının olumsuz etkileri nedeniyle bu konuya kamuoyunun ilgisi artmış ve kimyasal insektisitlere karşı alternatif mücadele yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerin başında da biyolojik kontrol olarak bilinen mücadele yöntemi gelmektedir [1] .

Biyolojik kontrol, “böceklerin verdiği zararları en aza indirmek için bu böceklerin tabii düşmanlarını kullanma” olarak tanımlanabilir. Tabii düşman terimi, parazitler ve predatörlerle birlikte hastalık oluşturan mikroorganizmaları da kapsar [1].

Bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar, protozoa grubuna ait organizmalar ve rekombinant teknikler ile geliştirilen ajanlar biyolojik kontrolde kullanılan elemanları oluşturmaktadır. Bunlar arasında, toprak grubu bakteriler en çok gelecek vaat eden biyolojik kontrol ajanlarıdır [5] .

Günümüzde birçok mikroorganizma böceklerle biyolojik mücadele ile ilgili olarak kullanılmaktadır. Şimdiye kadar 100’ den daha fazla bakteri türü böcek patojeni olarak tanımlanmasına rağmen, yalnızca *Bacillus* türleri kontrol ajanı olarak ticari bakımdan tercih edilmektedir [5] .

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri sebebiyle dikkat çeken mikroorganizmalardır [6,7]. Ayrıca, sporlanma kabiliyetleri ve metabolizma faaliyetlerinin çeşitliliği geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır [7].

Çoğu çalışmada kullanılan *Bacillus* türleri ürettikleri proteinler nedeniyle ticari öneme sahiptir. Bazı *Bacillus* türleri ise proteolitik, sakkarolitik ve lipolitik enzimleri sayesinde besin endüstrisinde de önem taşımaktadır [6].

Bacillus türleri basitrasin (*B. licheniformis*), polimiksin (*B. polymyxa*), gramisidin (*B. brevis*), tirosidin (*B. brevis*), subtilin (*B. subtilis*) ve basilisin (*B. subtilis*) gibi ilaç endüstrisinde kullanılan peptit antibiyotikler üretmektedir [6].

B. thuringiensis, *B. sphaericus* ve *B. popilliae* türleri çeşitli böcek larvalarına patojenik etki gösterir ve biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılırlar [6] .

B. anthracis ve *B. cereus* ise insan ve hayvanlar için hastalık yapıcı olduklarından sağlık açısından önemli olan türlerdir [6].

Bacillus cinsi bakterilerin tanımlanmalarında klasik biyokimyasal ve fizyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bazı suşların bu testlerle kesin olarak

tanımlanması mümkün olamamaktadır. Özellikle de *B. thuringiensis*, *B. anthracis* ve *B. mycoides*' in yer aldığı *B. cereus* grubu bakterilerin sınıflandırılmaları tartışmalıdır. Çeşitli araştırmacılar birbirine yakın olan bu türlerin *B. cereus*' un üyesi olarak gruplandırılabilceğini ileri sürmüşlerdir [8] .

Sınıflandırmadaki mevcut problemleri çözmek ve modern bakteriyel taksonomiye yardımcı olmak amacıyla son yıllarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PZR (RAPD-PZR), 16S rRNA Dizi Analizi, DNA-DNA hibridizasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Parça Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP), Toplam Hücre proteinlerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) gibi moleküler yöntemler kullanılarak türler arasındaki farklılıklar ve benzerlikler belirlenmeye çalışılmaktadır [8].

Bu çalışmada farklı yerlerden alınan toprak örneklerinden *Bacillus* türleri izole edilmesi ve bu türlerin API (Analitik Profil Indeks) test kitleri ile tanımlanması, plazmit DNA' larının belirlenmesi ve toplam hücre protein profillerine göre türler arasındaki benzerlik ve farklılıklara dayanarak türlerin ayrımlarının yapılması hedeflenmiştir. Ayrıca, zararlı böceklerle mücadele konusunda kimyasal insektisitlere karşı alternatif bir yöntem olarak kullanılan *Bacillus thuringiensis* türlerinin 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanmaları, taşıdıkları insektisidal kristal genlerin PZR yöntemi ile belirlenmesi, bu genlerin ürünü olan kristal proteinlerin izole edilmesi ve izolatların hedef böcek üzerindeki toksik etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede zararlı böceklerle karşı kullanılabilecek insektisidal aktivitesi yüksek etkin, güvenilir ve ülkemize ait biyolojik kontrol ajanlarının oluşturulması yolunda adım atılmış olacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Genel Bilgiler

Yeryüzünde insan nüfusu hızla artmaktadır. Daha geniş tarım alanları elde etmek için doğal ekosistemler hızlı bir şekilde insanın kullanabileceği alanlara dönüşmekte ve bu sırada orman, toprak, doğal bitki ve hayvan türleri yok olup gitmektedir. Yeterli besin elde etmek için mevcut tarım alanlarının daha da üretken olması sağlanırken, yaşanabilir ve kirletilmemiş bir çevrenin de var olması hayati önem arz etmektedir. Bir yandan insanlığın geleceği korunmaya çalışılırken, diğer taraftan da bitki ve hayvan türlerini ve bunların yaşayabilecekleri habitatları korumak bütün insanlar için büyük bir sorumlulukla yerine getirilmesi gereken çok önemli bir görevdir [9].

Bugün dünyada zararlıların neden olduğu ürün kaybının %35 civarında olduğu, bu kaybın %12' sinin böcek ve akarlardan, %12' sinin bitki patojenlerinden, %10'nun yabani otlardan ve %1'nin ise kuş ve memeli zararlılarından kaynaklandığı ve bunun maliyetinin yaklaşık olarak 400 milyar dolar civarında olduğu belirtilmiştir. İlave kayıplar ise hasat sonrasında meydana gelmektedir. FAO dünya tahıl üretiminin %10,4' ünün depolama sırasında saklama koşullarının sağlıklı olmaması nedeniyle kaybedildiğini ve bu kaybın yaklaşık 120 milyon insanı besleyecek miktara ulaştığını bildirmektedir. Depolanmış ürünler hasat, taşıma ve depolama gibi maliyetleri de içerdiğinden tarladaki üründen daha kıymetlidir [10].

Böceklerin ürün tanelerini yiyerek beslenmeleri sonucu sebep oldukları zararın yanında, faaliyetleri ile tanenin sıcaklığı ve nem oranının yükselmesine de neden olduklarından depolamaya dolaylı yönden olumsuz etkileri bulunmaktadır [11]. Depolanmış ürüne zarar veren böcekler, verdikleri zarar derecesine bağlı olarak primer ve sekonder olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır.

Primer zararlılar gelişmiş ağız yapıları nedeniyle sağlam taneleri tahrip edebilmekte ve önlem alınmadığı takdirde zararları önemli boyutlara ulaşmaktadır. Ülkemizdeki

bu zararlılar buğday biti (*Stophilus granarius* L), pirinç biti (*Stophilus oryzae* L.), kapra böceği (*Trigoderma granarium* Everts.), arpa güvesi (*Sitotroga cerealella* liv.), ekin kambur biti (*Rhizopertha dominica* F.), mısır biti (*Sitophilus zeameis* Metsch.) baklagil tohum böcekleri (*Bruchus* spp.) patates güvesi (*Phthorimaea operculella* Zeller.) tütün güvesi (*Ephestia elutella* Hbn.) dir [12].

Sekonder zararlılar ise sağlam tanelerde zarar yapamamakta ancak primer zararlıların tahrip ettiği tanelerdeki tahribatı artırmaktadırlar. Ayrıca un, irmik, makarna, bulgur vb. mamul maddelerde doğrudan zarar yapmaktadırlar. Bu gruba giren önemli zararlılar: kırma bitleri (*Tribolium confusum* Duv.), un kurdu (*Tenebrio molitor* L.), testereli böcek (*Oryzaephilus surinamensis* L.), küçük kırma biti (*Leomophoeus ferugineus* Steph.), ekin kara böceği (*Tenebriodes mauritanicus* L.), pirinç karma biti (*Latheticus oryzae* Waterh.), un güvesi (*Pyralis farinalis* L.), değirmen güvesi (*Ephestia kuehniella* Zell.), tatlı kurt (*Lasioderma serricorne* F.) dir [12].

Zararlı Böceklerle Mücadele Yöntemleri

Kimyasal Mücadele

Tarım ürünlerinin yetiştirilmesinde ve depolanmasında, böceklerin meydana getirmiş oldukları zararlar insanlar için büyük sorunlar oluşturmıştır. Bu sorunu ortadan kaldırmak ve böcekleri kontrol edebilmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunların başında da kimyasal mücadele yöntemi gelmektedir. Bu yöntemle zararlı populasyonların % 95'i yok edilebilmektedir [13] .

Kimyasal mücadele yönteminde pestisit olarak isimlendirilen bazı kimyasal maddeler, besin maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanmaları sırasında, besin değerini bozan ve besinleri yok eden zararlıları (böcekler, mikroorganizmalar ve diğer organizmalar) yok etmek için kullanılmaktadır [14].

Pestisitler hedef zararlılarına göre herbisitler (yabancı otlara karşı), fungusitler (mantarlara karşı), rodendisitler (kemiricilere karşı) ve insektisitler (böceklere karşı) olmak üzere sınıflandırılabilirler [14].

Böceklere karşı kullanılan kimyasal insektisitlerin hemen hemen hepsi nörotoksiktir, yani vücuda hangi yolla girerlerse girsinler mutlaka sinir sistemi üzerine etki ederek canlının ölmesine neden olmaktadır [13].

Özellikle de 1945 yılında DDT’ nin bulunmasıyla sentetik kimyasal insektisitlere yönelim artmıştır. Bunun neticesinde tarımsal üretimde, depolanmış ürünlerde ve ayrıca insanlarda hastalık yapıcı vektör böceklerin kontrolünde önemli bir artış gözlenmiştir. Fakat kimyasal insektisit kullanımı tamamıyla kusursuz olmamış ve birçok problemi de beraberinde getirmiştir. Aşırı insektisit kullanımı yeraltı sularının kirlenmesine, flora ve faunada hedef olmayan organizmaların zehirlenerek yok olmasına, besin zincirlerinin olumsuz etkilenmesine neden olmuş ve ayrıca insektisitlere karşı dirençli böcek zararlılarını ortaya çıkarmıştır. Böceklerde direncin oluşması insektisit dozunun artırılmasını ve yeni insektisitlerin üretimini gerektirmiştir. Bu zararlı etkilerinden dolayı bazı insektisitlerin kullanımı Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından yasaklanmıştır [8].

Kimyasal insektisitlerin kullanımının olumsuz etkileri nedeniyle bu konuya kamuoyunun ilgisi artmış ve kimyasal insektisitlere karşı alternatif mücadele yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerin başında da biyolojik kontrol olarak bilinen mücadele yöntemi gelmektedir [1] .

Biyolojik Mücadele

Biyolojik mücadele “böceklerin meydana getirmiş olduğu zararları en aza indirmek amacıyla bu böceklerin tabii düşmanlarını kullanma” olarak tanımlanabilir. Tabii düşman terimi, parazitler ve predatörlerle birlikte hastalık oluşturan organizmaları da kapsar [5].

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde kimyasal ilaçların yerini biyoinsektisitler almıştır. Biyoinsektisitler üretim teknolojilerinin kolay ve sürekli olması, sadece hedef canlıya etki etmeleri, zararlının kontrolünde güvenilir olmaları, çevre kirliliği ile ilgili problemler yaratmamaları ve endosporlarının doğada uzun süre kalmaları nedeniyle tercih edilmektedir [15].

Biyoinsektisit olarak bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar ve protozoa grubuna ait organizmalar kullanılmaktadır. Bunlar arasında, toprak grubu bakteriler en çok gelecek vaat eden biyolojik kontrol ajanlarıdır. Özellikle *Bacillus* grubu bakteriler önemli bir yer teşkil ederler ve Lepidoptera (kelebekler), Diptera (sinekler, sivisinekler) ve Coleptera (kım kanatlılar) takımına ait böcekleri hedef alırlar [5].

Biyolojik mücadelede kullanılan mikroorganizmaların %90'nını *Bacillus thuringiensis* oluşturmaktadır. *Bacillus thuringiensis* delta endotoksin olarak isimlendirilen protein yapısında ve biyolojik olarak kolayca parçalanabilen ve böylece böceğin orta bağırsağında kısa bir yarılanma ömrü olan insektisidal toksinler üretirler [16].

Kimyasal insektisitler ile kıyaslandığında *Bacillus thuringiensis* ürünleri, hedef organizmada daha az bir dirence neden olur. Özgül böcek grupları üzerine etkilidir. Kullanımları güvenlidir. Hedef olmayan ve duyarlı olmayan organizmalar üzerinde etkili değildir. Kimyasal insektisitler gibi ortamda birikip toksik etki oluşturmazlar, yani yarılanma ömürleri kısadır. İnsanlar üzerinde patojen olmadıkları için zarar vermezler. Her şeyden önemlisi çevreyi kirletmezler. Bu nedenle biyolojik kontrol, kimyasal insektisitler ile karşılaştırıldığında çevresel dengeyi bozmayan alternatif bir mücadele yöntemidir [16].

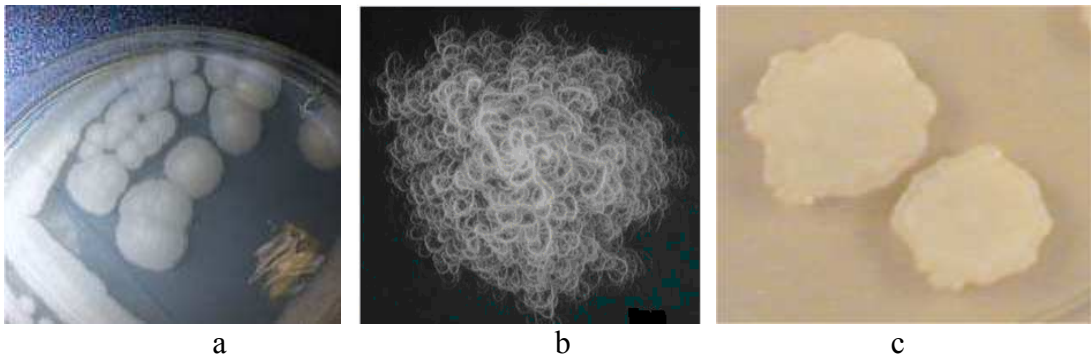
Türkiye' de biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan en önemli ve güncel örnek *B. thuringiensis*' dir. Özellikle bu bakteriden hazırlanan preparatlar bağ, meyve ve narenciye zararlılarına ve depo zararlılarına karşı kullanılmaktadır [4].

Bacillus Türlerinin Genel Özellikleri

Bacillaceae ailesine ait olan *Bacillus* cinsi, çubuk şekilli, endospor oluşturan, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşur. Vejetatif hücreler, tek başına veya zincir şeklinde bulunabilir. Yuvarlak veya köşeli şekilde biten hücrelerin büyüklükleri $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$ ' den $2,5 \times 10 \mu\text{m}$ ' ye değişmektedir. Hücreler, Gram-pozitif boyanır, ancak bazıları kültürün yaşına bağlı olarak Gram- negatif reaksiyon verebilirler [6,17].

Optimum büyüme sıcaklıkları 25°C ile 37°C ' de arasında değişmektedir. Ancak termofilik ve psikofilik türleri 75°C ' den daha yüksek ve 3°C ' den daha düşük sıcaklık derecelerinde büyüebilme yeteneğine sahiptirler. Bazı türleri 2 ile 10 arasında değişen alkali ve asidik ortamlarda gelişebilirler [17].

Bacillus türlerinin koloni özellikleri çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Besiyeri çeşidi, koloninin yaşı gibi özelliklere göre, yarı şeffaf, opak, düzgün ya da pürüzlü koloniler görülebilir. Koloni renkleri, kreme yakın beyazdan sarıya doğru olabilir (Resim 2.1). Çoğu *Bacillus* türü pigment oluşturmaz, ancak bazı türler farklı besi yerlerinde sarı, yeşil, mavi-siyah v.b pigmentler üretebilirler [6,17].



Resim 2.1. Bazı *Bacillus* türlerine ait koloni şekilleri [6]

a. *B. megaterium* b. *B. mycoides*, c. *B. subtilis*

Bacillus türlerinin çoğu peritirik flagella taşırlar ve bununla hareket ederler. Flagellar antijenler *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* gibi türlerin tanımlanması için

kullanılmakla birlikte, flagella oluşumu taksonomide kullanılan temel ölçütlerden biri değildir [6,17].

Bazı *Bacillus* türleri, dış yüzeyinde polisakkarit veya polipeptid yapıda kapsül oluştururlar. *B. anthracis*' de poli D-glutamik asitten oluşan kapsül bulunmakta ve bu virulans faktör taşımaktadır [6,17].

Bacillus' lar sporları nedeniyle biyosferde birçok farklı çevreden izole edilebilirler [6,18]. Cinsin asıl habitatı, topraklardır [19-21]. Toprak mikroflorasında yer alan *Bacillus* türleri besin maddeleri açısından zengin topraklarda bulunabildikleri gibi, besince fakir topraklardan da izole edilebilirler. Örneğin; *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. cereus* karmaşık besin maddelerine ihtiyaç duymazken, *B. polymyxa* ve *B. azotofixans* gibi gelişmek için bitki rizosferine ihtiyaç duyan türler de bulunur [17,22].

Endospor oluşturan *Bacillus* türleri toprak, bitki rizosferi, gıda, su ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinden de izole edilebilirler. Bunun yanı sıra, sivrisinek, kelebek, sinek ve kınkanatlı larvalarından da izole edilmişlerdir [20,23,24].

Bacillus türleri toprakta geniş bir yayılıma sahip oldukları gibi deniz ve tatlı sularla, buraların sedimentlerinde de bulunabilirler. Bazı *Bacillus* türleri ise uygun olmayan şartlarda büyüebilme kapasitesindedirler ve üre içeren uç pH değeri olan asitli veya yüksek sıcaklığa sahip ortamlardan izole edilebilirler [6].

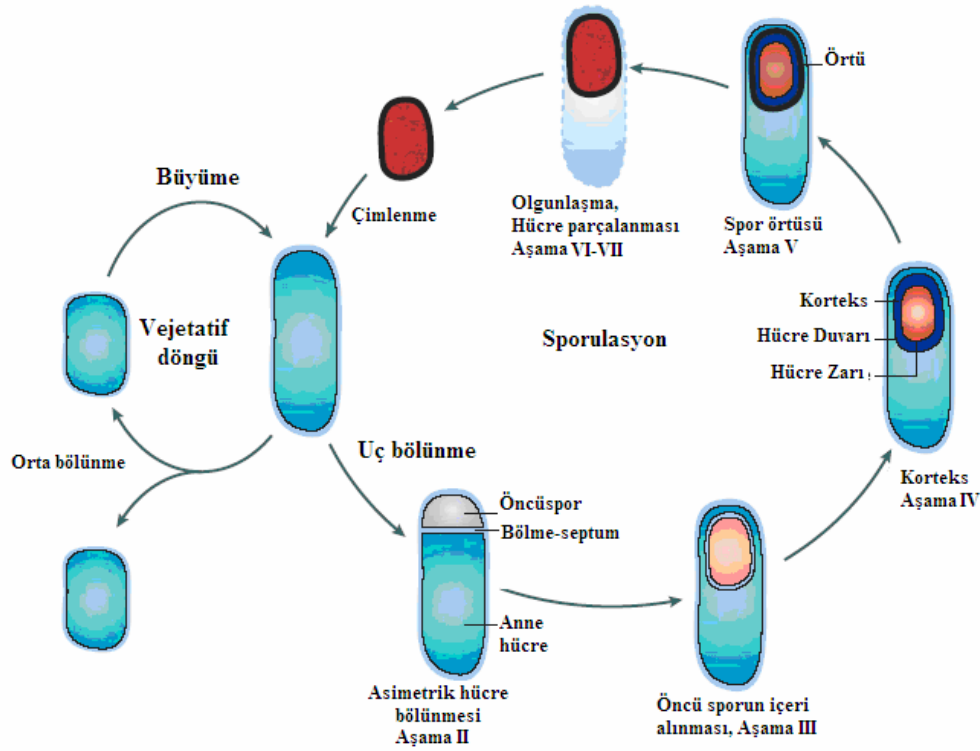
Bacillus Türlerinde Spor Oluşumu

Bacillus türlerinin en önemli özelliklerinden biri büyüme evresinin durgun fazında besin maddelerinin azalmasına bağlı olarak endospor oluşturmalarıdır. Endospor oluşumu, spor oluşturan hücrelerin şekli ve sporangiyumlar *Bacillus* türleri için karakteristiktir [25].

Spor oluşması anında bakteri hücresi içinde birçok değişiklikler meydana gelir. Vejetatif hücrede aktif olan bazı genler aktivitelerini kaybederken sporların oluşmasında etkili olan genler aktivite kazanırlar. İlk olarak çekirdek sporun oluşacağı bölgede yerleşir. Bunun etrafını çepeçevre çöküntü oluşturmak suretiyle katlanan sitoplazmik zar çevreler ve onu bakteri içerisinde ayrı bir bölümde ayırır. Oluşan bu çift zarın sentezlenmesi ile spora ait diğer bölümler oluşur (Şekil 2.1). Bu şekilde oluşan sporlarda şu bölümler vardır:

Birincisi çekirdek kısmı olup sporun protoplastını oluşturur. İçinde tam bir nukleus, protein sentezi için gerekli bütün bileşikler ve bir enerji yapıcı sistem bulunur. Sitokrom bulunmaz, fakat çeşitli enzimler bulunur. Sporların sıcaklığa dirençli olmaları yapılarında bol kalsiyum dipikolinat bulunmasındandır. Sporlarda bulunan ikinci kısım spor duvarıdır. Spor protoplastını çevreler, yapısında peptidoglikan bulunur ve oluşacak bakterinin hücre çeperi buradan gelişir. Sporlarda bulunan üçüncü kısım kabuk, yani korteks kısmıdır. Sporun en kalın tabakasıdır. Değişik yapıda peptidoglikan tabakası vardır. Kabuk kısmının dışında keratine benzer, proteinden yapılmış bir kılıf bulunur. En dışta da karbonhidratlı bir protein zar (ekzosporiyum) bulunur [26].

Endosporlar silindirik, elipsoidal, oval veya yuvarlaktır. Endosporlar vejetatif hücrelerden optik kırılma, ince yapı, kimyasal pozisyon, kimyasal ve fiziksel strese dirençlilik gibi pek çok yönden farklıdırlar [25].



Şekil 2.1. *Bacillus* türlerinde spor oluşumu [27]

Bacillus sporları sıcaklığa vejetatif hücrelerden 10^5 kez, UV ışımaya 7-50 kez daha dayanıklıdır. Sporu çevreleyen membranlar, korteks ve spor paltosu gibi yapılarla çeşitli kimyasal ajanlara karşı direnç de geliştirilmiştir [6].

Bacillus Türlerinin Genetik Yapısı

Bacillus genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılan *B. subtilis* türü oldukça iyi tanımlanmış olup, genom büyüklüğünün 4,2 Mbp olduğu ve 4100 protein kodlayan gen içerdiği bildirilmiştir [7].

Genel ve özel transdüksiyon, plazmid DNA aktarımı, plazmit ve bakteriyofaj vektörleri ile ilgili moleküler genetik araştırmalarda *B. subtilis* türünün yanı sıra *B. brevis*, *B. cereus* ve *B. coagulans* gibi türler de kullanılmaktadır [17].

B. cereus'un kromozomlarının *NotI* enzimi ile kesimi sonucunda oluşan parça uzunluklarına göre fiziksel haritası oluşturulmuştur. Bu fiziksel haritaya göre *B. cereus* kromozom büyüklüğünün yaklaşık olarak 5,7 Mbp olduğu belirlenmiştir [28].

Bacillus cinsi içindeki DNA baz kompozisyonunun dağılımı, cinsin genetik dağılımı açısından ilginç sonuçlar vermektedir. Doğal cinste en fazla %10–15 aralığında olması gereken % G+C oranı *Bacillus* cinsi içinde %33 (*B. anthracis*) ile %69 (*B. thermocatenulatus*) arasında değişmektedir [29,30].

Bacillus Türlerinde Plazmit DNA

Plazmitler bazı prokaryotik organizmalarda hücrenin kendi büyük halkasal kromozomlarından ayrı olarak bulunan, konukçu hücrede kendiliğinden replike olabilen, çift zincirli, halkasal DNA molekülleridir. Plazmitler, bir ile birkaç yüz kilo baz (kb) uzunluğundadır.

Plazmitler, replikasyon orijinine sahiptir. Kromozomal DNA' dan bağımsız olarak replike olabilirler. Antibiyotik direnci, virulans özellik, organik bileşiklerin parçalanması veya çeşitli metabolik aktiviteler gibi fenotipik özelliklere ait genler taşırlar. Bazı plazmitler ise, fenotipte gözlenmeyen özelliklere dair genler içerirler, bunlara “kriptik plazmitler” denir. Kendi kendine transfer olabilen veya konjugatif plazmitler, içerdikleri “tra” genleri sayesinde, diğer tür veya bakteriyel suşlara çıkardıkları kopyaları transfer edebilme yeteneğindedirler. Diğer bazı plazmitler ise, kendi transferleri için yetenekli olmasalar da, bazı bakteriyel hücrelerde sunulan konjugatif plazmitlerin fonksiyonlarından yararlanırlar [31,32].

Plazmitler bakterilerin sitoplazmaları içinde bulunabilecekleri gibi, kromozomla da birleşebilirler. Plazmitler bir bakterinin yaşamı için gerekli değildir, ama bakterilere bazı özel yetenekler kazandırabilirler. Bazı durumlarda plazmitler ve kromozom arasında biyokimyasal yönden bir iş birliği gelişebildiği gibi bu işbirliği ters veya olumsuz yönde de gelişebilmektedir. Plazmit DNA moleküler ağırlıkları ve büyüklükleri çok değişkendir. *Escherichia coli*' de laktoz fermantasyonu 58,5

Md'luk plazmit tarafından yönetilmesine karşın, *Klebsiella pneumoniae*' de 163 Md'luk plazmit aynı fonksiyonu yapmaktadır [33].

1-200 kb büyüklüğünde olabilen plazmit DNA' ların hücredeki sayısı 1-700 kopya arasında değişebilir. Diğer bakterilere transformasyon, transduksiyon ve konjugasyon gibi olaylarla aktarılabilen plazmit DNA'lar, *in vitro* rekombinasyon olaylarında kullanılan vektörlerdir [33].

Bacillus türlerine ait plazmitler *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. larvae*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. anthracis* gibi birçok türde araştırılmıştır [34–44].

Özellikle bazı *Bacillus* türlerinin antibiyotiklere direnç özelliği taşıyan plazmitler bulundurması, rekombinant DNA çalışmalarında vektör olarak kullanılabilmesine ve birçok çalışma için aranılan organizmalar olmalarına neden olmuştur [34,43].

Yapılan çalışmalarda genelde *Bacillus* cinsi bakterilerin içerdiği plazmitlerin kriptik plazmitler olduğu belirtilmiş olmasına rağmen *B. thuringiensis*' in bir plazmidinin insektisidal kristal proteinin üretimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [34,43].

B. thuringiensis' in toksin genleri ve *B. anthracis*' in antraks toksin genleri plazmitler üzerinde yerleştiği için *B. cereus* grubunun plazmitleri grup üyelerinin tanımlanması için önemli bir faktördür. Plazmitler *B. cereus* grubunda çok yaygındır ve tek bir tür 6'dan daha fazla farklı plazmit türü taşıyabilir [45].

Bacillus Türlerinde Toplam Hücre Protein Profili

Farklı bakterilerin genom nükleik asit dizilerinin tayini, hücresel düzeyde gen ifadesinin araştırılması için bir fırsattır. Dolayısıyla, genoma ait tüm proteinler olarak tanımlanan proteomun analizi, genom çalışmalarını tamamlar. Bir organizma tarafından sunulan proteinlerin tümünün tanımlanmasına yönelik amaçlar, protein

sentezi seviyesinde gen ifadesinin analizinin ortaya konmasına yol açar. Ökaryotik hücrelerle bakterilerin ilişkileri ve bakterinin strese cevapları gibi konuların anlaşılmasını sağlayacak olan bakteriye ait proteomunun belirlenmesi, protein analiz yöntemleri yardımıyla gerçekleştirilebilir [46].

İzole edilen birçok suşun birbiriyle karıştırılması, suşlar arasında ayrım geliştirmek ve suşların teşhisinin doğruluğunu ispatlamak zorunluluğunu gündeme getirmiştir. Sınıflandırmaya yönelik ilk çalışmalar genelde morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyon temel alınarak yapılmıştır. Ancak, fenotipik özellikler suşların ayrımı için yeterli olmadığından değişik yöntemler geliştirilmiştir [47].

Toplam hücre proteininin SDS-PAGE ile görüntülenmesi sonucunda protein yapısındaki farklar belirlenerek, türler içi veya türler arası yakınlık ve uzaklıkların ortaya konması mümkündür. Mikrobiyal sistematikte, özellikle aynı türler veya alttürler ait suşların hücresel proteinlerinin karşılaştırılması ve ayrımı için, duyarlı bir teknik olarak protein jel elektroforezi yıllardır kullanılmaktadır. SDS-PAGE jellerinden elde edilen verilerin karşılaştırılması, araştırmaların ilerlemesine yardımcı olmuştur [46].

Genelde Gram-negatif bakterilerde kullanılan protein jel elektroforezinin Gram-pozitif bakterilerden protein elde etmek için geliştirilmesi araştırmaları devam etmektedir [48].

SDS-PAGE ile toplam hücre protein profili çıkarılmasının, bakterilerin sistematigi ve karakterizasyonunda kullanılabileceğini belirten bazı araştırmacılar [48,49], farklı molekül ağırlığındaki proteinlerin tayini ve karşılaştırılması ile hem suşların akrabalıklarını [50] hem de belli özellikleri denetleyen proteinlerin tespitinin yapılmasının mümkün olduğunu bildirmişlerdir [48].

SDS-PAGE ile 47 adet *Bacillus circulans* suşunun toplam hücre protein profilleri çıkarılarak, API testlerinden elde edilen biyokimyasal özellikleri karşılaştırılmış ve iki ana gruba ayrılan suşların protein profillerinin %78 oranında birbirine benzediği

gözlenmiştir. İkinci grupta yer alan bakterilerin daha yakın biyokimyasal aktivite gösterme gibi ortak özellikleri olduğu bildirilmiştir [51].

Toplam hücre protein profili ile hastalık etkeni olan *B. cereus* türünün alt tiplendirilmesinin yapıldığı bir çalışmada, 58 adet *B. cereus* izolatının bir biyotip varlığında, 3 antibiyogram ve 22 toplam hücre protein profiline ulaşıldığı belirlenmiştir. SDS-PAGE yöntemi ile elde edilen verilerde %38 oranında bir benzerliğe sahip olan *B. cereus* izolatlarının heterojen bir yapı gösterdiği belirtilmiştir. Predominant özellik gösteren 13 adet *B. cereus* izolatının, polimeraz zincir reaksiyonu ile yapılan alt tiplendirme çalışmalarında *B. cereus* ATCC 14579 suşu ile yaklaşık olarak %89 oranında benzerlik gösterdiğini bildiren araştırmacılar, toplam hücre protein profili sonuçlarının *Bacillus* cinsi içindeki tiplendirmelere izin verdiğini ve pilot epidemiyolojik çalışmalarda, PZR'nin yanı sıra toplam hücre protein profillerinin yardımıyla da tiplendirmelerin yapılabileceğini bildirmişlerdir [49].

Dokuz referans *Bacillus* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen protein profil sonuçları esas alınarak yapılan nümerik sınıflandırmada suşların % 47 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiş ve iki ayrı grup oluşturulmuştur. Birinci grupta benzerlik düzeyi %67-%85 arasında değişen *B. subtilis* ve *B. megaterium* türlerine ait dört suş; ikinci grupta ise benzerlik seviyesi %50-%70 arasında değişen farklı *Bacillus* türlerine ait beş suşun (*B. sphaericus*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* var. *israelensis*, *B. megaterium* ve *B. licheniformis*) yer aldığı belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen hücresel protein profillerinin istatistiksel analizlerle birleştirilmesinin *Bacillus* türlerinin taksonomik ilişkilerinin incelenmesinde etkili bir yaklaşım sağladığı gösterilmiştir [52].

Bacillus cereus TZ415 suşunun toplam hücre protein görüntülerine göre farklı pH'larda ve farklı büyüme evrelerinde oluşturduğu aside dayanıklılık cevapları tespit edilmiştir. Bu suşun geç durgun fazda aside karşı tolerans düzeyinin en yüksek seviyeye vardığı ve bu durumun toplam hücre protein görüntülerindeki değişiklikler ile belirlenmiştir [53].

Bacillus Türlerinin Tanımlanmaları

Geleneksel tanımlama

Bacillus türlerinin tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları daha çok spor morfolojilerine göre yapılmaktadır. Sporum hücre içindeki yerleşimi ve şekli türler arasında farklılık göstermektedir. Spor morfolojilerine bağlı olarak *Bacillus* türleri üç büyük gruba ayrılır [54].

B. cereus, *B. megaterium*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* ve *B. cereus* var. *mycoides* büyük hücreli birinci grupta yer alır. Gram pozitif çubuk şekilli hücrelerin genişliği 21 µm'dir ve merkezde ya da uç kısımda elipsoit ya da silindirik sporlar oluştururlar. Poli-β-hidroksibütirat ve parasporal kristaller gibi protoplazmik inklüzyonlar büyük hücreli türlerde bulunur. Klinik olarak önemli *Bacillus* izolatlarının çoğu birinci grupta yer alır [54].

İkinci grup türleri Gram değişkendir ve merkezde ya da uç kısımda elipsoit sporlar ile şişkin bir sporangiyuma sahiptirler. Bu grupta başlıca *B. circulans*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. popillae*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. alvei*, *B. stearothermophilus* ve *B. brevis* yer alır [55].

Üçüncü grup Gram değişken ve heterojen *B. sphaericus* türlerince baskındır. Sporangiyumları şişkindir ve uç kısımda ya da uca yakın yerde küresel sporları vardır [55].

API test kitleri ile tanımlama

Spor morfolojilerine ilave olarak *Bacillus* türlerinin tanımlanması için çeşitli biyokimyasal testler geliştirilmiştir. Bu klasik testler için özel besiyerleri ve kimyasal maddelerin kullanılmasını gerektirmektedir. Cins içerisindeki yüksek heterojenlik standart testlerle tanımlama yapmayı zorlaştırmaktadır [6]. Logan ve Berkeley, API stripleri kullanarak *Bacillus* türlerinin tanımlanması için hızlı ve kesin bir sistem

geliştirmişlerdir. 12 testlik API 20 E ve 49 testlik API 50 CHB test kitlerinin kullanılması ile *Bacillus* türlerinin tanımlanmaları daha hızlı ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir [56].

Moleküler Yöntemlerle Tanımlama

Klasik testlere ve API sistemine ilave olarak çeşitli moleküler yöntemler türler arasındaki farklılığı belirlemek için geliştirilmiştir. Kromozomal DNA baz bileşimi (%mol G+C) ve DNA-DNA sıvı hibridizasyon yöntemleri tanımlama için kullanılmaktadır. Özel DNA problemleri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), plazmit ve toplam hücre protein profillerinin belirlenmesi, 16S rDNA dizi analizi, Southern blotlama gibi moleküler yöntemler tanımlamanın kesin ve hızlı bir şekilde yapılmasını sağlamaktadır [6,44].

16S rDNA dizi analizi

Bakterilerin tanımlanması için 1980 yılından itibaren yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Woese ve arkadaşları bakteriler arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek için genetik kodun değişmeyen bölgelerini kıyaslamışlardır. Bakterilerdeki bu gen bölgeleri 16S rRNA geni (ribozomun küçük alt birimine özgü RNA) ve 23S ve 5S rRNA (büyük alt birimler) genleri ve bu genler arasında yer alan bölgelerdir [57].

Bakterilerin sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılan gen bölgesi 16S rRNA'dır. 16S rRNA gen bölgesi 16S rDNA'dan oluşur. 16S rRNA gen bölgesi yaklaşık olarak 1550 bp uzunluğundadır ve hem değişebilen hem de korunmuş bölgelerden oluşur [58].

16S rRNA dizilerinin kıyaslanması bakteriler, arkebakteriler ve ökaryotik organizmalar arasındaki filogenetik ve evrimsel yakınlığın belirlenmesi için kullanılan güçlü bir araçtır. Bu diziler öncelikli olarak oligonükleotid kataloglama, klonların dizilenmesi, revers transkriptaz kullanılarak RNA'nın doğrudan

dizilenmesi ve PZR ile çoğaltılmış materyalin dizilenmesini içeren yöntemlerle elde edilmiştir [59]

Ash ve arkadaşları, 51 *Bacillus* türünün 16S rRNA gen bölgelerinin karşılaştırılması ile ilgili yapmış oldukları çalışmada cins içerisinde filogenetik olarak en az beş farklı grubun oluştuğunu belirlemişlerdir. DNA hibridizasyon yöntemi ile *B. anthracis*, *B.cereus* ve *B. thuringiensis*' in 16S rRNA dizi analizlerinin çok yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (>%99) [60].

B. thuringiensis ve *B. cereus* var. *mycoides*' in 16S rDNA dizi analizi sonucunda sadece dokuz nükleotitten daha azı ile birbirlerinden ve *B. anthracis* ve *B. cereus*' dan farklı olduğu belirlenmiştir [61].

B. thuringiensis ve *B.cereus*' un tanımlanması için, 16S rRNA geninin V1 bölgesine göre geliştirilen DNA probları kullanılmıştır. Kullanılan bu proplar oldukça özeldir. Yapılan çalışma sonucunda *B. cereus*' a özgü olan propların *B.cereus*' dan yalnızca üç nükleotid bakımından farklı olan *B. thuringiensis* izolatları ile hiçbir amplifikasyon vermediği gözlenmiştir. *B. thuringiensis* izolatları yalnızca kendine özgü proplar ile belirlenebilmiştir [62].

Gen bankasından *B. anthracis*, *B. cereus* ve *B.thuringiensis* türlerine sınırlı sayıda gen dizilerine ulaşılmaktadır. Bu diziler farklı uzunluklar ve kalitede olmalarına rağmen tamamlayıcı bölgelerinde birbirlerinden birkaç nükleotitten fazla farkları yoktur. Bu yüzden *B. anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*' in 16 S rRNA' larında görülen bu az seviyedeki farklılık bu üç türü tanımlamak ve farklılıklarını ortaya koymak için 16S rRNA' nın bir araç olduğunu düşündürmektedir [61].

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, özgün DNA dizilerinin *in vitro* ortamda enzimatik olarak sentezleme yöntemidir. Bu özgün bölgelerin sınırlarını oluşturmak için değişik sayıda ve uzunlukta primerler kullanılır, bunlar karşı anlamlı iplikçiklere bağlanırlar. Ardı

ardına tekrarlayan döngüler serisi; kalıp DNA' nın tek iplikçikli hale getirilmesi, primerlerin kendi eşlenik bölgelerine yapışması ve yapışan primerlerin DNA polimeraz ile DNA sentezlenmesi olarak gerçekleşir. Döngüler serisi sayesinde ürün miktarı logaritmik olarak artar ve üretilen özgün bölge primerlerin 5' ucunda sonlanır. Primer uzatılması safhasında sentezlenen ürünler bir sonraki döngüde kalıp görevi görür. Bu sayede hedef DNA kopya sayısı her döngüde yaklaşık olarak iki katına çıkar. *Thermus aquaticus*' un sıcaklığa dirençli DNA polimerazının izole edilerek kullanılması büyük kolaylık sağlamıştır. Reaksiyon bileşenlerinin (kalıp DNA, primerler, dNTP, tampon) tek tüp içinde toplanmasıyla reaksiyon basit bir sıcaklık döngüler zinciri haline getirilmiştir. Çeşitli reaksiyon parametrelerinin (enzim, primer, Mg^{++} yoğunluğu, sıcaklık döngü profili) değiştirilmesiyle özgüllüğün ve üretimin artırılması mümkündür [63].

Polimeraz zincir reaksiyonu hedef DNA'nın milyonlarca kez çoğalmasını sağlayan güçlü bir tekniktir. Bu teknik DNA' nın bilinen bölgesinin çoğaltılmasında ya da hakkında çok az şey bilinen izolatların genetik olarak kıyaslanmasında kullanılabilir [64].

PZR *B. thuringiensis* ve diğer bakterilerde *cry* genlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve belirlenmesi için kullanılan çok güçlü ve yaygın bir yöntemdir [65].

B. thuringiensis ait birçok toksin geni analiz edilmiş ve özelleşmiş primerler şeklinde PZR tekniğinde toksin genlerin belirlenmesi ve karakterizasyonu için kullanılmıştır [64].

Carozzi ve arkadaşları, farklı delta endotoksinleri tanımlamak için PZR analizini geliştirmişler ve toksin genlerinin üç büyük sınıfı arasındaki farklılığı belirleyen 12 adet primer geliştirmişlerdir. Yeni suşların tanımlanması ve insektisidal aktivitelerinin belirlenmesi için PZR'ın hızlı ve kesin sonuç veren bir yöntem olduğu belirlenmiştir [66]. Ayrıca PZR yöntemi çok daha az bulunmasına rağmen *cyt* genlerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır [64].

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin incelenmesinde değişik moleküler yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan birisi sıkça kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile muamele edilerek incelenmesidir. Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde restriksiyon endonükleaz enzimi sentezler. Esas görevleri dışarıdan bakteriye giren ve bazı özel gen veya markırları taşıyan genetik materyalleri parçalayarak mutasyonlara mani olmak ve türlerin genetik yönden stabilitesini korumaktır. Bu, gerçekte bir çeşit savunmadır. Bakteriye özgü bu enzimler çift sarmallı DNA üzerinde özgün bir bölgeyi tanırlar ve çift sarmallı DNA' nın her iki zincirindeki fosfodiester bağıını keserek DNA'yı iki parçaya ayırır. Bu enzimlerin birçoğunun tanıdığı bölge tekrarlayan diziler şeklindedir. Yeni oluşan parçalar birbirine iki yönlü olarak simetriktr [67].

RFLP toksin genlerinin yeni varyantlarını belirlemek için PZR ile birlikte kullanılmaktadır [68].

Bacillus Türlerinin Biyolojik Mücadelede Kullanımı

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde kimyasal ilaçların yerini biyoinsektisitler almıştır. Biyoinsektisitler üretim teknolojilerinin kolay ve sürekli olması, sadece hedef canlıya etki etmesi, zararlının kontrolünde güvenilir olması, çevre kirliliği ile ilgili problemler yaratmaması ve endosporlarının doğada uzun süre kalması nedeniyle tercih edilmektedir [69].

Biyoinsektisit olarak bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar ve protozoa gruplarına ait organizmalar kullanılmaktadır. Bunlar arasında, toprak grubu bakteriler en çok gelecek vaat eden biyolojik kontrol ajanlarıdır. Özellikle *Bacillus* grubu bakteriler önemli bir yer teşkil etmekte olup Lepidoptera (kelebekler), Diptera (sinekler, sivisinekler) ve Coleoptera (kın kanatlılar)'leri hedef almaktadır [5].

Biyolojik mücadele de kullanılan mikroorganizmaların %90'nını *Bacillus thuringiensis* oluşturmaktadır. *Bacillus thuringiensis* delta endotoksin olarak

isimlendirilen protein yapıda ve biyolojik olarak kolayca parçalanabilen ve böylece böceğin orta bağırsağında kısa bir yarılanma ömrü olan insektisidal toksinler üretirler [16].

Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis çubuk şekilli Gram-pozitif, fakültatif anaerob, hareketli, spor fomlu bir bakteridir. Vejetatif hücreleri hareketli yaklaşık 1 mikron genişliğinde ve 5 mikron uzunluğundadır [69].

B. thuringiensis *B. cereus*, *B. mycoides* ve *B. anthracis*' ide içeren *Bacillus cereus* grubunun bir üyesidir. *B. thuringiensis* yalnızca sporulasyon sırasında özellikle Lepidoptera (kelebekler), Coleoptera (kırkanatlılar) ve Diptera (iki kanatlılar, sinekler) takımı böcekler üzerinde toksik etki gösteren bir ya da daha fazla inklüzyon cisimcikler üretmeleri ile *B. cereus*'dan ayrılır [70,71].

B. thuringiensis ilk olarak bakteriolojist Ishawata tarafından Japonya'da 1901 yılında ipek böceğinden izole edilmiştir. Alman bakteriolojist Ernst Berliner tarafından da isimlendirilmiştir. 1916 yılında *B. thuringiensis*' in spor kültürlerindeki bir toksin yüzünden toksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur [72].

B. thuringiensis suşları yaklaşık 2,4 ile 5,4 milyon baz çifti uzunluğunda bir genoma sahiptirler [73]. Büyüklükleri 2–272 kb arasında olan 2 ile 11 tane plazmit taşımaktadırlar [74,75] ve insektisidal proteini kodlayan genler bu plazmitler üzerinde yer almaktadır [76]. Büyük ve küçük plazmitler üzerinde bulunan *cry* genlerinin etrafında çok sayıda hareketli bölgeler bulunmaktadır. Bu plazmitler konjugasyon benzeri mekanizmalar ile bir *B. thuringiensis*'den diğerine kendiliğinden transfer olma yeteneğine sahiptir [77].

Bacillus thuringiensis suşları toprak, depolanmış ürünler, böcek ölümleri, tahıllar, tarımsal topraklar, farklı bitki ve sucül çevreler gibi çok farklı ortamlardan izole edilebilirler [78].

Bacillus thuringiensis tarafından üretilen toksinler

Bacillus thuringiensis suşlarının farklı toksinler ürettikleri bilinmektedir. Bu toksinler arasında insektisidal kristal proteinler (δ -endotoksinler), yüksek dozlarda memelilere karşı toksik etkiye sahip olan ekzotoksinler, hemolizinler ve enterotoksinler yer almaktadır [64].

Insektisidal kristal proteinler (δ - endotoksinler)

Sporulasyon sırasında, *B. thuringiensis* suşlarının büyük bir kısmı insektisidal delta endotoksinleri içeren kristal yapıda inklüzyonlar üretirler. Bu proteinleri taşıyan kristaller sporulasyondaki toplam bakteri proteininin % 20–30' unu oluştururlar [79].

Bu kristal inklüzyonlar monomerik yapıdaki 130–140 kDa ağırlığındaki proteinlerden oluşurlar. Proteolitik enzimler tarafından inklüzyonların parçalanması sonucunda daha küçük toksik proteinler (delta endotoksinler) açığa çıkar. Bunlar suşlar arasında çeşitlilik gösterirler fakat çoğu durumlarda *B. thuringiensis* suşları delta endotoksinlerin karışımını içeren inklüzyonlar üretirler. Örneğin; *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-1 suşu aynı kristalde 3 tane Cry1 (130 kDa) ve iki tane Cry2 (70 kDa) endotoksini içerir. *B.thuringiensis* subsp. *tenebrionis*' de olduğu gibi diğer *B. thuringiensis* suşları tek bir endotoksin de taşıyabilirler [64].

Bacillus thuringiensis'e ait δ -endotoksinler, aktivitelerine göre dört önemli sınıfa ayrılırlar:

- 1) Lepidoptera (kelebekler) takımına özgül (CryI)
- 2) Lepidoptera ve Diptera (sinekler)' ya özgül (CryII)
- 3) Coleoptera (Kıncanatlılar) takımına özgül (CryIII)
- 4) Diptera takımına özgül (CryIV),

Cry toksinlerine ilave olarak bazı *B. thuringiensis* suşları daha küçük yapıda 25–28 kDa ağırlığında sitolitik (Cyt) endotoksinler de üretirler. Bunlar *B. thuringiensis*

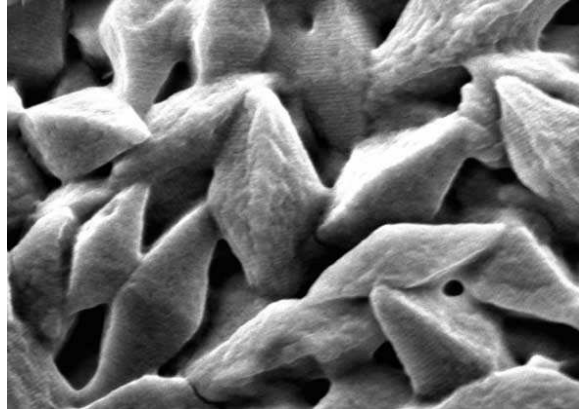
subsp. *israelensis* ve *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG14' den izole edilmiş Cyt1A ve *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis*'den izole edilmiş Cyt2A toksinlerini içerirler [64].

Cry δ - endotoksinlerden farklı olarak, Cyt endotoksinler *in vivo* ve *in vitro* geniş özgünlüğü olmayan bir aktivite gösterirler. Cyt endotoksinler kristal yapıdaki inklüzyon cisimciklerde Cry δ -endotoksinlerle birlikte depo edilirler. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 'den izole edilen Cyt1A endotoksini karakterize edilen ilk Cyt endotoksindir. Cyt1A endotoksini (27,3 kDa) total kristal proteinin % 40'nı oluşturur [64].

Cyt1A proteinin kodlayan genler 125 kb büyüklüğündeki bir plazmit üzerinde taşınır. Kristaller alkali ortam koşullarında çözülürler. Çözülen Cyt1A toksini hem eritrositler hem de böcek hücre kültürlerine karşı sitolitik aktivite gösterirken, çözünmeyen Cyt1A toksinleri hiçbir sitolitik aktivite göstermezler [64]

İnsektisidal kristal protein bileşimine bağlı olarak kristaller farklı şekillerde bulunabilirler. Işık mikroskobu ve elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler sonucunda baklava dilimli (bipiramidal), kübik ve yuvarlak olmak üzere çeşitli şekillerde kristal yapıları belirlenmiştir (Resim 2.2). Baklava dilimli kristaller daha çok Lepidoptera larvalarına karşı aktif iken, kübik ve yuvarlak yapılı kristaller hem Lepidoptera hem de Diptera larvalarına karşı toksik etki gösterirler [80].

Kristal morfolojisi, insektisidal kristal protein bileşimi ve hedef böceğe karşı olan biyolojik aktivite arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir [81].



Resim 2.2. Baklava dilimi şeklindeki kristal yapıların SEM görüntüsü [82]

Beta-ekzotoksinler

Beta-ekzotoksinler (β -ekzotoksin) *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*, *B. thuringiensis* subsp. *galleriae*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ve *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* gibi bazı *B. thuringiensis* alttürleri ile ilgilidir. Bu alttürler tarafından sentezlenen ürünler toksin içerirler [64,84].

β -ekzotoksinler adenin, glukoz ve allarik asitten oluşur ve sıcaklık sabittirler. RNA polimeraz enzimini inhibe ederek RNA' nın sentezlenmesini engeller. Bu yüzden de Lepidoptera, Coleoptera ve Diptera böcek takımındaki çeşitli böceklere karşı toksik etki gösterir [64].

Tip I ve tip II olmak üzere iki tip beta ekzotoksin bulunmaktadır. Tip I beta ekzotoksinler *B. thuringiensis* serotip 1, 9 ve 10 nolu suşlarından, tip II beta ekzotoksinler, Levinson ve arkadaşları tarafından *B.thuringiensis* subsp. *morrisoni* serotip 8ab' den izole edilmiştir [84].

B. thuringiensis suşunda yapılan araştırma sonucunda β - ekzotoksinlerin Cry δ -endotoksinleri kodlayan bir plazmit tarafından kodlandığı belirlenmiştir [84].

β - ekzotoksinler böceğin sindirim sisteminde etkisiz hale getirilmektedir. Ancak etkili yüksek bir doz kullanıldığında böcekler üzerinde etki gösterebilmektedir [80].

Hemolizinler

Omurgalı eritrositlerini parçalayan hemolizinler omurgalı bakteriyel patojenler içinde önemli virulens faktörlerdendir. Genel olarak insanlarda sistematik hastalıkların belirlenmesinde önemli bir faktördür. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*' den saflaştırılan bir hemolizinin *B. cereus*' da bulunan hemolizin ile aynı olduğu belirlenmiştir [85,86].

Enterotoksinler

B. thuringiensis izolatlarının *B. cereus*-diyareal tip enterotoksin ürettikleri bulunmuştur. *B. cereus* enterotoksinleri *B. cereus*' un sindirimini izleyen besin zehirlenmesi belirtilerinden sorumludur [73, 87].

Abdel-Hameed ve Landen (1994) İsveç topraklarından izole edilen 40 *B. thuringiensis* suşundan 23'ünün (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *thuringiensis*, *galleria*, *dendrolimus*, *darmstadiensis* ve *israelensis* olarak tiplendirilen) *B. cereus* diyareal enterotoksin ürettiklerini belirlemişlerdir [87].

Damgaard ve arkadaşları (1996a) çeşitli yiyeceklerden enterotoksin üreten *B. thuringiensis* suşları izole etmişler ve enterotoksin aktivitelerini belirlemek için suşların Vero hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerini incelemişlerdir [88].

Te-Giffel ve ark. (1997) enterotoksin üreten iki suşu ilk olarak *B. cereus* olarak tanımladıklarını daha sonra 16S rRNA problemleri kullanılarak yapılan tanımlama sonucunda *B. thuringiensis* olarak tanımladıklarını rapor etmişlerdir [62].

Ekzoenzimler

B. thuringiensis böceklerle karşı patojenik etkiye sahip çeşitli ekzoenzimler üretirler. Örneğin; *B. thuringiensis* tarafından proteaz ve kitinaz peritrofik zarın yapısı bozarak bağırsak epitelinden rahatlıkla geçebilmektedir [89,90].

Vejetatif insektisidal proteinler (Vip)

Son yıllarda, bazı *B. thuringiensis* izolatlarının sporulasyon aşaması sırasında üretilen cry proteinlere ilave olarak, vejetatif büyüme döneminde bir takım proteinler ürettikleri belirlenmiştir. Vejetatif insektisidal proteinler (VIP) olarak isimlendirilen bu proteinler Lepidoptera takımı böceklerin büyük bir kısmına karşı insektisidal aktivite gösterirler [91].

Bacillus thuringiensis’ lerin İnsektisidal Genleri

Büyüme döngüsünün durgun fazı süresince *B. thuringiensis* insektisidal kristal protein içeren kristal yapıda parasporal inklüzyonlar üretir. Bu toksinler çoğunlukla *B. thuringiensis*’ e özgüdür, ancak bu proteinlerin *Bacillus popilliae* ve *Clostridium bifermentas* gibi diğer bakteriler tarafından da üretilbildiği belirlenmiştir [92].

Şu ana kadar bu proteinleri kodlayan 89 farklı genin analizi yapılmıştır. Bu genler *B. thuringiensis*’ in büyüme döngüsünün durgun fazı sırasında ifade olunurlar. Bu genlerin ifade edilmesi mRNA sentezi, mRNA sentezi sonrası ve protein sentezi sonrası seviyelerde kontrol edilir [92].

Sporulasyon mRNA sentezi aşamasında sigma faktörünün aktivasyonu ile kontrol edilir ve bu yüzden de cry genlerin ifade edilmesi eş zamanlı olarak kontrol edilmiş olur. Çünkü çoğu kristal genler büyümenin yalnızca sporulasyon aşamasında sentezlenir [92].

Cry toksinleri kodlayan 50’den fazla genin analizi yapılmıştır ve bu genler dizilerindeki benzerliğe dayanılarak 15 grup içinde sınıflandırılabilir. Bununla birlikte cry toksin genleri cry1, cry2, cry3 ve cry4 olmak üzere dört büyük grup altında incelenirler [81].

cry1 Genleri

Lepidoptera takımına özgü kristal proteinler şüphesiz en iyi çalışılmış olan proteinlerdir. Bu proteinler plazmit DNA üzerinde bulunan *cry1* genleri tarafından sentezlenmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda 20 *cry1* gen dizisi analiz edilmiştir. 20 genin hepsinin de *B. thuringiensis*'in sporulasyonu sırasında baklava dilimi şeklinde kristal yapıda inklüzyonlar içerisinde biriken 130–140 kDa ağırlığında proteinler kodladığı belirlenmiştir. Bu proteinler böcek ortabağırsığının bazik ortamında çözülebilen protoksinlerdir (ön toksinlerdir) ve proteolitik olarak kristalle ilgili ya da larva ortabağırsak proteazları tarafından 60–70 kDa ağırlığında toksik fragmentlere dönüşürler [81].

cry1 genleri benzer homologileri ile diğer *cry* genlerden ayrılabilirler. *cry1A(a)*, *cry1A(b)* ve *cry1A(c)* % 80 den daha fazla aminoasit benzerliği gösterirler ve bu yüzden ayrı bir alt grup olarak değerlendirilirler. Son olarak tanımlanan *cry1B*, *cry1C* ve *cry1D* genleri *cry1A* genlerinden ve birbirlerinden oldukça farklıdırlar [93].

cry2 Genleri

cry2 genleri *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD–1, *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* Berliner ve *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* ve *kenyae* gibi çeşitli alt türlerde bulunmaktadır. 65 kDa ağırlığında bir proteini kodlar ve bu protein de kübik yapıli kristallerde toplanırlar. Bu kristal proteinler ilk olarak aynı suşta bulunan 130 kDa ağırlığındaki P1 proteinine karşılık P2 proteini olarak tanımlanmıştır [94].

Widner ve Whiteley, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1'den *cry2A* ve *cry2B* genlerini klonlamışlardır. Her iki gen de 633 aminoasit dizisine sahip 71 kDa ağırlığında bir proteini kodlar. Her iki gen de *E. coli*' de ifade edilmiş ve rekombinant proteinler saflaştırılmıştır. İki protein oldukça benzer olmalarına rağmen insektisidal etkileri farklı bulunmuştur. *cry2A*' nın hem Lepidoptera (*Manduca sexta*) hem de Diptera (*Aedes aegypti*) larvalarına karşı, *cry2B*' nin ise yalnızca Lepidoptera larvalarına karşı toksik etki gösterdiği belirlenmiştir [95].

cry3 Genleri

Şimdiye kadar *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* , *B. thuringiensis* subsp. *san diego* ve *B. thuringiensis* EG2158 olmak üzere Coleoptera takımına özgü 3 *B. thuringiensis* suşu tanımlanmıştır. Suşların her biri bir büyük protein içeren eşkenarlı kristaller üretir. Klonlama ve dizi analizleri üç türün hepsinde de aynı kristal protein geninin bulunduğu göstermektedir. *E. coli*' de ifade edilen bu gen Colorado patates böceği (*Leptinotarsa decemlinata*) için toksik olan 72 kDa ağırlığında bir proteini sentezler. Bu protein, sporla ilgili proteazlar tarafından 66 kDa ağırlığında bir proteine dönüştürülür [81, 96].

cry4 ve cyt Genleri

Kristal protein genlerinin *cry4* sınıfı, Diptera takımına özgü kristal protein genlerinin oldukça heterojen bir grubundan oluşur. *B.thuringiensis* subsp. *israelensis* suşunda bulunan 72 MDa büyüklüğündeki plazmitten izole edilen *cry4A*, *cry4B*, *cry4C* ve *cry4D* genlerinin kodladığı proteinler sırasıyla 135, 128, 78 ve 72 kDa ağırlığındadır. Bu proteinler 27 kDa ağırlığındaki cyt geninin ürünü ile birlikte yuvarlak yapılı kristallerde toplanırlar. [81].

Kristal genler tarafından sentezlenen toksinlerinin moleküler büyüklüğü ve konak özgünlüğü Çizelge 2.1'de görülmektedir.

Çizelge 2.1. Kristal genler tarafından sentezlenen toksinlerin moleküler büyüklüğü ve etkilediği konakçı grupları [97]

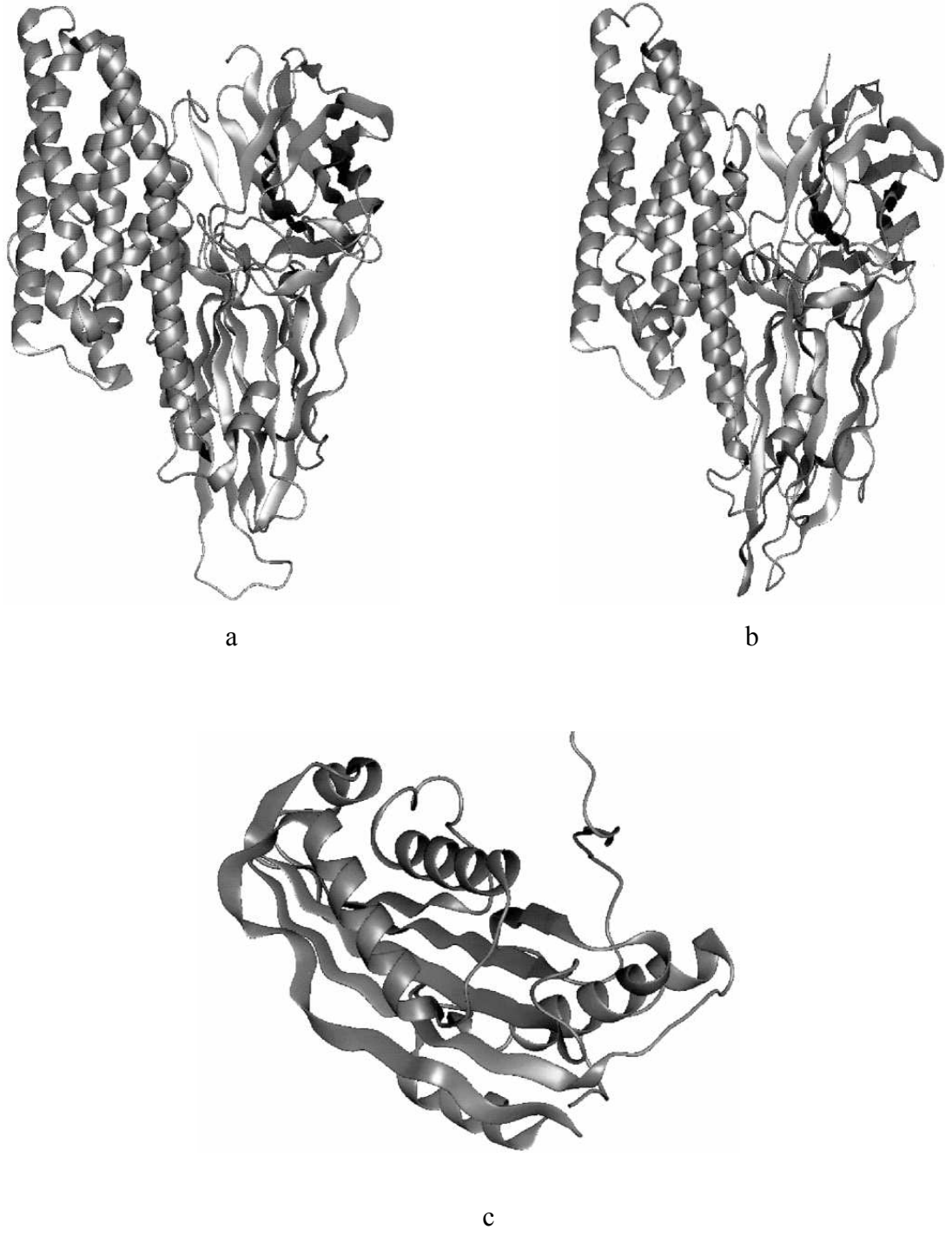
Gen tipi	Alt Sınıf	Konakçı Grupları	Protoksin (kDa)	Toksin (kDa)
<i>cry1</i>	1A(a)	Lepidoptera	130–160	60
	1A(b)	Lepidoptera/Diptera	130–160	60
	1A(c)	Lepidoptera	130–160	60
	1B	Lepidoptera	130–160	60
	1C	Lepidoptera	130–160	60
	1D	Lepidoptera	130–160	60
	1E	Lepidoptera	130–160	60
	1F	Lepidoptera	130–160	60
<i>cry2</i>	2A	Lepidoptera/Diptera	70–71	65
	2B	Lepidoptera	70–71	65
	2C	Lepidoptera	70–71	65
<i>cry3</i>	3A	Coleoptera Coleoptera	73	55
	3B	Coleoptera	73	55
	3C	Coleoptera	73	55
	3D	Diptera	73	55
<i>cry4</i>	4A	Diptera	134	46–48
	4B	Diptera	128	46–48
	4C	Nematot	58	?
	4D		72	30
<i>cyt</i>	CytA		27	?

İnsektisidal Kristal Proteinlerinin Yapısı

B. thuringiensis'in Cry ve Cyt proteinleri por oluşturan toksinler olarak isimlendirilen bakteri toksinleri sınıfına aittir. Por oluşturan toksinler α -sarmal ve β -pilili toksinler olmak üzere iki temel grupta incelenirler. α -sarmal toksin grubunda kolisinler, ekzotoksin A ve üç bölgeli Cry toksinler yer almaktadır. β - tabakalı toksin grubunda ise aerolizin, α -hemolizin, antraks koruyucu antijen ve Cyt toksinler yer almaktadır [98].

Altı farklı Cry proteinin (Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa ve Cry4Ba) üç boyutlu tersiyer yapısı X-ışınları kristallografi yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 2.2). Bu proteinlerin tersiyer yapısının etki mekanizması ve yerleşim düzeni bakımından yüksek derecede benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan inceleme sonucunda proteinlerin üç bölgeye sahip olduğu belirlenmiştir. Birinci bölge (N-ucu) merkezde hidrofobik yapıda α -sarmal ve çevresinde amfipatik yapıda 6 tane sarmal yapı ile çevrelenmiş 7 α -sarmal yığınının oluşmuştur. Bu bölge ortabağırsak zarına tutunmadan ve por oluşumundan sorumludur. İkinci bölge birbirine paralel yerleşmiş 3 tane β -pili yapısından oluşmaktadır. Üçüncü bölge (C-ucu) β -sandevic (sıkıştırılmış) yapıdadır. İkinci ve üçüncü bölgeler reseptöre bağlanmadan sorumludurlar [99].

Cyt proteinlerin üç boyutlu yapısının incelenmesi sonucunda bir β -pilili tabakanın etrafına sarılmış, sarmal yapıda iki α -sarmal yapıyı taşıyan tek bir α - β bölgeden oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 2.2). Cyt proteinler yapısal olarak *Volvariella volvaceae* mantarı tarafından üretilen volvatoksin A2 ile benzerdir [99].



Şekil 2.2. İnsektisidal kristal proteinlerin üç boyutlu kristal yapısı [99]
a- Cry1Aa, b- Cry3A, c- Cyt2A

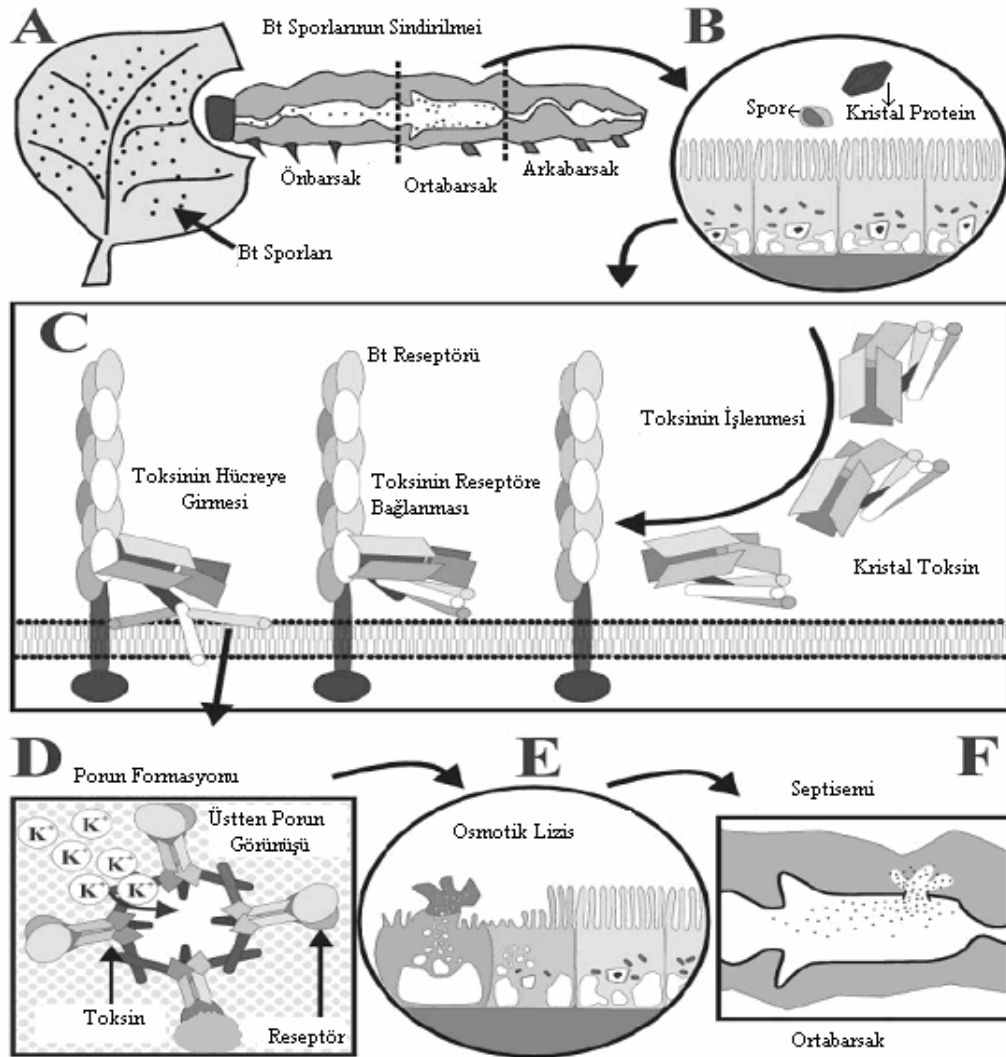
İnsektisidal Kristal Proteinlerin Hedef Böceklerdeki Etki Mekanizması

B. thuringiensis'in biyolojik aktivitesi Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera gruplarındaki hassas böceklerle karşı *cry* ve *cyt* genlerinin oluşturduğu aktif insektisidal kristal proteinler sayesinde. İnsektisidal proteinlerin etkili olabilmesi için böcek tarafından sindirilmesi gerekir [100].

Genel olarak endotoksinler ile muamele edilmiş yiyeceklerin tüketimi, Lepidoptera larvalarının beslenmesinin durmasına ve bağırsağın felç (paraliz) olmasına neden olur. Toksinlerin yüksek dozuyla beslenen larvalar genel bir felç olayı geçirir ve ölür [64].

Yapılan histolojik çalışmalarla *B. thuringiensis* Cry proteinlerinin etki mekanizmasını şu şekilde özetlemek mümkündür:

Larvalar tarafından sindirimle alınan insektisidal kristal proteinler bağırsağın alkali ortamında çözülür ve proteazlar tarafından aktif hale getirilir. Aktif hale gelen proteinler daha küçük yapıda toksinlere dönüşür. Toksinler orta bağırsak silindirik epitel hücrelerinin zarlarında bulunan özel reseptörlere bağlanırlar. Epitel hücre zarlarında porlar ve iyon kanalları oluşturarak hücrelerin iyon ve su dengesinin değişmesine neden olurlar. Toksinin yüksek dozlarda uygulanması sonucunda orta bağırsak epiteli parçalanır ve hızlı bir ölüm gerçekleşir. Daha düşük dozlarda ya da daha az duyarlı böceklerde, bağırsak hücrelerinin zarar görmesi normal bağırsak salgısının durmasında etkilidir ve bu olay da sporların açılmasına izin verir. Vejetatif hücreler daha sonra içeri girerek septisemiye neden olur ve ölüm gerçekleşir (Şekil 2.3.) [101].



Şekil 2.3. *B. thuringiensis* 'in hedef böcek üzerindeki etki mekanizması [93]

A. Larva tarafından sporlu *B. thuringiensis* 'in ve kristal proteinlerin yenmesi B. Ortabağırsakta protoksin halde bulunan kristal proteinlerin alkali ortamda çözünmesi C. Ortabağırsak proteazları tarafından protoksinlerin toksin proteinlere dönüştürülmesi, toksin proteinlerin epitel hücre zarındaki özgün reseptörlere bağlanması, toksinin hücre membranından içeriye girmesi D. Porların ve iyon kanallarının oluşması E. Epitel hücrelerinde osmotik dengenin bozulması sonucunda osmotik parçalanmanın gerçekleşmesi F. Septisemi sonucunda ölümün gerçekleşmesi

Orta bağırsak epitelı üzerindeki reseptörlerin özgüllüğü insektisidal aktiviteyi belirlemede önemlidir. İmmünokimyasal problemler kullanılarak yapılan çalışmalar hem

Cry hem de Cyt toksinlerin orta bağırsak epitel hücrelerinin fırçalı kenarlarına bağlandıklarını göstermektedir [102].

In vitro bağlanma çalışmaları fırçalı kenar zar veziküllerinin (BBMV) üzerindeki bölgelerin, yüksek bağlanma ilgisi gösterdiğini belirlemiştir. Çeşitli durumlarda bu bölgelere karşı yüksek bağlanma ilgisi, konak böceğin duyarlılığı ile de ilgili olmaktadır [103,104].

Cyt toksinler ise protein reseptörlerine bağlanmazlar ve doğrudan zar lipitleri ile etkileşime girerek zardan içeri girer ve por oluştururlar [105] ya da deterjan benzeri maddeler gibi etkileşim yaparak zar yapısını bozarlar [106].

B. thuringiensis subsp. *israelensis* ile muamele edilmiş sivrisinek larvaları genel olarak muameleden sonraki bir saat içinde beslenmeyi durdururlar, iki saate kadar aktivite azalır ve genel sindirimden sonra altı saat içinde felç olayı gerçekleşir. Diğer *B. thuringiensis* izolatlarının çoğu *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'in ki kadar hızlı bir etkiye sahip değildir. Beslenmenin durması *B. thuringiensis* sporlarının ve toksinlerinin sindiriminden sonra oluşabilir. Bununla birlikte kınkanatlı böceklerde ve tırtıllarda ölüm yalnızca genç larvalar için hızlıdır (1–2 gün) ve daha büyük larvalar için bir haftadan daha uzun zaman alır [64].

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Toprak örnekleri

Bu çalışmada Ankara'nın farklı yerlerinden (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Deneme Tarlaları, Çayyolu, Beynam Ormanı, Gazi Üniversitesi Kampüsü, ODTÜ Kampüsü, Eskişehir yolu Lodumlu) alınan toprak örnekleri kullanılmıştır.

Bakteri örnekleri

Çalışmada, 60'ı bu topraklardan ve 7'si kültür koleksiyonlarından temin edilen referans suşlar olmak üzere, toplam 67 adet *Bacillus* suşu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan referans *Bacillus thuringiensis* suşlarından *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73, *Bacillus thuringiensis* var. *tolworthi* HD-125, *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* HD-137, *Bacillus thuringiensis* 916 Universidad Nacional Autónoma de México Biyoteknoloji Enstitüsü'den, ticari *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Ankara Zirai Mücadele Kurumu'ndan, *Bacillus thuringiensis* RSKK 380 ve *Bacillus thuringiensis* Mu4 suşları ise Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

Böcek örnekleri

Larvalar üzerine olan toksik etki denemeleri için Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Böcek Yetiştirme Laboratuvarı'ndan temin edilen *Ephestia kuehniella* ZELLER, (un güvesi, değirmen güvesi) (Lepidoptera: Pyralidae) ve *Trogoderma granarium* EVERTS, (kapra böceği, tahıl güvesi) (Coleoptera: Dermestidae)'un üçüncü dönem larvaları kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan iki böcek türünün sistematigi aşağıda verilmiştir:

Ephestia kuehniella türünün sistematığı

Takım : Lepidoptera (Kelebekler)
 Familya : Pyralidae
 Cins : *Ephestia*
 Tür : *Ephestia kuehniella* Zeller (Un güvesi)

Trogoderma granarium türünün sistematığı

Takım : Coleoptera (Kırankatlılar)
 Familya : Dermestidae
 Cins : *Trogoderma*
 Tür : *Trogoderma granarium* Everts (Kapra böceği, Tahıl güvesi)

Besiyerleri

Nutrient Agar (NA) Besiyeri (gr/lt) : Et Özütü (beef extract) 1,0 gr, maya özütü (yeast ekstrakt) 2,0 gr, pepton 5,0 gr, sodyum klorür 5,0 gr, agar 15 gr.

Sodyum asetatlı Luria Bertani (LB) Besiyeri (gr/lt): Tripton 10gr, maya özütü 5 gr, sodyum klorür (NaCl) 5 gr, sodyum asetat (NaCOOH₃) 20,5 gr.

Luria Bertani Agar (LA) Besiyeri (gr/lt): Tripton 10gr, maya özütü 5 gr, sodyum klorür (NaCl) 5 gr, agar 15 gr.

Nutrient Sıvı (NB) Besiyeri (gr/lt) : Et Özütü 1,0 gr, Maya Özütü 2,0 gr, Pepton 5, 0 gr sodyum klorür (NaCl) 5,0 gr.

T3 Sıvı Sporlanma Besiyeri (gr/lt): Tripton 3 gr, triptoz 2 gr, maya özütü 1,5 gr, mangan klorür (MnCl₂) 0,005 gr, monobazik sodyum fosfat (NaH₂PO₄) 6 gr, dibazik sodyum fosfat (Na₂HPO₄) 7,1 gr.

T3 Agar Sporlanma Besiyeri (gr/lt): Tripton 3 gr, triptoz 2 gr, maya özütü 1,5 gr, mangan klorür (MnCl_2) 0,005 gr, monobazik sodyum fosfat (NaH_2PO_4) 6 gr, dibazik sodyum fosfat (Na_2HPO_4) 7,1 gr, agar 15 gr.

Besiyerlerinin pH' sı 0,01 N HCl ve 0,01 NaOH ile $6,8 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmıştır. T3 sporlanma besiyerinin pH' sı monobazik ve dibazik sodyum fosfat çözeltilerinin belirli oranlarda karıştırılması ile $6,8 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmıştır. Besiyerleri 121°C ' de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

Tampon ve Çözeltiler

Kromozomal DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

-*STE çözeltisi:* 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0)

-*Lizozim Çözeltisi:* 10 mg/ml olacak şekilde Tris-EDTA tamponu içerisinde hazırlanmıştır.

-*Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi:* 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti bir gece 4°C ' de bekletildikten sonra kullanılmıştır.

-*Tris-EDTA tamponu (TE):* 10 mM Tris, 1 mM EDTA

Toplam hücre protein izolasyonu için gerekli çözeltiler

-*Fosfat tamponu (gr/lt):* 6,8 gr KH_2PO_4 ve 8.7 gr K_2HPO_4 tartılarak ayrı ayrı 1000 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan iki çözelti belirli oranlarda karıştırılarak pH 7,0'a ayarlanmıştır.

-*Örnek Tamponu:* 5 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 8 ml gliserol, 4 ml 2 β -merkaptotanol, 2 gr SDS, 0,01 gr bromfenol mavisi, 3ml distile su ilave edilerek hazırlanmıştır.

Protein elektroforezi için gerekli çözeltiler

-*Akrilamid Çözeltisi (% 30)*: 29,2 gr akrilamid, 0,8 gr N, N' metilen-bis-akrilamid 100 ml distile su içerisinde çözölmüştür. Hazırlanan çözelti Whatman No:1 filtre kâğıdından geçirilerek süzülmüş ve 4°C' de muhafaza edilmiştir.

-*1,5 M Tris-HCl (pH 8,6)*: 18,165 gr Tris 75 ml distile suda çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH 8,6'ya ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

-*1M Tris-HCl (pH 6,8)*: 12,01 gr Tris 75 ml distile suda çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

-*SDS (%10' luk)*: 10 gr SDS 100 ml distile su içerisinde çözölerek hazırlanmıştır.

-*Amonyum persülfat (AP) (%10' luk)*: 10 gr AP 100 ml distile su içerisinde çözölerek hazırlanmıştır.

-*Elektroforez stok yürütme tamponu (pH 8,3) (5x)*: 25 mM Tris, 250 mM Glisin, %1 (w/v) SDS, distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

-*Tespitleme çözeltisi*: 25 ml %100 (w/v) TCA (Trikloroasetik asit), 82.5 ml Metanol, 142.5 ml distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

-*Stok boya çözeltisi*: 1 gr Coomassie Brilliant Mavisi G-250, 46.5 ml HCl karıştırılarak hacim distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmıştır. Boya çözüldükten sonra Whatman No:1 filtre kâğıdından süzülmüş ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanmıştır.

-*Boyama çözeltisi*: 300 ml stok boya çözeltisi, 35 ml 10 N (w/v) KOH, 25 ml %100 (w/v) TCA karıştırılarak hazırlanmıştır.

Plazmit DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

-*Çözelti I*: % 6,7 Sükroz, 50mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)

-*Çözelti II*: 25 mM Tris (pH 8,0) ile hazırlanmış 10mg/ml Lizozim

-*Çözelti III*: 0.25 M EDTA (pH 8,0), 50 mM Tris (pH 8,0)

-*Çözelti IV*: 50 mM Tris, 20 mM EDTA, %20 SDS

-*NaCl ile doyurulmuş fenol (pH 7.0) çözeltisi*: Katı fenol 65 °C' de eritilerek 1:1 oranında 1M NaCl ile pH 7.0 olana kadar doyurulmuştur.

-*Kloroform: İzoamilalkol (24:1) çözeltisi:* 24 ml kloroform ile 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlanmıştır.

-*RNaz Çözeltisi:* RNaz 10 mg/ml olacak şekilde 0,01 M sodyum asetat (pH 5,2) çözeltisi içinde çözülmüştür. 15 dakika 100 °C’ de bekletilmiş ve oda sıcaklığında yavaş yavaş soğutulmuştur. Çözeltinin pH’sını ayarlamak için 1 M Tris-HCl (pH 7,4) çözeltisinden 0,1 hacim ilave edilmiş, karıştırılarak -20 °C’ de saklanmıştır.

-*Tris-EDTA tamponu (TE):* 10 mM Tris, 1 mM EDTA

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler

-*Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponu (x50) (pH 8.0):* 242 g Tris, 57,1 ml Glasiyal asetik asit, 0,5 M 100 ml EDTA (pH 8.0), maddeler distile su içerisinde çözülerek hacim 1000 ml’ ye tamamlanmıştır.

-*Agaroz:* %0,8’ lik ve %2’ lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.

-*Yükleme tamponu:* 40 gr süktroz, 0,025 gr bromofenol mavisi, 0,25 gr ksilen siyanol 100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

-*Etidyum bromür:* 10 mg/ml derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler

-*Taq polimeraz tamponu 10x:* 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 1 mg/ml jelatin.

-*MgCl₂:* 25 mM

-*Nükleotit Karışımı:* 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)

-*Taq polimeraz:* 5 u/ µl

-*Primerler:* Kristal genlerinin belirlenmesi için kullanılan primerler Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Kristal genlerinin belirlenmesi için PZR’ da kullanılan primerler ve çoğaltılan gen bölgelerinin büyüklükleri

Primer	Nükleotid Dizisi (5’-3’)	Çoğaltılan Gen Bölgesi	PCR Ürünü Büyüklüğü(bp)
CJI-1 CJI-2	TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA TATCGGTTTCTGGGAAGTA	<i>cry1</i>	272–290
II(+) II(-)	TAAAGAAAGTGGGGAGTCTT AACTCCATCGTTATTTGTAG	<i>cry2</i>	1556–1523
CJIII-20 CJIII-21	TTAACCGTTTTTCGCAGAGA TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG	<i>cry3</i>	652–733
Un4(d), Un4(r),	GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC GCGTGACATACCCATTTCAGGTCC	<i>cry4</i>	439
Un7,8(d), Un7,8(r),	AAGCAGTGAATGCCTTGTTTAC CTTCTAAACCTTGACTACTT	<i>cry7</i> <i>cry8</i>	420 423
Gral-nem(d) Gral-nem(r)	TTACGTAAATTGGTCAATCAAGCAAA AAGACCAAATTCAATACCAGGGTT	<i>cry5</i> <i>cry12</i> <i>cry14</i> <i>cry21</i>	474 477 483 489
Gral-cyt(d) Gral-cyt(r)	AACCCCTCAATCAACAGCAAGG GGTACACAATACATAACGCCACC	<i>cyt1Aa</i> <i>cyt1Ab</i>	522 525

3.2. Metot

3.2.1. Toprak örneklerinin alınması

Toprağın üst yüzey materyalleri süpürüldükten sonra steril bir spatula ile yaklaşık yüzeyden 2–5 cm aşağıdan 10 gram toprak örneği alınarak steril cam kavanozlara konmuştur. Alınan örnekler kullanılabilecek kadar +4 °C’ de saklanmıştır [107].

3.2.2. Bakterilerin izolasyonu

Bacillus cinsi bakterilerin izolasyonu

Bacillus cinsine ait bakteri türlerinin izolasyonu için Nutrient Agar (NA) besiyeri kullanılmıştır. Ankara iline ait farklı semtlerden alınan toprak örneklerinin 1 gramı, içinde 9 ml steril serum fizyolojik çözeltisi bulunan deney tüplerine aktarılmıştır. Karıştırıcıda 5 dk kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Örnekler su banyosunda 65 °C' de 60 dk tutularak vejetatif bakteri formlarının ölmesi ve ortamda bu bakterilerin sporlu formlarının kalması sağlanmıştır. Örneklerden 10⁻¹'den 10⁻⁷' ye kadar seri seyreltmeler hazırlanarak, 10⁻³ seyreltmeden itibaren NA besiyerine 0,1 ml ekimler yapılmış ve 30 °C' de 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda morfolojik olarak farklı olan koloniler seçilmiştir [107].

Seçilen farklı koloniler NA besiyerine ekilerek saf kültürleri elde edilmiştir. Saf kültürler daha sonra Gram boyama ile boyanmıştır. Boyama sonucunda morfolojik olarak Gram pozitif çubuk şekilli olan bakteriler deney materyali olarak seçilmiştir.

Bacillus thuringiensis' in izolasyonu

Bacillus thuringiensis türü bakterilerin izolasyonu için 0,25 M sodyum asetat içeren Luria Bertani sıvı (LB), Luria Bertani agar (LA) ve T3 agar (sporlanma) besiyortamları kullanılmıştır [108].

B. thuringiensis türlerinin izolasyonu Travers' in önerdiği yöntemle göre yapılmıştır. 1 gram toprak örneği 0.25 M sodyum asetat içeren LB sıvı besiyerine konulmuştur. 30°C' de 4 saat boyunca çalkalamalı etüvde (250 rpm) inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda örneklerin 1,5 ml' si su banyosunda 80°C' de 10 dk sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Sıcaklığa maruz kalmış örnekler LA besiyerine ekilmiş ve 30°C' de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda rast gele seçilen farklı koloniler T3 agar besiyerine ekilmiş ve bir gece 30°C' de inkübasyona bırakılmıştır. Faz-

kontrast mikroskopunda yapılan inceleme sonucunda parasporal yapıların olup olmadığına göre kültürlerin ayrımı yapılmıştır [108].

3.2.3. Bakterilerin muhafazası

Ependorf tüplerine 0,3 ml gliserol konularak, 121°C’ de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besiyerinde aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 0,6 ml’ si gliserol içeren steril ependorflara ilave edilerek -80°C’ de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir [109].

3.2.4. Bakterilerin tanımlanması

API test kitleri ile bakterilerin tanımlanması

Gram pozitif çubuk şekilli olan bakterilerin tür seviyesinde tanımlanmaları API 20 E ve API 50 CHB Analitik Profil İndeks (Biomérieux, Marcy l’ Etoile, France) test kitleri kullanılarak Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

Bakteriler NA besiyerine ekilmiş ve 30°C’ de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloniler steril bir öze yardımıyla toplanarak API 20 E için içerisinde % 0.8’lik NaCl bulunan 2 ml’ lik test tüplerine, API 50 CHB için ise içerisinde amonyum sülfat, maya özütü, fenol kırmızısı ve tripton bulunan 10 ml’ lik hazır API 50 CHEB (*Enterobacteriaceae/Bacillus*) besiyerine aktararak süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon içerisindeki bakterilerin yoğunluğu 3 No’lu McFarland standardına eşitlenmiştir.

Hazırlanan bakteri süspansiyonları API 20 E ve API 50 CHB test kuyucuklarına ekilmiştir (strip). Stripler 30°C’ de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 ve 48 saatlik süreler sonunda test kuyucuklarında meydana gelen renk değişimlerine göre değerlendirmeler yapılmıştır. Alınan pozitif sonuçlar bilgisayar ortamına girilerek bakterilerin tür seviyesinde tanımlamaları yapılmıştır [56].

16S rRNA dizi analizi ile bakterilerin tanımlanması

Faz- kontrast mikroskopu ile yapılan inceleme sonucunda parasporal kristal yapıları taşıdıkları belirlenen bakteri suşların tanımlanmaları 16S rRNA dizi analizi yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Kromozomal DNA izolasyonu

Bakterilerin kromozomal DNA'ları Maniatis'e göre izole edilmiştir [110]. *B. thuringiensis* suşları 5ml' lik NB besiyerine ekilmiş ve 30°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücre kültürü ependorf tüplere aktararak 13 000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek çöktürülmüş ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. Pelletlerin üzerine 500 ml STE tamponu konularak yeniden çözülmüştür. Daha sonra her bir tüpe 10 µg lizozim ilave edilerek karıştırılmış ve 37°C'de bir saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda her bir tüpe 0,1 hacim olacak şekilde 3 M sodyum asetat çözeltisinden ilave edilmiştir. Alt üst edilerek 65°C' de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 500 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek karıştırılmış ve 13 000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda üstteki sıvı kısım steril tüplere alınmıştır. Üzerine 2 hacim %96' lık etil alkol ilave edilmiş ve -20°C' de 30dk bekletilmiştir. Daha sonra 13 000 rpm' de santrifüj edilerek DNA pellet halinde elde edilmiştir. DNA'lar %70' lik etil alkol ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Elde edilen DNA pelletleri 60 µl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) tamponu içerisinde çözülerek -20 °C' de kullanılabilecek kadar muhafaza edilmiştir [110].

İzole edilen kromozomal DNA' lar 67F: TGA AAA CTG AAC GAA ACA AAC CTC ve 1671R: TCA AAA CTG AAC AAA ACG AAA primerleri kullanılarak PZR işlemi ile 1554 bp' lik 16S rRNA genini taşıyan DNA bölgesinin amplifikasyonu için kullanılmıştır. Amplifiye olan PZR ürünleri saflaştırılmış (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA) ve CEQ8000 DNA analiz sistemi (Beckman Coulter) ile analiz edilmiştir. Elde edilen diziler Gen Bankasında kayıtlı bulunan *Bacillus* türlerine ait 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılarak izolatların dizi eşleştirmeleri yapılmıştır [61].

16S rRNA geninin belirlenmesi için aşağıdaki PZR programı kullanılmıştır.

95 °C' de	5dk		Başlangıç denaturasyon aşaması
94 °C' de	15 sn	}	35 döngü
52 °C' de	15 sn		
72 °C' de	1 dk 30 sn		
72 °C' de	5 dk		Son uzama aşaması

3.2.5. Sodyum dodesil poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Toplam hücre protein izolasyonu

Tanımlanan türlerin toplam hücre proteinlerinin izolasyonu Kishore ve arkadaşlarının önerdiği yöntemle yapılmıştır [111]. Bakteriler 5 ml' lik NB besiyerinde iki kez aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen bakteriler 50 ml' lik NB besiyerine aktarılmış ve 24 saat 30°C' de 100 rpm' de inkübe edilmiştir. Hücre kültürü 5 000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiş ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. Pellet 5 ml steril distile su ile iki kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra pellet üzerine 2 ml fosfat tamponu (pH 6,8) ilave edilmiştir. Hücreler yeniden süspansiyon haline getirilmiş ve 50 MHz ultrasonikasyon ile buz içerisinde 10 dk sonikasyona tabii tutulmuştur. Sonikasyon işleminden sonra 2 000 rpm' de 2 dk santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı kısımdan 75 µl alınarak 25 µl örnek tamponu ile karıştırılmış ve 5 dakika kaynatılmıştır. Elektroforez yapılıncaya kadar protein örnekleri -20°C' de saklanmıştır [111].

Örneklerdeki protein miktarını belirlemek için spot test kullanılmıştır. Şerit halinde kesilen Whatman No: 1 süzgeç kâğıdına, hazırlanan protein örneklerinden 2,5 µl emdirilmiştir. Kurutulduktan sonra 10 dk boyama çözeltisi bekletilmiş ve su ile yıkanmıştır. Boyanma derecesine göre örneklerin eşit miktarda yüklenmesi sağlanmıştır [112].

SDS-PAGE jellerinin Hazırlanması

Toplam hücre protein analizleri Laemmli' ye göre % 4,5' luk yığınlaştırıcı ve %10'luk ayırıcı jel kullanılarak sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yapılmıştır [113].

Ayırma Jelinin Hazırlanışı

16,7 ml Akrilamid/Bis Akrilamid (%30'luk), 19,8 ml distile su, 12,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,6), 500 µl % 10'luk APS (amonyum per sülfat), 500 µl % 10'luk SDS birbirine iyice karıştırıldıktan sonra 30 µl TEMED (N,N, tetraetilen diamid) ilave edilerek, 1 mm aralığa sahip iki jel camı arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin üst kısmı distile su ile kaplanarak hava ile teması önlenmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir.

Yığma Jelin Hazırlanışı

3,4 ml %30'luk Akrilamid/Bis Akrilamid, 13,6 ml distile su, 2,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 200 µl % 10'luk APS ve 200 µl % 10'luk SDS birbiri ile iyice karıştırıldıktan sonra 20 µl TEMED ilave edilmiştir. Bu karışım, polimerize olan ayırma jelinin üzerindeki distile su uzaklaştırıldıktan sonra ayırma jeli üzerine dökülmüştür. Tarak yerleştirilmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir.

SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Polimerizasyonu takiben tarak çıkarılmış, kuyucuklar elektroforez yürütme tamponu ile yıkandıktan sonra tanka sabitlenmiş ve elektroforez düzeneği (Scie-Plus Vertical Electrophoresis) yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Örnekler kuyucuklara yüklenmiş ve 30 mA' de yaklaşık 200 V' ta ortalama 8 saat yürütülmüştür.

SDS-PAGE jellerin boyanması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller, tespitleme çözeltisi içerisinde bir gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisine alınmış ve ortalama iki gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dk'lık aralıklarla yıkanarak jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır [114]. Jellerin fotoğrafları karanlık odada ışıklı beyaz tabla üzerinde çekilmiştir.

3.2.6. Plazmit DNA izolasyonu

Tanımlanan türlerin plazmit DNA izolasyonları Anderson ve ark.'larının önerdiği yöntemle yapılmıştır. İzole edilen suşlar 5ml'lik NB besiyerine ekilmiş ve 30°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücre kültürü ependorf tüplere aktararak 12 000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek çöktürülmüş ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 380 µl çözelti I' den ilave edilmiş ve yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. 37°C' de 15 dk bekletilmiştir. Üzerine 96,5 µl çözelti II ilave edilmiştir. 10 dk 37°C' de bekletilmiştir. Üzerine 50 µl çözelti III, 30 µl çözelti IV ilave edilmiş ve hafifçe karıştırılmıştır. Hücrelerin tamamen parçalanması için 10 dk 37°C' de bekletilmiştir. Örnekler yüksek hızda 30 saniye karıştırılmıştır. Üzerine taze hazırlanmış 30 µl 3,0 N NaOH çözeltisi ilave edilmiş ve 10 dk alt üst edilerek karıştırılmıştır. Üzerine 50 µl 2 M Tris-HCl pH (7,0) ilave edilmiştir. 3 dk hafif bir şekilde karıştırılmıştır. Üzerine 72 µl 5,0 M NaCl çözeltisinden ilave edilmiş ve parmakla vurularak hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra üzerine 700 µl NaCl ile doyurulmuş fenol (pH 7.0) çözeltisinden ilave edilmiş, karıştırılarak 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz steril bir ependorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 700 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisinden ilave edilmiştir. 10 000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst faz steril bir tüpe alınmıştır. Eşit hacimde (1:1) izopropanol ilave edilmiştir. 0°C' de 30 dakika bekletilmiştir. 13 000 rpm' de 20 dk santrifüj edilmiş ve izopropanol uzaklaştırılmıştır. Elde edilen plazmit DNA'lar kurutulmuş ve üzerine 60 µl Tris-EDTA çözeltisi ilave edilmiştir. Plazmit DNA'lar -20°C' de saklanmıştır [115].

3.2.7. Agaroz jel elektroforezi

Plazmid DNA'ların yürütülmesinde 1xTAE tamponu içinde kaynatılarak çözüldükten sonra etidyum bromür ilave edilerek hazırlanmış % 0,8' lik agaroz jel kullanılmıştır. Kullanılan elektroforez (BIORAD) yatay konumda olup jel plaklarının büyüklüğü 70x 70 mm'dir. Elektroforez işleminden önce RNA'nın parçalanması için plazmit DNA'lara 1 µl RNaz çözeltisi ilave edilmiş ve 1 saat 37°C' de inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerin 20 µl'si boyama tamponu ile boyanmış ve hazırlanan jele yüklenmiştir. Yüklenen örnekler 1xTAE tamponu içinde 70 V' ta 3–3,5 saat süre ile yürütülmüştür. Yürütme işleminin sonunda plazmit DNA'ların görüntülenmesi DNA görüntüleme cihazında (Biometra BioDoc Analyze) UV ışık altında yapılmıştır. Jellerin fotoğrafları dijital olarak bilgisayar ortamında çekilmiştir [110].

3.2.8. Plazmit DNA büyüklüklerinin hesaplanması

Suşların plazmit DNA büyüklüklerinin saptanmasında, moleküler ağırlıkları bilinen DNA markırlarının elektroforetik hareketlilikleri ile büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişkiden yararlanılmıştır. Belirteç (markır) DNA moleküllerinin agaroz jel fotoğrafları üzerinde ölçülen göç aralıkları ile bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak eğrileri çıkarılmıştır. İstatistiksel analizlerle her farklı jel için korelasyon katsayısı ve eğrinin eğimi belirlenerek bakterilerden izole edilen plazmidlerin büyüklükleri saptanmıştır [116].

$$\text{Eğrinin Eğimi (I)} = \frac{E - (G.C)}{B - (G.A)} \quad (3.1)$$

$$\text{Korelasyon Katsayısı (J)} = \frac{E - (G.C)}{\sqrt{[D - (H.C)].[B - (G.A)]}} \quad (3.2)$$

$$\text{Moleküler büyüklük (W)} = \text{Antilog}_{10} [I. (\alpha - G) + H] \quad (3.3)$$

$$A = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n \quad (3.4)$$

$$B = X_1^2 + X_2^2 + X_3^2 + \dots + X_n^2 \quad (3.5)$$

$$C = \log_{10} Y_1 + \log_{10} Y_2 + \log_{10} Y_3 + \dots + \log_{10} Y_n \quad (3.6)$$

$$D = (\log_{10} Y_1)^2 + (\log_{10} Y_2)^2 + (\log_{10} Y_3)^2 + \dots + (\log_{10} Y_n)^2 \quad (3.7)$$

$$E = X_1(\log_{10} Y_1) + X_2(\log_{10} Y_2) + X_3(\log_{10} Y_3) + \dots + X_n(\log_{10} Y_n) \quad (3.8)$$

$$\text{Ortalama X (G)} = \frac{A}{N} \quad (3.9)$$

$$\text{Ortalama Y (H)} = \frac{C}{N} \quad (3.10)$$

X= Marker DNA moleküllerinin agaroz jel üzerindeki göç aralığı (mm)

Y= Marker DNA moleküllerinin büyüklüğü (kilobaz)

A= Moleküler büyüklüğü bilinmeyen plazmitin jel üzerindeki göçü

3.2.9. İnsektisidal kristal genlerinin PZR ile analizi

B. thuringiensis türlerinin insektisidal kristal gen analizleri *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry7*, *cry8*, *cry5*, *cry12*, *cry14*, *cry21* ve *cyt1* genleri için genel primerleri (Çizelge 3.1) kullanılarak PZR yöntemi ile belirlenmiştir [117–120]. Kalıp DNA olarak plazmit DNA' lar kullanılmıştır.

PZR işlemi için 5 µl Taq tamponu (10x), 4 µl MgCl₂, 1 µl dNTP, 0,5 µl primer, 5 µl kalıp DNA ve 0,1 µl Taq enzimi ilave edilmiş ve reaksiyon hacmi distile su ile 50 µl' ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu karışım PZR cihazına (Biometra) yerleştirilmiş ve her bir gen için aşağıda verilen programlar kullanılmıştır.

- *cry1* ve *cry3* genlerinin belirlenmesi için aşağıdaki PZR programı kullanılmıştır [117]:

95 °C' de 2dk	Başlangıç denaturasyon aşaması
95 °C' de 1 dk	30 döngü
48 °C' de 1 dk	
72 °C' de 1 dk	
72 °C' de 5 dk	Son uzama aşaması

- *cry2* genlerinin belirlenmesi için aşağıdaki PZR programı kullanılmıştır [118]:

94 °C' de	5dk	Başlangıç denaturasyon aşaması
94 °C' de	1 dk	} 25 döngü
45 °C' de	45 sn	
72 °C' de	2 dk	
72 °C' de	10 dk	Son uzama aşaması

- *cry7* ve *cry8* genlerinin belirlenmesi için aşağıdaki PZR programı kullanılmıştır [119]:

95 °C' de	2dk	Başlangıç denaturasyon aşaması
95 °C' de	1 dk	} 30 döngü
*49 °C' de	1 dk	
72 °C' de	1 dk	
72 °C' de	5 dk	Son uzama aşaması

**cry 7* geni için birleşme sıcaklığı 54 °C olarak seçilmiştir.

- *cry4* geninin belirlenmesi için aşağıdaki PZR programı kullanılmıştır [78]:

94 °C' de	1dk	Başlangıç denaturasyon aşaması
94 °C' de	1 dk	} 25 döngü
60 °C' de	1dk	
72 °C' de	1 dk	
72 °C' de	10 dk	Son uzama aşaması

- *cry5, cry12, cry14* ve *cry21* genlerinin belirlenmesi için aşağıdaki PZR programı kullanılmıştır [120]:

95 °C' de	2dk	Başlangıç denaturasyon aşaması
95 °C' de	1 dk	} 30 döngü
50 °C' de	1 dk	
72 °C' de	1 dk	
72 °C' de	5 dk	Son uzama aşaması

- *cyt1Aa* ve *cyt1Ab* belirlenmesi için aşağıdaki PZR programı kullanılmıştır [120]:

95 °C' de 2 dk Başlangıç denaturasyon aşaması

95 °C' de 1 dk }
51 °C' de 1 dk } 30 döngü
72 °C' de 1 dk }

72 °C' de 5 dk Son uzama aşaması

Elde edilen PZR ürünleri Bölüm 3.2.6 belirtildiği şekilde % 3' lük ve %2' lik agaroz jeller hazırlanarak yürütülmüştür. Jellerin görüntülenmesi görüntüleme cihazı ile yapılmıştır.

cry2 genlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile analizi

Farklı *cry2* genlerinin belirlenmesi için II(+) ve II(-) genel primeri ile elde edilen pozitif PZR ürünleri *DdeI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmiştir.

10µl pozitif PZR ürünü 2 µl *DdeI* enzimi (10 Unit) ve 2 µl enzim tamponu ile karıştırılmış ve 37 °C' de bir gece bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda enzim kesim ürünleri %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüştür. Elektroforez sonucunda jel etidyum bromitle (10 mg/ml) boyanmış ve UV ışık altında DNA görüntüleme cihazında görüntülenmiştir [118].

3.2.10. İnsektisidal kristal proteinlerin izolasyonu

Bacillus thuringiensis izolatlarının kristal proteinleri Armengol ve ark.'larının önerdiği yönteme göre izole edilmiştir [121]. Aktifleştirilen *B. thuringiensis* izolatları ve kontrol suşları 100 ml' lik T3 sıvı besiyerine ekilmiştir. Çalkalamalı etüvde 200 rpm' de 30°C' de 4 gün inkübasyona bırakılmış ve bütün hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 5 000 rpm' de 4°C' de 5 dk santrifüjlenmiş ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelletler 1 M NaCl ile yeniden çözülmüş ve 37°C' de 30 dk 250 rpm' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra hücreler santrifüjlenerek yeniden toplanmış ve içinde 1mM fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) bulunan soğuk distile su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra örnekler

50 mM NaOH- 10 mM EDTA (pH 12) çözeltisi ile yeniden çözölmüş ve 20 dk 37°C' de 250 rpm' de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örnekler 2 000 rpm' de 2 dk santriföjlenmiştir. Üstteki sıvı kısım 1:1 (v/v) oranında yürütme tamponu ile karıştırılmış ve 10 dakika 100°C' de kaynatılmıştır.

Protein örneklerinin SDS-PAGE' elektroforezi %10'luk poliakrilamit jel kullanılarak Bölüm 3.2.5' de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.2.11. *Bacillus thuringiensis* izolatlarının insektisidal etkisinin belirlenmesi

PZR yöntemi ile kristal gen taşıdıkları belirlenen izolatların toksik etkileri Obeidat ark.'larının önerdiği yöntemle göre belirlenmiştir [122].

Spor ve parasporal kristallerin hazırlanması

B. thuringiensis türleri ve kontrol suşları 100 ml' lik T3 sıvı besiyerine ekilmiştir. Sürekli çalkalamalı etüvde 250 rpm' de 30°C' de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 5 000 rpm' de 15 dk santriföjlenmiştir. Pelletler (spor ve parasporal kristaller) 20 ml steril distile suda yıkanmış ve 5 000 rpm' de 5 dk santriföj edilmiştir. Yıkama işlemi aynı şekilde iki kez tekrarlanmıştır. Son olarak pellet 10^7 spor-kristal/ml olacak şekilde steril distile su ile yeniden karışım haline getirilmiş ve biyolojik denemelerde kullanılmak üzere 4°C' de saklanmıştır [122].

Spor ve parasporal kristal karışımların böcekler üzerinde denenmesi

Spor ve parasporal kristal proteinlerin böcekler üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi için *Ephestia kuehniella* ZELLER, 1879 (un güvesi) (Lepidoptera: Pyralidae) ve *Trogoderma granarium* EVERTS, 1898 (kapra böceği, tahıl güvesi) (Coleoptera : Dermestidae)' un üçüncü dönem larvaları kullanılmıştır.

İlk olarak, stok spor ve parasporal kristal karışımlarından 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} oranlarında steril distile su ile seyreltmeler hazırlanmıştır. Larvaların besin kaynağı

olarak yer fıstığı kullanılmıştır. 1 gr yer fıstığı hazırlanan seyreltmelerde 5 dakika bekletilerek ıslatılmıştır. Daha sonra steril petri kaplarına yerleştirilmiş ve kurumaları için bekletilmiştir. Her bir petri kutusuna 10 tane larva yerleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak steril distile su ile ıslatılmış yer fıstıkları kullanılmıştır. Denemeler üçlü tekrar grupları şeklinde yapılmıştır. Petri kapları, orantılı nemi 70 ± 5 ve sıcaklığı $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ’ ye ayarlanmış yetiştirme odalarında yedi gün inkübasyona bırakılmıştır. Ölüm oranları kontrol grubu ile karşılaştırarak 7. günde kaydedilmiştir [122].

3.2.12. *Bacillus thuringiensis* izolatlarının parasporal kristal yapılarının taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi

PZR yöntemiyle kristal genleri taşıdıkları belirlenen izolatların ve kontrol suşlarının parasporal kristal yapıları Feng’ in önerdiği yöntemde değişiklikler yapılarak ve Suludere ve ark.’larının önerdiği yöntemle Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Elektron Mikroskobu Laboratuvarında taramalı elektron mikroskobunda incelenmiştir [123,124].

B. thuringiensis izolatları ve kontrol suşları 100 ml’ lik sıvı T3 besiyerine ekilmiştir. Sürekli çalkalamalı etüvde 250 rpm’ de 30°C ’ de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda örnekler 4 000 rpm’ de 10 dk santrifüjlenmiştir. Pelletler 3 kez distile suda yıkanmıştır. Daha sonra pelletler 1 ml distile su ile çözülmüştür [123]. Örnekler % 2,5’ luk gluteraldehitte 4°C ’ de 12 saat tespit işlemine bırakılmıştır. Daha sonra örnekler distile su ile yıkanmıştır. Yıkanan örnekler distile su ile yeniden çözülmüş ve lamel üzerine bu çözülen örneklerden birer damla damlatılmış ve 5 dk kurutulmuştur. Daha sonra örneklerin etanol serileri ile (%50- %100) suyu alınmıştır. Örnekler amil asetat içine alınmış ve 30 dk ara ile iki kez değiştirme yenilenmiştir [124].

Hazırlanan preparatların kurutma işlemi Polaron CPD7501 kritik nokta kurutucusunda yapılmıştır. Kurutulmuş lameller staplara yapıştırılmıştır. Daha sonra örnekler Polaron SC502 Sputter Coater’ da altınla kaplanmıştır. Hazırlanan örneklerin

mikroskop görüntüleri JEOL JSM 6060 LV taramalı elektron mikroskobu ile 10 ve/veya 15 KV’ de incelenmiş ve fotoğrafları digital ortamda alınmıştır.

3.2.13. İstatistiksel analizler

Genetik Uzaklık Analizleri

Bacillus türlerinden izole edilen toplam hücre proteinlerinin SDS-PAGE ile analizi sonucunda elde edilen protein bantları birbiri ile karşılaştırılarak, bantların varlığı 1 yokluğu 0 kabul edilmiştir. Elde edilen bu veriler POPGEN bilgisayar programında kullanılarak UPGMA metodu ile bireyler arasındaki genetik uzaklıklar belirlenmiştir [125]. İzolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogramlar Treeview bilgisayar programı kullanılarak oluşturulmuştur [126].

Probit Analizi

B. thuringiensis izolatlarından elde edilen spor- parasporal kristal karışımlarının larvalar üzerine yapılan denemeler sonucunda elde edilen veriler SPSS istatistik programında kullanılarak (Version, 11.0) Probit analizi ile LC₅₀ ve LC₉₉ değerleri belirlenmiştir [127]. İzolatlara ait yüzde ölüm oranları da Abbot’s eşitliği ile hesaplanmıştır [128].

Abbot’s eşitliği;

$$\% \text{ Ölüm Oranı} = \left(1 - \frac{D}{K}\right) \times 100 \quad (3.11)$$

D= Deney grubundaki ölen toplam böcek sayısı

K= Kontrol grubundaki toplam böcek sayısı

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. *Bacillus* İzolatlarının İzolasyonu ve Tanımlanması

Ankara'nın farklı yerlerinden alınan toprak örnekleri seyreltilerek uygun besi yerlerine ekildikten sonra farklı koloni yapılarına sahip olanlar rast gele seçilmiştir. Seçilen bu kolonilerin saf kültürleri elde edilerek Gram boyamaları yapılmıştır. Boyama sonunda Gram pozitif çubuk şekilli olan bakteriler API 20 E ve API 50 CHB tanımlama test kitleri ile tanımlanmıştır (Resim 4.1). API test kitlerinden alınan sonuçlar API Software programında değerlendirilerek 52 izolatın tanımlaması yapılmıştır. Tanımlanan bakterilerin isimleri, kod numaraları, API sonuçları ve izole edildikleri toprak örnekleri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Bacillus* izolatlarının API sonuçları ve izole edildikleri toprak örnekleri

Bakteri kodları ve isimleri	API sonuçları (%)	İzole edildiği toprak örneği
<i>B. brevis</i> FÖ1	80,2	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>B. sphaericus</i> FÖ2	93,1	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ3	96,0	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>B. brevis</i> FÖ4	99,1	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>B. sphaericus</i> FÖ5	99,0	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>B. brevis</i> FÖ6	85,1	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ9	96,6	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ10	92,5	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ11	92,5	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>B. megaterium</i> FÖ12	99,7	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>B. subtilis</i> FÖ13	88,3	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>B. cereus</i> 1 FÖ20	96,9	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>B. megaterium</i> FÖ22	98,8	Lodumlu
<i>B. pumilus</i> FÖ23	99,0	Lodumlu
<i>B. cereus</i> 1 FÖ24	82,8	Lodumlu
<i>B. anthracis</i> FÖ25	81,9	Lodumlu
<i>B. circulans</i> 1 FÖ26	99,9	Lodumlu
<i>B. cereus</i> 1 FÖ27	97,7	Lodumlu
<i>B. cereus</i> 1 FÖ28	96,9	Çayyolu
<i>B. sphaericus</i> FÖ29	85,5	Çay olu

Çizelge 4.1. (Devam) *Bacillus* izolatlarının API sonuçları ve izole edildikleri toprak örnekleri

Bakteri kodları ve isimleri	API sonuçları (%)	İzole edildiği toprak örneği
<i>B. laterosporus</i> FÖ30	91,4	Çayyolu
<i>B. licheniformis</i> FÖ31	99,9	Çayyolu
<i>B. laterosporus</i> FÖ32	81,8	G.Ü. Kampusü
<i>B. pumilus</i> FÖ33	99,4	G.Ü. Kampusü
<i>B. cereus</i> 2 FÖ34	94,5	G.Ü. Kampusü
<i>B. firmus</i> FÖ35	82,9	G.Ü. Kampusü
<i>B. cereus</i> 1 FÖ36	82,5	G.Ü. Kampusü
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ37	86,9	G.Ü. Kampusü
<i>B. megaterium</i> FÖ38	97,8	G.Ü. Kampusü
<i>B. licheniformis</i> FÖ39	99,9	G.Ü. Kampusü
<i>B. sphaericus</i> FÖ40	91,7	G.Ü. Kampusü
<i>B. cereus</i> 1 FÖ41	97,0	Beynam Ormanı
<i>B. brevis</i> FÖ42	97,6	Beynam Ormanı
<i>B. circulans</i> 1 FÖ43	80,1	Beynam Ormanı
<i>B. pumilus</i> FÖ44	99,8	Beynam Ormanı
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ45	98,6	Beynam Ormanı
<i>B. cereus</i> 1 FÖ46	91,0	G.Ü. Kampusü
<i>B. brevis</i> FÖ47	97,6	G.Ü. Kampusü
<i>B. laterosporus</i> FÖ48	99,5	G.Ü. Kampusü
<i>B. brevis</i> FÖ49	97,9	G.Ü. Kampusü
<i>B. sphaericus</i> FÖ50	95,2	G.Ü. Kampusü
<i>B. cereus</i> 1 FÖ51	91,0	G.Ü. Kampusü
<i>B. subtilis</i> FÖ52	97,7	G.Ü. Kampusü
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ53	99,9	G.Ü. Kampusü
<i>B. subtilis</i> FÖ54	77,1	ODTÜ kampusü
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ55	96,7	ODTÜ kampusü
<i>B. pumilus</i> FÖ56	99,9	ODTÜ kampusü
<i>B. pumilus</i> FÖ57	99,9	ODTÜ kampusü
<i>B. pumilus</i> FÖ58	99,4	ODTÜ kampusü
<i>B. circulans</i> 1 FÖ59	99,9	ODTÜ kampusü
<i>B. laterosporus</i> FÖ60	98,9	ODTÜ kampusü
<i>B. licheniformis</i> FÖ61	99,9	ODTÜ kampusü



Resim 4.1. *B. cereus* 'un API 20 E ve API 50 CHB test kitleri ile verdiği reaksiyonlar

4.2. *Bacillus thuringiensis* İzolasyonu ve Tanımlanması

Bacillus thuringiensis'lerin izolasyonu sodyum asetat seçici besi yeri ve T3 sporlanma besi yeri kullanılarak Bölüm 3.2.2' de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Faz-kontrast mikroskobu ile yapılan inceleme sonucunda parasporal kristal yapılar taşıyan bakterilerin seçimi yapılmıştır.

Parasporal kristal taşıyan bakterilerin tanımlanmaları için, 16S rRNA bölgeleri PZR ile çoğaltılmış ve çoğaltılan bölgelerin dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizlerinin gen bankası verileri ile eşleştirilmeleri sonucu 3 izolat *Bacillus thuringiensis*, 2 izolat *Bacillus megaterium* ve 1 izolat *Bacillus cereus* olarak isimlendirilmiştir. 2 izolatın ise *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiş ancak tür seviyesinde isimlendirilmesi yapılamamıştır. (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanan izolatlar ve izole edildikleri toprak örnekleri

Bakteri kodları ve isimleri	İzole edildiği toprak örneği
<i>Bacillus thuringiensis</i> FÖ7	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>Bacillus thuringiensis</i> FÖ8	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>Bacillus thuringiensis</i> FÖ21	Lodumlu
<i>Bacillus megaterium</i> FÖ18	Lodumlu
<i>Bacillus megaterium</i> FÖ14	Lodumlu
<i>Bacillus cereus</i> FÖ15	A.Ü Ziraat Fak. Deneme Tarlası
<i>Bacillus sp.</i> FÖ16	Beyman Ormanı
<i>Bacillus sp.</i> FÖ19	Beynam Ormanı

16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları

Faz kontrast mikroskobu ile yapılan inceleme sonucunda parasporal kristal taşıdığı belirlenen 12 izolatın kromozomal DNA'sı elde edilmiştir. Elde edilen kromozomal DNA'lar Çizelge 3.2' de özellikleri verilen *Bacillus* cinsine özgün primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile yürütülmüş ve yaklaşık olarak 1554 bp uzunluğunda ürünler elde edilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri saflaştırılarak dizi analizleri yapılmıştır.

Belirlenen nükleotid dizileri Gen Bankası'ndaki *Bacillus* cinsine ait bakteri suşlarının nükleotid dizileri ile karşılaştırılarak eşleştirmeleri (alignment) yapılmış ve benzerlik oranları belirlenmiştir. Homoloji analizlerine (dizi eşleştirme sonuçları) göre FÖ21, FÖ7 ve FÖ8 nolu üç izolatın *B. thuringiensis* olduğu kesin olarak anlaşılmıştır.

FÖ18 ve FÖ14 nolu izolatların *Bacillus megaterium* ve FÖ15 nolu izolatında *Bacillus cereus* olduğu belirlenmiştir. FÖ16 ve FÖ19 nolu izolatların ise *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir.

FÖ21, FÖ7 ve FÖ8 izolatlarına ait 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5’ de gösterildiği gibidir.

Eşleştirme sonucuna göre FÖ21 izolatının *Bacillus thuringiensis* 2000031508 (AY138286.1) suşu ile arasında üç nükleoit bakımından farklılık olduğu ve %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. FÖ21 izolatının *Bacillus thuringiensis* 2000031508 (AY138286.1) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzolat: 1	ctccccaggcggagtgcttaatgcgtgaacttcagcactaaagggcggaaccctctaac	60
Ref: 900	ctccccaggcggagtgcttaatgcgttaacttcagcactaaagggcggaaccctctaac	841
İzolat: 61	acttagcactcatcgctttacggcgtggactaccagggtatctaatacctgtttgctcccca	120
Ref: 840	acttagcactcatcgctttacggcgtggactaccagggtatctaatacctgtttgctcccca	781
İzolat:121	cgctttcgcgcctcagtggtcagttacagaccagaaagtcgccttcgccactgggtgttcct	180
Ref: 780	cgctttcgcgcctcagtggtcagttacagaccagaaagtcgccttcgccactgggtgttcct	721
İzolat:181	ccatatctctacgcatttcaccgctacacatggaattccactttcctcttctgcactcaa	240
Ref: 720	ccatatctctacgcatttcaccgctacacatggaattccactttcctcttctgcactcaa	661
İzolat:241	gtctcccagtttccaatgaccctccacggttgagccgtgggctttcacatcagacttaag	300
Ref: 660	gtctcccagtttccaatgaccctccacggttgagccgtgggctttcacatcagacttaag	601
İzolat:301	aaaccacctgcgcgcgctttacgccaataattccggataacgcttgccacctacgtatt	360
Ref: 600	aaaccacctgcgcgcgctttacgccaataattccggataacgcttgccacctacgtatt	541
İzolat:361	accgcggtgctggcacgtagttagccgtggctttctggtaggtaccgtcaaggtgcca	420
Ref: 540	accgcggtgctggcacgtagttagccgtggctttctggtaggtaccgtcaaggtgcca	481
İzolat:421	gcttattcaactagcacttggttcttcctaacaacagagttttacgacccgaaagccttc	480
Ref: 480	gcttattcaactagcacttggttcttcctaacaacagagttttacgacccgaaagccttc	421
İzolat:481	atcactcacgcggttgctccgtcagactttcgtacatagcggaagat	529
Ref: 420	atcactcacgcggttgctccgtcagactttcgtccattgcggaagat	372

Ref: Referans suş

FÖ7 izolatının *Bacillus thuringiensis* 2000032755 (AY138282.1) suşu ile arasında bir nükleotit bakımından farklılık olduğu ve %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. FÖ7 izolatının *Bacillus thuringiensis* 2000032755 (AY138282.1) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

Izolat:13	tggacga	agtctgacggagcaacgccgctgagtgatgaaggctttcgggtcgtaaaac	72
Ref : 383	tggacga	aagtctgacggagcaacgccgctgagtgatgaaggctttcgggtcgtaaaac	442
Izolat:73	tctgttg	tagggaagaacaagtgctagttgaataagctggcaccttgacggtacctaac	132
Ref : 443	tctgttg	tagggaagaacaagtgctagttgaataagctggcaccttgacggtacctaac	502
Izolat:133	cagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcggt	aatacgtaggtggcaagcgtta	192
Ref : 503	cagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcggt	aatacgtaggtggcaagcgtta	562
Izolat:193	tccggaattattgggcgtaaagcgcgcgcaggtgg	tttcttaagtctgatgtgaaagccc	252
Ref : 563	tccggaattattgggcgtaaagcgcgcgcaggtgg	tttcttaagtctgatgtgaaagccc	622
Izolat:253	acggctcaaccgtggaggggtcattggaaactgggagactt	gagtgacagaagaggaaagt	312
Ref : 623	acggctcaaccgtggaggggtcattggaaactgggagactt	gagtgacagaagaggaaagt	682
Izolat:313	gaattccatgtgtagcggtgaaatgcgtagagatatggaggaacaccagtg	gcgaaggcg	372
Ref : 683	gaattccatgtgtagcggtgaaatgcgtagagatatggaggaacaccagtg	gcgaaggcg	742
Izolat:373	actttctggtctgt	aactgacactgaggcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagat	432
Ref : 743	actttctggtctgt	aactgacactgaggcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagat	802
Izolat:433	accctggtagtccacgccgtaaacgatgagtgctaagtgttagagggt	ttccgcccttta	492
Ref : 803	accctggtagtccacgccgtaaacgatgagtgctaagtgttagagggt	ttccgcccttta	862
Izolat:493	gtgctgaa		500
Ref : 863	gtgctgaa		870

FÖ8 izolatının da *Bacillus thuringiensis* 2000031485 (AY138289.1) suşu ile arasında bir nükleotit bakımından farklılık olduğu ve %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. FÖ8 izolatının *Bacillus thuringiensis* 2000031485 (AY138289.1) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzolat:13	tggacga g agtctgacggagcaacgccgcgtgagtgatgaaggctttcgggtcgtaaaac	72
Ref : 383	tggacga a agtctgacggagcaacgccgcgtgagtgatgaaggctttcgggtcgtaaaac	442
İzolat:73	tctgttgtagggaagaacaagtgc tagttgaataagctggcaccttgacggtacctaac	132
Ref : 443	tctgttgtagggaagaacaagtgc tagttgaataagctggcaccttgacggtacctaac	502
İzolat:133	cagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcggttaatacgtaggtggcaagcg	192
Ref : 503	cagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcggttaatacgtaggtggcaagcg	562
İzolat:193	tccggaattattgggcgtaaagcgcgcgcaggtggtttcttaagtctgatgtgaaagccc	252
Ref : 563	tccggaattattgggcgtaaagcgcgcgcaggtggtttcttaagtctgatgtgaaagccc	622
İzolat:253	acggctcaaccgtggagggtcattggaaactgggagacttgagtgcagaagaggaaagt	312
Ref : 623	acggctcaaccgtggagggtcattggaaactgggagacttgagtgcagaagaggaaagt	682
İzolat:313	gaattccatgtgtagcggtgaaatgcgtagagatatggaggaacaccagtggcgaaggcg	372
Ref : 683	gaattccatgtgtagcggtgaaatgcgtagagatatggaggaacaccagtggcgaaggcg	742
İzolat:373	actttctggtctgtaactgacactgaggcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagat	432
Ref : 743	actttctggtctgtaactgacactgaggcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagat	802
İzolat:433	accctggtagtcacgccgtaaacgatgagtgctaagtgttagagggtttccgcccttta	492
Ref : 803	accctggtagtcacgccgtaaacgatgagtgctaagtgttagagggtttccgcccttta	862
İzolat:493	gtgctgaagttaacgcattaagcactccgcctggggagtagcgccgcaaggctgaaactc	552
Ref : 863	gtgctgaagttaacgcattaagcactccgcctggggagtagcgccgcaaggctgaaactc	922
İzolat:553	aaa	555
Ref : 923	aaa	925

FÖ16 ve FÖ19 izolatlarının 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7’de verilmiştir. FÖ16 izolatının *Bacillaceae* familyasından kültüre edilmemiş bakteri klonu 8F345r (AY387385.1) ile arasında 14 nükleotit bakımından farklılık olduğu ve %94 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

FÖ19 izolatının ise *Bacillus* sp. H-09 (AY461750.1) suşu ile %100 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. FÖ16 izolatının kültüre edilmemiş bakteri klonu 8F345r (AY387385.1) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzolat:9	tggacga ca gtctgacggagca ta cgcgcgctgagtgatgaat tgct tttcg cg gtc ataa	68
Ref : 325	tggacga aa gtctgacggagca-acgcgcgctgagtgatgaag ggc tttcg-ggtc g taa	382
İzolat:69	aactctgtt cat gggaagaacaagtgc ta gttc ga ataagctggcaccttggacggt	128
Ref : 383	aactctgtt ta --gggaagaacaagtgc ta gttc ga ataagctggcaccttggacggt	439
İzolat:129	acctaacca cgat aagccacggctaactacgtgccag g cagccgcggaatac ga agt g	188
Ref : 440	acctaacca-ga-aagccacggctaactacgtgccag-cagccgcggaatac ga agt g	496
İzolat:189	gcaagcgt a tatccggaattat agg gcgtaagcgcgcgaggtggt at cttaagtct-	247
Ref : 497	gcaagcgt-tatccggaattat agg gcgtaagcgcgcgaggtggt-tcttaagtctt	554
İzolat:248	gatgtgaaagcccacggctcaaccgtggagggtcatt a ggaaactgggagacttgagtgc	307
Ref : 555	gatgtgaaagcccacggctcaaccgtggagggtcatt-ggaaactgggagacttgagtgc	613
İzolat:308	agaag t aggaaagtgaattccatgtgta cc ggtgaaatgcgtag t agatatggaggaac	367
Ref : 614	agaag-aggaaagtgaattccatgtgta g cggtgaaatgcgtag-agatatggaggaac	671
İzolat:368	accagtggcgaa c gcgactttctggtctgtaactgacactgaggcgcgaaagcgtgggga	427
Ref : 672	accagtggcgaa g gcgactttctggtctgtaactgacactgaggcgcgaaagcgtgggga	731
İzolat:428	gcaaacaggattagataccctggtagt g cacgccgt-aacgatgagtgctaagtgttaga	486
Ref : 732	gcaaacaggattagataccctggtagt c cacgccgt aa acgatgagtgctaagtgttaga	791
İzolat:487	gggtt ct cgccctttagtgtgaagttaacgcattaagcactccgcctggggagtag	543
Ref : 792	gggtt ct cgccctttagtgtgaagttaacgcattaagcactccgcctggggagtag	848

Çizelge 4.7. FÖ19 izolatının *Bacillus* sp. H-09 (AY461750.1) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzolat: 10	cgccgtactccccaggcggagtgcttaatgcgttaacttcagcactaaagggcggaacc	69
Ref: :904	cgccgtactccccaggcggagtgcttaatgcgttaacttcagcactaaagggcggaacc	845
İzolat: 70	ctctaacacttagcactcatcgtttacggcgtggactaccagggatatctaatacctgtttg	129
Ref: 844	ctctaacacttagcactcatcgtttacggcgtggactaccagggatatctaatacctgtttg	785
İzolat:130	ctccccacgctttcgcgcctcagtgctcagttacagaccagaaagtcgccttcgccactgg	189
Ref: 784	ctccccacgctttcgcgcctcagtgctcagttacagaccagaaagtcgccttcgccactgg	725
İzolat:190	tgttcctccatatctctacgcatttcaccgctacacatggaattccactttcctcttctg	249
Ref: 724	tgttcctccatatctctacgcatttcaccgctacacatggaattccactttcctcttctg	665
İzolat:250	cactcaagtctcccagtttccaatgaccctccacggttgagccgtgggctttcacatcag	309
Ref: 664	cactcaagtctcccagtttccaatgaccctccacggttgagccgtgggctttcacatcag	605
İzolat:310	acttaagaaaccacctgcgcgcgctttacgcccaataattccggataacgcttgccacct	369
Ref: 604	acttaagaaaccacctgcgcgcgctttacgcccaataattccggataacgcttgccacct	545
İzolat:370	acgtattaccgcggtgctggcacgtagttagccgtggctttctggttaggtaccgtcaa	429
Ref: 544	acgtattaccgcggtgctggcacgtagttagccgtggctttctggttaggtaccgtcaa	485
İzolat:430	ggtgccagcttattcaactagcacttggtcttcctaacaacagagttttacgacccgaa	489
Ref: 484	ggtgccagcttattcaactagcacttggtcttcctaacaacagagttttacgacccgaa	425
İzolat:490	agccttcactcactcacgcggcgttgctccgtcagac	525
Ref: 424	agccttcactcactcacgcggcgttgctccgtcagac	389

FÖ18 ve FÖ14 izolatlarının 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9’da verilmiştir. FÖ18 nolu izolatın *Bacillus megaterium* SAFN-040 (AY167803.1) suşu ile arasında bir nükleotit bakımından farklılık olduğu ve %99 oranında benzer olduğu belirlenmiştir. FÖ14 nolu izolatın da *Bacillus megaterium* SAFN-040 suşu (AY167803.1) ile %100 oranında benzer olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. FÖ18 izolatının *Bacillus megaterium* SAFN-040 (AY167803.1) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları.

İzolat: 24	cccagcgaggagtgccttaatgcgtagctgcagcactaaagggcggaaccctctaact	83
Ref: 798	cccagcgaggagtgccttaatgcgtagctgcagcactaaagggcggaaccctctaact	739
İzolat: 84	tagcactcatcgctttacggcgtggactaccagggtatctaatacctgtttgctccccacgc	143
Ref: 738	tagcactcatcgctttacggcgtggactaccagggtatctaatacctgtttgctccccacgc	679
İzolat:144	tttcgcgcctcagcgctcagttacagacaaaaagccgccttcgccactggtgttcctcca	203
Ref: 678	tttcgcgcctcagcgctcagttacagacaaaaagccgccttcgccactggtgttcctcca	619
İzolat:204	catctctacgcatttcaccgctacacgtggaattccgcttttctcttctgcactcaagtt	263
Ref: 618	catctctacgcatttcaccgctacacgtggaattccgcttttctcttctgcactcaagtt	559
İzolat:264	ccccagtttccaatgaccctccacggttgagccgtgggctttcacatcagacttaagaaa	323
Ref: 558	ccccagtttccaatgaccctccacggttgagccgtgggctttcacatcagacttaagaaa	499
İzolat:324	ccgcctgcgcgcgctttacgccaataattccggataacgcttgccacctacgtattacc	383
Ref: 498	ccgcctgcgcgcgctttacgccaataattccggataacgcttgccacctacgtattacc	439
İzolat:384	gcggctgctggcacgtagttagccgtggctttctggttaggtaccgtcaaggtacgagca	443
Ref: 438	gcggctgctggcacgtagttagccgtggctttctggttaggtaccgtcaaggtacgagca	379
İzolat:444	gttactctcgtacttgttcttcctaacaacagagttttacgaccgaaagccttcatca	503
Ref: 378	gttactctcgtacttgttcttcctaacaacagagttttacgaccgaaagccttcatca	319
İzolat:504	ctcacgcggcggttgctccgtcagactttcgtccatagcggaagattccctact	556
Ref: 318	ctcacgcggcggttgctccgtcagactttcgtccatagcggaagattccctact	266

Çizelge 4.9. FÖ14 izolatının *Bacillus megaterium* SAFN-040 (AY167803.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzolat: 11	tggacgaaagtctgacggagcaacgccgctgagtgatgaaggctttcgggtcgtaaaac	70
Ref: 285	tggacgaaagtctgacggagcaacgccgctgagtgatgaaggctttcgggtcgtaaaac	344
İzolat: 71	tctgttgtaggaagaacaagtacgagagtaactgctcgtagcttgacggtacctaacc	130
Ref: 345	tctgttgtaggaagaacaagtacgagagtaactgctcgtagcttgacggtacctaacc	404
İzolat:131	agaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcgtaatacgtaggtggcaagcggtat	190
Ref: 405	agaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcgtaatacgtaggtggcaagcggtat	464
İzolat:191	ccggaattattgggcgtaaaagcgcgcgaggcggtttcttaagtctgatgtgaaagccca	250
Ref: 465	ccggaattattgggcgtaaaagcgcgcgaggcggtttcttaagtctgatgtgaaagccca	524
İzolat:251	cggctcaaccgtggagggtcattggaaactggggaacttgagtgcagaagagaaaagcgg	310
Ref: 525	cggctcaaccgtggagggtcattggaaactggggaacttgagtgcagaagagaaaagcgg	584
İzolat:311	aattccacgtgtagcggtgaaatgcgtagagatgtggaggaacaccagtggcgaaggcgg	370
Ref: 585	aattccacgtgtagcggtgaaatgcgtagagatgtggaggaacaccagtggcgaaggcgg	644
İzolat:371	ctttttggtctgtaactgacgctgaggcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagata	430
Ref: 645	ctttttggtctgtaactgacgctgaggcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagata	704
İzolat:431	ccctggtagtagccacgccgtaaacgatgagtgctaagtgttagagggtttccgcctttag	490
Ref: 705	ccctggtagtagccacgccgtaaacgatgagtgctaagtgttagagggtttccgcctttag	764
İzolat:491	tgctgcagctaacgcattaagcactccg	518
Ref: 765	tgctgcagctaacgcattaagcactccg	792

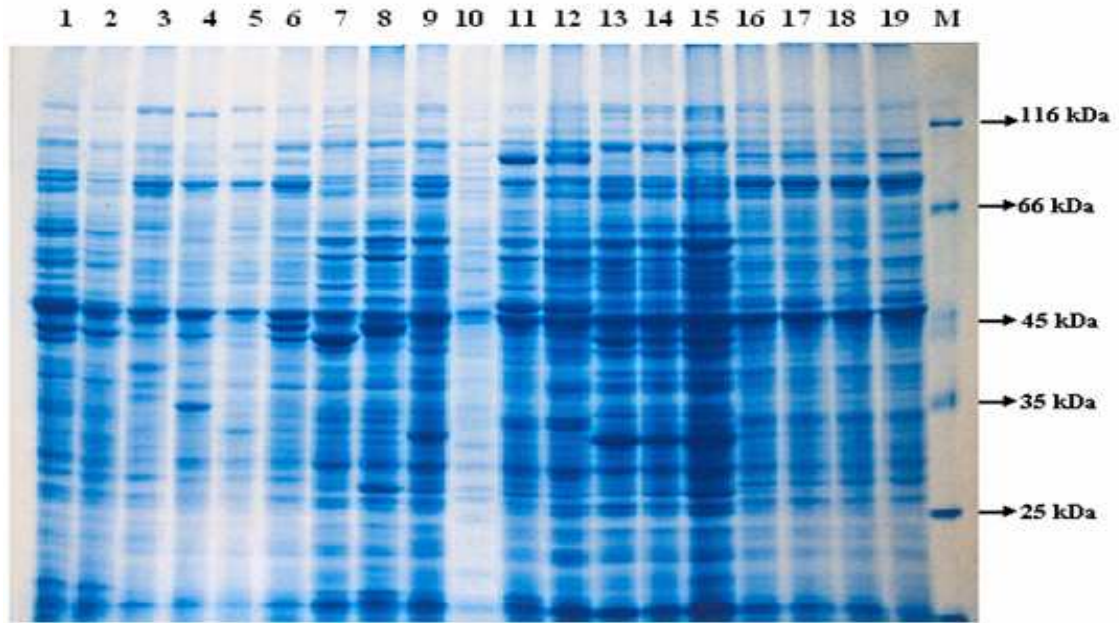
FÖ15 izolatının 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları Çizelge 4.10’da verilmiştir. FÖ15 izolatının *Bacillus cereus* 2000031498 (AY138274.1) suşu ile arasında 4 nükleotit bakımından farklılık olduğu ve % 98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. FÖ15 izolatının *Bacillus cereus* 2000031498 (AY138274.1) suşu ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

İzolat:192	tccccacg	a	ctttcgcg	acctcagtg	tcagta	acagaccagaaagtcgccttcgccactg	251
Ref: 786	tccccacg	-	ctttcgcg	-	cctcagtg	tcagtt	acagaccagaaagtcgccttcgccactg 729
İzolat:252	gtgttcctccat	atctctacgc	atttcaccg	ctacacatggaattccactttcctcttct	311		
Ref: 728	gtgttcctccat	atctctacgc	atttcaccg	ctacacatggaattccactttcctcttct	669		
İzolat:312	gcactcaagt	tctcccag	tttccaatgaccctccacggttgagccgtgggctttcacatca	371			
Ref: 668	gcactcaagt	tctcccag	tttccaatgaccctccacggttgagccgtgggctttcacatca	609			
İzolat:372	gacttaagaa	aaccac	ctgcgcgcgctttacgccaataattccggataacgcttgccacc	431			
Ref: 608	gacttaagaa	aaccac	ctgcgcgcgctttacgccaataattccggataacgcttgccacc	549			
İzolat:432	tacgtattac	cgcggtg	ctggcacgtagttagccgtggctttctggttaggtaccgtca	491			
Ref: 548	tacgtattac	cgcggtg	ctggcacgtagttagccgtggctttctggttaggtaccgtca	489			
İzolat:492	aggtgccag	cttattca	actagcaccttggttctt	525			
Ref: 488	aggtgccag	cttattca	actagcac	-	ttggttctt	456	

4.3. *Bacillus* İzolatlarının Toplam Hücre Protein Profil Analizleri

Tanımlanan *Bacillus* izolatları ve kontrol *B. thuringiensis* suşlarının toplam hücre proteinleri izole edilmiş ve SDS-PAGE’de yürütülmüştür. SDS-PAGE ile elde edilen jeller tespit edilip boyanmış ve fotoğrafları çekilmiştir. İzolatların toplam hücre protein profilleri Resim 4.2, Resim 4.3, Resim 4.4 ve Resim 4.5’ de gösterilmiştir.



Resim 4.2. *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve kontrol *B. thuringiensis* suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri

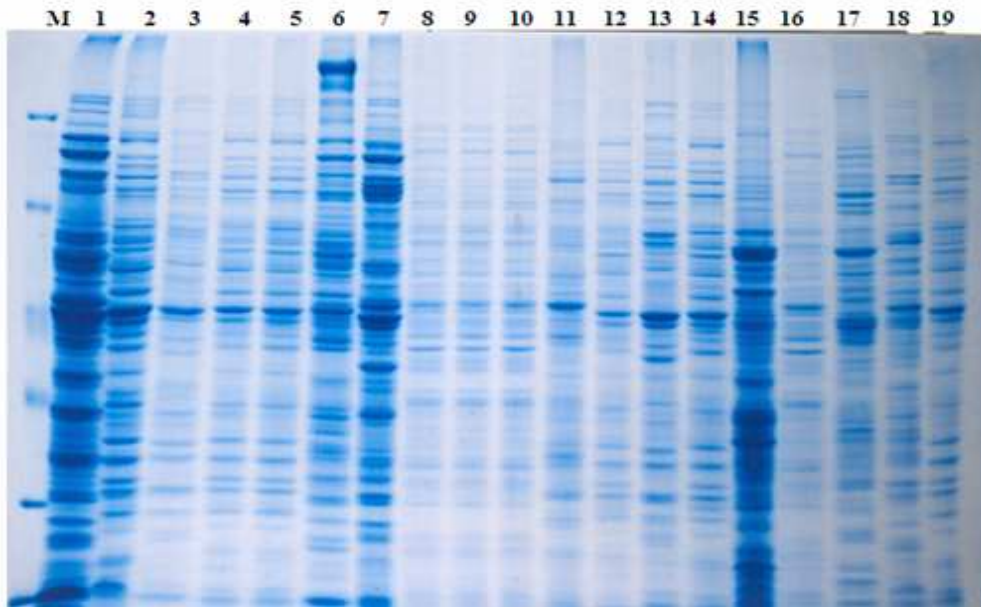
1. *B. t.* RSSK 380 2. *B. t.* Mu4 3. *B. t.* subsp. *kurstaki* 4. *B. thuringiensis* 916 5. *B. t.* subsp. *kurstaki* HD-1 6. *B. t.* subsp. *kurstaki* HD-73 7. *B. t.* subsp. *tolworthi* HD-125 8. *B. t.* subsp. *aizawai* HD-137 9. *B. thuringiensis* FÖ21 10. *B. cereus* I FÖ24 11. *B. thuringiensis* FÖ7 12. *B. thuringiensis* FÖ8 13. *B. thuringiensis* FÖ16 14. *B. thuringiensis* FÖ19 15. *B. cereus* I FÖ15 16. *B. cereus* I FÖ27 17. *B. cereus* I FÖ28 18. *B. cereus* I FÖ36 19. FÖ41 *B. cereus* I M. Protein Markır (116-β-galaktosidaz, 66-serum albumin, 45- ovalbumin, 35- laktat dehidrogenaz, 25- restriksiyon endonükleaz *Bsp*98)

B. cereus, *B. thuringiensis* ve kontrol *B. thuringiensis* suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri Resim 4.2’de gösterilmiştir. *B. thuringiensis* izolatlarının ve kontrol suşlarının elektroforetik yönden birbirine benzer oldukları tespit edilmiştir. Bütün izolatların yaklaşık olarak 73 ve 46 kDa ağırlığında ortak iki protein bandına sahip oldukları belirlenmiştir.

B. thuringiensis FÖ7 ve *B. thuringiensis* FÖ8 izolatlarının protein profili yönünden birbiri aynı olduğu 93, 46 ve 44 kDa ağırlığında ortak protein bantlarına sahip oldukları belirlenmiştir. *B. thuringiensis* FÖ21, *Bacillus* sp FÖ16 ve *Bacillus* sp FÖ19 nolu izolatların da protein profili yönünden aynı oldukları görülmüştür. İzolatların kontrol suşları ile karşılaştırılmaları sonucunda *B. thuringiensis* FÖ21,

Bacillus sp FÖ16 ve *Bacillus sp* FÖ19 suşlarının *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 suşu ile protein profili yönünden aynı olduğu ve 73, 46, 44, 42, 40 ve 31 kDa ağırlığındaki protein bantlarına sahip oldukları belirlenmiştir.

B. cereus izolatlarının da protein profili yönünden birbirinin aynı olduğu 73 kDa ve 46 kDa ağırlığında ortak protein bandını taşıdıkları belirlenmiştir. *B. cereus* olarak tanımlanan FÖ15 izolatının da protein profili yönünden *B. thuringiensis* FÖ21, *Bacillus sp* FÖ16 ve *Bacillus sp* FÖ19 izolatları ile aynı olduğu belirlenmiştir.



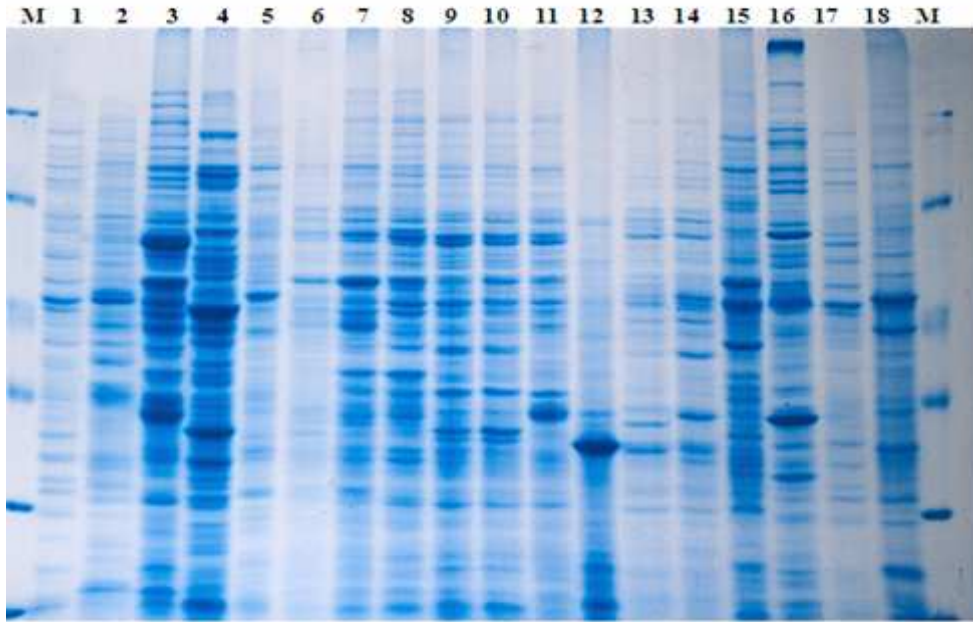
Resim 4.3. *B. brevis*, *B. stearothermophilus* ve *B. sphaericus* türlerinin SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri

M. Markır 1. *B. brevis* FÖ1 2. *B. brevis* FÖ4 3. *B. brevis* FÖ6 4. *B. brevis* FÖ42 5. *B. brevis* FÖ47 6. *B. brevis* FÖ49 7. *B. stearothermophilus* FÖ3 8. *B. stearothermophilus* FÖ9 9. *B. stearothermophilus* FÖ10 10. *B. stearothermophilus* FÖ11 11. *B. stearothermophilus* FÖ37 12. *B. stearothermophilus* FÖ45 13. *B. stearothermophilus* FÖ53 14. *B. stearothermophilus* FÖ55 15. *B. sphaericus* FÖ2 16. *B. sphaericus* FÖ5 17. *B. sphaericus* FÖ29 18. *B. sphaericus* FÖ40 19. *B. sphaericus* FÖ50

B. brevis, *B. stearothermophilus* ve *B. sphaericus* izolatlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri Resim 4.3’de gösterilmiştir.

B. brevis izolatları protein profilleri yönünden karşılaştırıldığında 45 kDa ağırlığında genel bir protein bandına sahip oldukları görülmüştür. *B. brevis* FÖ4 ve FÖ49 izolatlarının protein profili yönünden birbirine benzer oldukları, *B. brevis* FÖ6, FÖ42 ve FÖ47 izolatlarının da protein profilleri yönünden aynı oldukları belirlenmiştir. *B. brevis* FÖ1 izolatının protein profili yönünden diğer *B. brevis* izolatlarından farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

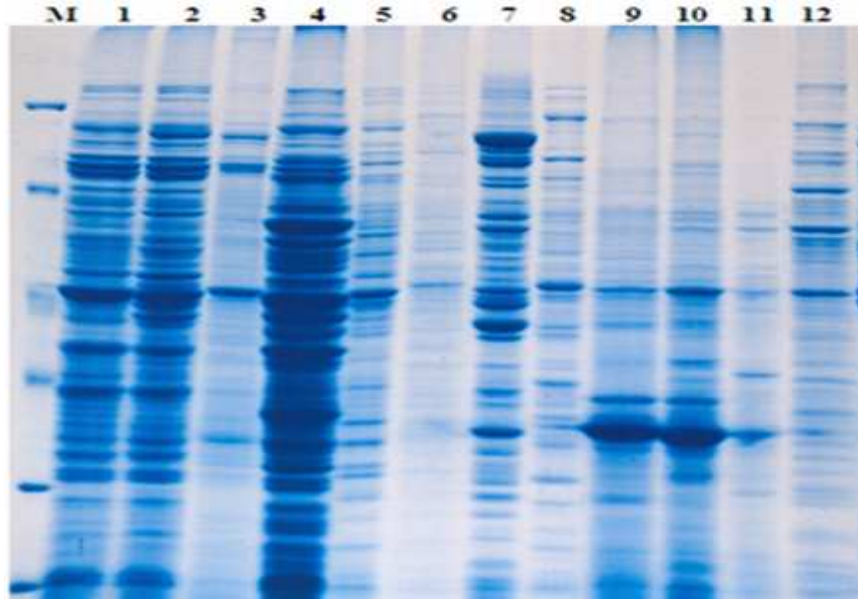
B. stearothermophilus izolatlarında protein profili yönünden birbirine benzerlik gösterdikleri ve 46 kDa ve 40 kDa ağırlığında ortak bir protein bandı içerdikleri tespit edilmiştir. *B. sphaericus* izolatlarının ortak bantlar içeriyor olmalarına rağmen, elektroforetik yönden heterojen bir yapı gösterdikleri belirlenmiştir.



Resim 4.4. *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* ve *B. laterosporus* türlerinin SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri

M. Markır 1. *B. megaterium* FÖ12 2. *B. megaterium* FÖ14 3. *B. megaterium* FÖ18 4. *B. megaterium* FÖ22 5. *B. megaterium* FÖ38 6. *B. pumilus* FÖ23 7. *B. pumilus* FÖ33 8. *B. pumilus* FÖ44 9. *B. pumilus* FÖ56 10. *B. pumilus* FÖ57 11. *B. pumilus* FÖ58 12. *B. subtilis* FÖ13 13. *B. subtilis* FÖ52 14. *B. subtilis* FÖ54 15. *B. laterosporus* FÖ30 16. *B. laterosporus* FÖ48 17. *B. laterosporus* FÖ60 18. *B. laterosporus* FÖ32

B. megaterium, *B. pumilus*, *B. subtilis* ve *B. laterosporus* türlerinin SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri Resim 4.4’ de gösterilmiştir. *B. megaterium* izolatlarının protein bantları bakımından benzerlik gösterdikleri, ancak bazı bantlar yönünden birbirinden ayrıldıkları belirlenmiştir. *B. megaterium* izolatlarının yaklaşık olarak 47 kDa ağırlığında ortak bir protein bandı içerdikleri belirlenmiştir. *B. pumilus* izolatlarının protein profili yönünden oldukça benzer oldukları ancak bazı bantlar bakımından aralarında farklılık olduğu görülmüştür. *B. pumilus* izolatlarının 63, 60, 50, 45, 37 ve 35 kDa ağırlığında ortak protein bantları taşıdıkları belirlenmiştir. *B. subtilis* FÖ52 ve FÖ54 izolatlarının 60, 45, 40 ve 30 kDa ağırlığında ortak protein bandı taşıdıkları belirlenmiştir. Ancak FÖ13 numaralı *B. subtilis* izolatının diğer iki izolattan protein profili yönünden oldukça farklı olduğu tespit edilmiştir. *B. laterosporus* izolatlarının ise protein profilleri yönünden karşılaştırıldığında ortak bantlar içeriyor olmalarına rağmen, elektroforetik yönden heterojen bir yapı gösterdikleri belirlenmiştir.



Resim 4.5. *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. circulans* ve *B. licheniformis* türlerinin SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri

M. Protein Marker 1. *B. cereus* FÖ46 2. *B. cereus* FÖ51 3. *B. cereus* FÖ34 4. *B. cereus* FÖ20 5. *B. anthracis* FÖ25 6. *B. circulans* FÖ26 7. *B. circulans* FÖ43 8. *B. circulans* FÖ59 9. *B. licheniformis* FÖ31 10. *B. licheniformis* FÖ39 11. *B. licheniformis* FÖ61 12. *B. firmus* FÖ35

B. anthracis, *B. circulans* ve *B. licheniformis*, türlerinin SDS- PAGE ile elde edilen protein profilleri Resim 4.5’de gösterilmiştir. *B. circulans* izolatlarının protein profili yönünden heterojenite gösterdikleri belirlenmiştir. *B. licheniformis* izolatlarının 45 ve 30 kDa ağırlığında iki protein bandı bakımından benzer oldukları belirlenmiştir. *B. firmus* izolatının ise 45 ve 30 kDa ağırlığında iki bant ile *B. licheniformis* izolatlarına benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Türler arası ve tür içi genetik uzaklıkları belirlemek için, her bir izolatın protein bandı diğer izolatlarla karşılaştırılarak bantların varlığı 1 ile yokluğu 0 ile gösterilmiştir. Bu değerler kullanılarak suşlar arasındaki genetik uzaklıklar POPGEN bilgisayar programında UPGMA metodu ile hesaplanmış (Çizelge 4.11) ve Treeview bilgisayar programı kullanılarak izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogramlar oluşturulmuştur (Şekil 4.1). POPGEN istatistik programına göre türler arasındaki genetik uzaklıkların % 0- % 95 arasında olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen dendrogram sonuçlarına göre suşlar iki ana grup altında toplanmıştır. Birinci ana grupta *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* türleri ve *B. thuringiensis* kontrol suşları yer almaktadır. Birinci ana gruptaki bakteri türleri arasındaki genetik uzaklık %1 ile %79 değerleri arasında değişmektedir. *B. cereus* ve *B. anthracis* izolatlarının birbirine olan genetik uzaklıklarının %27 ile %76 arasında değiştiği belirlenmiştir. *B. thuringiensis* izolatlarının *B. cereus* izolatları ile olan genetik uzaklıkları %1 ile %60, *B. anthracis* izolatı ile olan genetik uzaklıkları %37 ile %56 arasında değiştiği belirlenmiştir.

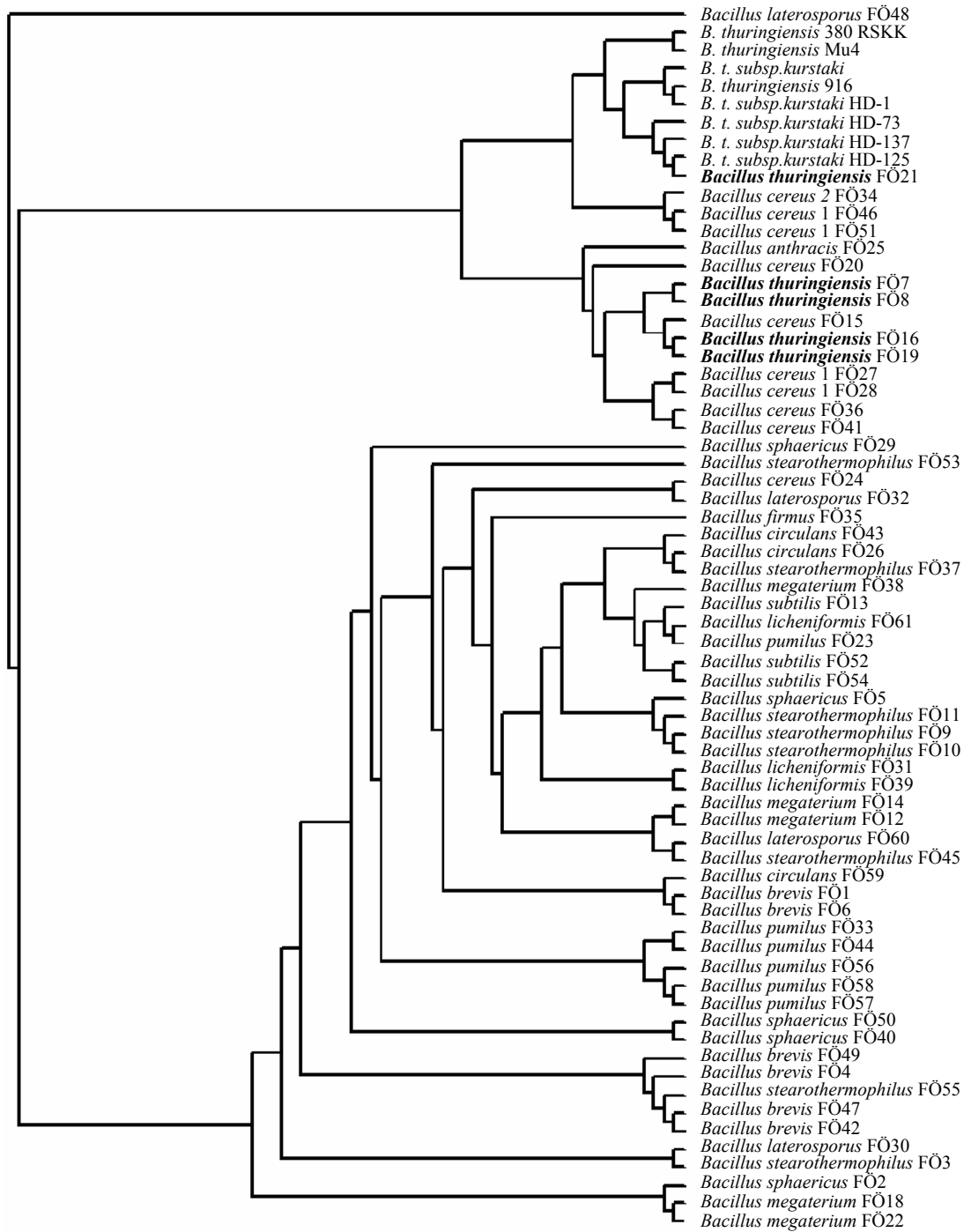
B. thuringiensis izolatları arasındaki genetik uzaklığın ise %0 ile %76 arasında değiştiği belirlenmiştir. *B. thuringiensis* FÖ21 izolatının kontrol suşlarından *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1’e %35, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73’e %16, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-125’e %8, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-137’ ye %13, *B. thuringiensis* 916’ ya %33, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* suşuna %31, *B. thuringiensis* RSKK 380 ve Mu4 suşlarına sırasıyla %49 ve %40 oranında uzak olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. *Bacillus* türlerinin toplam hücre protein sonuçlarına göre hesaplanmış genetik uzaklıkları

pop ID	
<i>B.thuringiensis</i> RSKK 380	**
<i>B.thuringiensis</i> Mu4	17 **
<i>B.t. ssp. kurstaki</i>	29 29 **
<i>B.thuringiensis</i> 916	47 47 29 **
<i>B.t. subsp. kurstaki</i> HD-1	45 40 24 19 **
<i>B.t. subsp. kurstaki</i> HD-73	51 42 26 31 26 **
<i>B.t. subsp. kurstaki</i> HD-125	45 45 31 29 35 19 **
<i>B.t. subsp. kurstaki</i> HD-137	47 42 45 42 45 17 16 **
<i>B.thuringiensis</i> FÖ21	49 40 31 33 35 16 08 13 **
<i>B.cereus</i> FÖ24	45 33 38 45 24 40 51 53 55 **
<i>B.thuringiensis</i> FÖ7	58 53 56 48 47 58 71 63 65 38 **
<i>B.thuringiensis</i> FÖ8	53 53 56 53 51 63 76 63 71 42 05 **
<i>B.thuringiensis</i> FÖ16	56 47 63 76 58 56 73 56 58 45 33 26 **
<i>B.thuringiensis</i> FÖ19	56 47 63 76 58 56 73 56 58 45 33 26 00 **
<i>B.cereus</i> FÖ15	53 49 65 79 60 58 76 58 60 47 31 24 01 01 **
<i>B.cereus</i> 1 FÖ27	37 40 38 45 35 33 51 45 42 38 42 38 29 29 27 **
<i>B.cereus</i> 1 FÖ28	40 45 38 45 35 37 51 49 42 38 38 35 33 33 31 03 **
<i>B.cereus</i> 1 FÖ36	37 40 38 40 31 33 47 45 38 35 38 38 33 33 31 03 03 **
<i>B.cereus</i> FÖ41	35 38 37 42 33 31 45 42 37 37 40 40 33 33 33 04 04 01 **
<i>B.cereus</i> 1 FÖ46	40 45 31 53 38 45 47 49 42 47 42 42 53 53 51 38 38 38 37 **
<i>B.cereus</i> 1 FÖ51	47 42 45 71 49 56 58 51 49 49 49 53 51 51 53 45 45 49 51 16 **
<i>B.cereus</i> 2 FÖ34	63 49 47 33 27 40 51 53 56 31 47 56 63 63 65 51 47 47 45 56 63 **
<i>B.cereus</i> 1 FÖ20	45 45 51 68 71 58 60 49 51 76 56 47 40 40 38 35 38 38 37 38 53 76 **
<i>B.anthraxis</i> FÖ25	45 37 35 33 24 29 38 37 38 35 56 56 49 49 51 27 31 31 33 42 49 31 56 **
<i>B.circulans</i> 1 FÖ26	60 47 53 35 29 47 53 47 53 22 53 58 60 60 63 45 45 40 42 58 60 16 79 37 **
<i>B.circulans</i> 1 FÖ43	60 47 45 47 40 56 53 51 53 49 40 45 60 60 58 53 49 49 51 40 42 53 58 58 42 **
<i>B.circulans</i> 1 FÖ59	63 58 47 33 27 37 47 45 47 38 60 60 68 68 71 47 51 47 49 47 58 31 76 35 22 45 **
<i>B.licheniformis</i> FÖ31	56 51 49 24 26 42 40 47 45 37 58 63 71 71 73 58 58 53 55 68 71 22 92 40 21 47 29 **
<i>B.licheniformis</i> FÖ39	63 49 47 26 31 49 47 58 47 47 51 60 58 58 60 65 65 60 63 71 68 27 76 42 29 53 47 16 **
<i>B.licheniformis</i> FÖ61	73 58 56 33 31 49 56 58 60 31 56 60 58 58 60 56 56 51 53 70 73 21 76 38 19 45 31 19 17 **
<i>B.firmus</i> FÖ35	82 60 73 47 45 65 63 60 63 37 58 63 60 60 63 63 58 58 60 73 60 29 85 53 21 38 45 33 33 22 **
<i>B.megaterium</i> FÖ12	47 31 33 38 26 42 53 60 53 26 58 68 63 56 58 45 45 40 38 53 60 19 68 33 24 51 40 27 29 26 42 **
<i>B.megaterium</i> FÖ14	53 36 47 40 35 53 60 63 65 31 60 65 68 68 71 56 56 51 49 60 63 24 76 51 19 45 38 22 27 21 37 19 **
<i>B.megaterium</i> FÖ18	60 47 45 60 40 60 68 82 63 40 63 63 51 51 53 53 53 53 56 49 42 45 49 49 47 51 63 47 36 40 56 35 37 **
<i>B.megaterium</i> FÖ22	63 53 51 68 47 68 76 92 71 42 60 60 45 45 47 60 60 60 63 56 49 51 51 56 53 53 71 49 38 42 58 37 42 04 **
<i>B.thuringiensis</i> RSKK 380	
<i>B.thuringiensis</i> Mu4	
<i>B.t. subsp. kurstaki</i>	
<i>B.thuringiensis</i> 916	
<i>B.t. subsp. kurstaki</i> HD-1	
<i>B.t. subsp. kurstaki</i> HD-73	
<i>B.t. subsp. kurstaki</i> HD-125	
<i>B.t. subsp. kurstaki</i> HD-137	
<i>B.thuringiensis</i> FÖ21	
<i>B.cereus</i> FÖ24	
<i>B.thuringiensis</i> FÖ7	
<i>B.thuringiensis</i> FÖ8	
<i>B.thuringiensis</i> FÖ16	
<i>B.thuringiensis</i> FÖ19	
<i>B.cereus</i> FÖ15	
<i>B.cereus</i> 1 FÖ27	
<i>B.cereus</i> 1 FÖ28	
<i>B.cereus</i> 1 FÖ36	
<i>B.cereus</i> FÖ41	
<i>B.cereus</i> 1 FÖ46	
<i>B.cereus</i> 2 FÖ34	
<i>B.cereus</i> 1 FÖ20	
<i>B.anthraxis</i> FÖ25	
<i>B.circulans</i> 1 FÖ26	
<i>B.circulans</i> 1 FÖ43	
<i>B.circulans</i> 1 FÖ59	
<i>B.licheniformis</i> FÖ31	
<i>B.licheniformis</i> FÖ39	
<i>B.licheniformis</i> FÖ61	
<i>B.firmus</i> FÖ35	
<i>B.megaterium</i> FÖ12	
<i>B.megaterium</i> FÖ14	
<i>B.megaterium</i> FÖ18	
<i>B.megaterium</i> FÖ22	
<i>B.pumilus</i> FÖ23	
<i>B.pumilus</i> FÖ33	
<i>B.pumilus</i> FÖ44	
<i>B.pumilus</i> FÖ56	
<i>B.pumilus</i> FÖ57	
<i>B.pumilus</i> FÖ58	
<i>B.subtilis</i> FÖ13	
<i>B.subtilis</i> FÖ52	
<i>B.subtilis</i> FÖ54	
<i>B.laterosporus</i> FÖ30	
<i>B.laterosporus</i> FÖ48	
<i>B.laterosporus</i> FÖ60	
<i>B.laterosporus</i> FÖ32	
<i>B.brevis</i> FÖ1	
<i>B.brevis</i> FÖ4	
<i>B.brevis</i> FÖ6	
<i>B.brevis</i> FÖ42	
<i>B.brevis</i> FÖ47	
<i>B.brevis</i> FÖ49	
<i>B.sphaericus</i> FÖ3	
<i>B.sphaericus</i> FÖ9	
<i>B.sphaericus</i> FÖ10	
<i>B.sphaericus</i> FÖ11	
<i>B.sphaericus</i> FÖ37	
<i>B.sphaericus</i> FÖ45	
<i>B.sphaericus</i> FÖ53	
<i>B.sphaericus</i> FÖ55	
<i>B.sphaericus</i> FÖ2	
<i>B.sphaericus</i> FÖ5	
<i>B.sphaericus</i> FÖ29	
<i>B.sphaericus</i> FÖ40	
<i>B.sphaericus</i> FÖ50	

Çizelge. 4.11. (Devam) *Bacillus* türlerinin toplam hücre protein sonuçlarına göre hesaplanmış genetik uzaklıkları

pop ID	
<i>B. thuringiensis</i> RSKK 380	
<i>B. thuringiensis</i> Mu4	
<i>B. l. sp. kurstaki</i>	
<i>B. thuringiensis</i> 916	
<i>B. l. sp. kurstaki</i> HD-1	
<i>B. l. subsp. kurstaki</i> HD-73	
<i>B. l. subsp. kurstaki</i> HD-125	
<i>B. l. subsp. kurstaki</i> HD-137	
<i>B. thuringiensis</i> FÖ21	
<i>B. cereus</i> FÖ24	
<i>B. thuringiensis</i> FÖ7	
<i>B. thuringiensis</i> FÖ8	
<i>B. thuringiensis</i> FÖ16	
<i>B. thuringiensis</i> FÖ19	
<i>B. cereus</i> FÖ15	
<i>B. cereus</i> FÖ27	
<i>B. cereus</i> FÖ28	
<i>B. cereus</i> FÖ36	
<i>B. cereus</i> FÖ41	
<i>B. cereus</i> 1 FÖ46	
<i>B. cereus</i> 1 FÖ51	
<i>B. cereus</i> 2 FÖ34	
<i>B. cereus</i> FÖ20	
<i>B. anthracis</i> FÖ25	
<i>B. circulans</i> FÖ26	
<i>B. circulans</i> 1 FÖ43	
<i>B. circulans</i> 1 FÖ59	
<i>B. licheniformis</i> FÖ31	
<i>B. licheniformis</i> FÖ39	
<i>B. licheniformis</i> FÖ61	
<i>B. firmus</i> FÖ35	
<i>B. megaterium</i> FÖ12	
<i>B. megaterium</i> FÖ14	
<i>B. megaterium</i> FÖ18	
<i>B. megaterium</i> FÖ22	
<i>B. megaterium</i> FÖ38	
<i>B. pumilus</i> FÖ23	
<i>B. pumilus</i> FÖ33	
<i>B. pumilus</i> FÖ44	
<i>B. pumilus</i> FÖ56	
<i>B. pumilus</i> FÖ57	
<i>B. pumilus</i> FÖ58	
<i>B. subtilis</i> FÖ13	
<i>B. subtilis</i> FÖ52	
<i>B. subtilis</i> FÖ54	
<i>B. laterosporus</i> FÖ30	
<i>B. laterosporus</i> FÖ48	
<i>B. laterosporus</i> FÖ60	
<i>B. laterosporus</i> FÖ32	
<i>B. brevis</i> FÖ1	
<i>B. brevis</i> FÖ4	
<i>B. brevis</i> FÖ6	
<i>B. brevis</i> FÖ42	
<i>B. brevis</i> FÖ47	
<i>B. brevis</i> FÖ49	
<i>B. sthermophilus</i> FÖ3	
<i>B. sthermophilus</i> FÖ9	
<i>B. sthermophilus</i> FÖ10	
<i>B. sthermophilus</i> FÖ11	
<i>B. sthermophilus</i> FÖ37	
<i>B. sthermophilus</i> FÖ45	
<i>B. sthermophilus</i> FÖ53	
<i>B. sthermophilus</i> FÖ55	
<i>B. sphaericus</i> FÖ2	
<i>B. sphaericus</i> FÖ5	
<i>B. sphaericus</i> FÖ29	
<i>B. sphaericus</i> FÖ40	
<i>B. sphaericus</i> FÖ50	
<i>B. pumilus</i> FÖ23	63 49 42 26 24 40 42 49 47 31 56 60 63 63 65 51 51 47 49 56 58 17 71 35 16 33 27 13 14 08 22 22 21 37 42 13 **
<i>B. pumilus</i> FÖ33	73 45 56 53 42 53 65 58 60 42 47 51 45 45 47 47 47 42 45 60 53 42 56 47 29 33 38 40 31 24 33 40 31 40 47 29 24 **
<i>B. pumilus</i> FÖ44	73 45 60 58 47 53 65 58 60 51 56 56 45 45 47 42 42 38 40 71 63 51 47 42 40 40 51 53 38 35 45 49 42 36 42 40 35 08 **
<i>B. pumilus</i> FÖ56	51 38 45 47 45 51 53 51 53 49 63 58 47 47 49 49 49 45 42 68 71 40 45 58 35 42 53 38 33 37 42 31 29 42 45 35 29 26 22 **
<i>B. pumilus</i> FÖ57	53 40 47 40 38 49 51 49 51 47 56 51 40 40 42 42 42 38 40 71 73 38 47 51 29 37 47 33 27 31 37 33 31 45 47 33 24 24 21 04 **
<i>B. pumilus</i> FÖ58	65 47 49 38 36 47 49 51 45 45 58 53 47 47 49 45 45 40 42 58 60 36 53 49 27 38 37 35 26 26 31 42 33 47 53 31 19 19 19 17 13 **
<i>B. subtilis</i> FÖ13	53 45 42 19 17 40 47 53 51 51 63 63 65 42 42 38 40 51 63 14 76 35 13 45 24 13 21 14 29 19 17 40 47 16 08 35 47 33 27 26 **
<i>B. subtilis</i> FÖ52	65 51 49 31 33 47 63 60 63 33 49 53 60 60 63 40 40 37 38 53 60 19 68 37 14 42 26 24 26 13 27 24 26 51 58 20 13 26 37 35 29 24 13 **
<i>B. subtilis</i> FÖ54	65 56 53 31 29 47 63 60 63 37 45 45 51 51 53 37 37 33 35 49 60 22 68 37 17 42 22 27 29 16 31 27 26 51 58 17 16 26 37 35 29 24 13 05 **
<i>B. laterosporus</i> FÖ30	60 60 63 47 45 51 68 65 73 49 58 58 71 71 68 49 49 45 47 63 76 45 58 58 35 51 40 42 40 33 47 42 29 38 45 38 33 33 37 42 40 42 33 38 31 **
<i>B. laterosporus</i> FÖ48	60 60 68 65 68 88 85 95 92 53 63 58 76 76 73 68 63 63 65 73 71 63 92 85 60 71 73 60 53 63 65 51 45 56 63 56 53 68 68 65 63 60 45 60 56 47 **
<i>B. laterosporus</i> FÖ60	56 42 58 47 37 56 53 51 58 29 63 63 56 56 58 53 53 49 51 68 65 29 73 40 17 42 37 24 29 22 27 21 22 42 40 27 22 33 37 31 26 31 22 27 31 38 51 **
<i>B. laterosporus</i> FÖ32	65 51 58 35 33 51 53 60 53 26 45 48 56 56 58 48 48 45 47 58 56 26 79 48 21 56 33 31 37 29 35 35 26 42 48 24 26 37 48 51 45 35 19 24 24 42 42 27 **
<i>B. brevis</i> FÖ1	45 58 60 63 56 53 60 53 60 56 42 38 45 45 42 47 47 51 53 56 48 71 51 60 63 45 71 58 65 71 63 73 76 48 42 63 65 60 60 53 56 73 70 73 63 53 92 68 73 **
<i>B. brevis</i> FÖ4	65 51 48 56 40 51 68 60 58 45 48 53 56 56 58 48 48 48 51 48 42 53 68 45 51 60 63 56 48 58 60 47 53 51 53 51 48 45 48 56 58 60 48 47 47 65 71 60 51 58 **
<i>B. brevis</i> FÖ6	56 51 48 38 26 47 58 56 63 33 58 53 51 51 53 33 37 37 38 48 56 26 68 26 21 47 19 27 40 29 35 27 29 47 48 27 26 33 45 42 37 35 19 24 21 38 65 24 31 53 47 **
<i>B. brevis</i> FÖ42	60 47 53 47 29 47 68 56 58 29 48 48 42 42 45 33 33 33 35 58 56 29 63 29 24 51 37 35 40 33 31 27 33 38 40 35 33 33 37 42 37 42 29 27 27 38 71 27 31 53 27 17 **
<i>B. brevis</i> FÖ47	58 45 51 53 31 48 71 58 60 27 51 51 48 48 51 38 38 38 40 56 48 35 65 35 29 53 42 40 47 38 37 29 35 37 38 37 38 38 42 45 42 48 35 33 33 45 68 33 33 47 22 22 04 **
<i>B. brevis</i> FÖ49	68 63 65 68 65 58 60 58 56 60 65 60 68 68 65 56 56 56 53 65 68 56 60 60 53 68 56 58 60 60 58 63 60 53 60 58 60 56 51 49 56 58 60 58 53 53 73 58 58 47 40 48 37 35 **
<i>B. s. thermophilus</i> FÖ3	68 63 56 58 56 58 65 63 56 71 47 47 48 48 47 56 56 56 58 51 58 47 51 56 48 58 56 58 42 51 58 53 60 45 51 45 51 42 51 53 51 53 45 37 63 53 58 51 58 58 48 56 47 **
<i>B. s. thermophilus</i> FÖ9	79 58 56 37 38 45 60 49 56 38 38 42 53 53 56 51 47 47 48 65 58 24 71 47 19 37 42 29 27 21 26 37 24 45 51 22 21 27 38 40 35 33 24 26 26 33 63 29 29 51 58 40 37 42 65 42 **
<i>B. s. thermophilus</i> FÖ10	79 58 56 37 38 45 60 49 56 38 38 42 53 53 56 51 47 47 49 65 58 24 71 47 19 37 42 29 27 21 26 37 24 45 51 22 21 27 38 40 35 33 24 26 26 33 63 29 29 51 58 40 37 42 65 42 41 **
<i>B. s. thermophilus</i> FÖ11	82 60 53 35 37 42 58 47 53 40 37 45 56 56 58 53 49 49 51 63 56 22 73 45 21 38 45 31 26 22 27 35 26 47 53 21 22 29 40 42 37 35 26 27 27 35 65 31 31 53 56 42 38 45 68 40 01 01 **
<i>B. s. thermophilus</i> FÖ37	65 51 49 31 22 35 49 38 45 26 45 53 56 56 58 49 49 45 47 53 51 19 79 37 14 38 33 21 29 22 27 27 26 42 49 17 19 33 45 42 37 35 19 24 24 38 71 27 24 53 51 35 31 37 63 37 16 16 14 **
<i>B. s. thermophilus</i> FÖ45	56 47 49 35 26 42 49 42 53 33 53 58 65 65 68 49 49 45 47 63 60 22 63 29 21 47 33 27 33 22 35 27 26 47 53 17 22 33 33 35 29 35 22 27 27 35 65 21 35 73 47 31 27 33 53 45 33 33 31 21 **
<i>B. s. thermophilus</i> FÖ53	56 47 45 35 26 56 53 56 58 37 53 53 65 65 68 49 49 45 47 58 56 37 73 49 35 42 37 35 41 37 47 35 33 56 63 21 29 40 49 38 37 35 22 35 31 56 47 38 38 79 42 35 47 45 68 58 45 45 42 35 24 **
<i>B. s. thermophilus</i> FÖ55	65 60 58 56 40 56 68 51 63 45 58 58 51 51 53 49 49 49 51 73 65 40 58 37 42 56 53 56 53 40 42 42 53 56 58 35 45 49 45 51 45 56 49 42 42 60 82 42 56 63 38 42 24 26 49 53 49 49 47 38 21 31 **
<i>B. sphaericus</i> FÖ2	53 37 42 53 51 68 60 68 56 42 60 60 53 53 56 65 65 60 63 71 63 60 56 60 53 53 71 49 38 47 63 45 42 40 47 47 42 42 47 41 42 40 51 53 63 63 53 53 49 82 53 73 68 65 76 56 51 51 53 49 49 40 58 **
<i>B. sphaericus</i> FÖ5	79 63 56 33 35 40 56 49 51 35 38 42 53 53 56 42 38 38 40 60 58 17 65 42 19 40 38 25 31 24 33 37 27 40 47 22 21 35 38 40 35 29 21 26 26 37 58 33 26 56 58 37 33 38 65 47 08 08 10 16 29 40 49 56 **
<i>B. sphaericus</i> FÖ29	73 53 56 45 42 58 51 68 56 38 51 56 63 63 65 56 51 51 53 82 73 31 82 47 33 49 31 37 38 38 37 33 47 49 56 40 31 42 47 45 38 37 35 37 40 63 58 37 37 76 58 40 45 51 60 65 38 38 40 40 45 53 63 42 35 **
<i>B. sphaericus</i> FÖ40	76 71 73 56 49 60 58 65 68 45 58 63 60 60 63 85 85 79 82 68 71 40 99 49 42 71 49 35 33 33 51 49 38 37 49 53 56 53 51 40 42 42 51 65 38 47 73 60 42 56 63 68 63 49 49 47 42 42 56 58 49 45 **
<i>B. sphaericus</i> FÖ50	60 47 49 47 45 47 45 56 53 37 53 58 60 60 63 63 63 58 60 63 71 36 98 49 31 56 33 31 37 37 47 35 33 51 53 35 33 45 53 45 43 39 31 31 47 56 35 39 68 56 35 43 45 58 58 45 45 45 38 47 43 55 58 40 40 24 **



Şekil 4.1. *Bacillus* türlerine ait protein profillerinin POPGEN istatistik programı ile hesaplanmış genetik uzaklık ilişkisini gösteren dendrogram

B. thuringiensis FÖ16 ve *B. thuringiensis* FÖ19 izolatlarının *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1'e %58, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73'e %56, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-125' e %73, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-137'ye %56, *B. thuringiensis* 916'ya %76, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* suşuna %63, *B. thuringiensis* RSKK 380'e %56 ve *B. thuringiensis* Mu4'e olan genetik uzaklıkları %47 olarak belirlenmiştir.

FÖ16 ve FÖ19 izolatlarının FÖ21 izolatına olan genetik uzaklıkları %58, *B. thuringiensis* FÖ7 ve *B. thuringiensis* FÖ8 izolatlarına olan genetik uzaklıkları ise %26 ile %33 olarak belirlenmiştir. *B. thuringiensis* FÖ7 izolatının *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1'e %58, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73'e %53, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-125'e %56, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-137' ye %48, *B. thuringiensis* 916'ya %47, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* suşuna %58, *B. thuringiensis* RSKK 380' e %71 ve *B. thuringiensis* Mu4'e olan genetik uzaklıkları %63 olarak belirlenmiştir. *B. thuringiensis* FÖ21 izolatına olan genetik uzaklığı ise %65 olarak belirlenmiştir.

B. thuringiensis FÖ8 izolatının *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1'e %53, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73'e %53, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-125'e %56, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-137' ye %53, *B. thuringiensis* 916'ya %51, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* suşuna %63, *B. thuringiensis* RSKK 380' e %76 ve *B. thuringiensis* Mu4'e olan genetik uzaklıkları %63 olarak belirlenmiştir. FÖ21 izolatına olan genetik uzaklığı ise %71 olarak belirlenmiştir.

İkinci ana grupta ise tanımlanan *Bacillus* cinsine ait *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans* gibi diğer türler yer almaktadır.

İkinci ana grupta yer alan izolatların genetik uzaklıkları ise %4 ile %95 arasında olduğu belirlenmiştir.

B. megaterium izolatlarının *B. licheniformis* izolatları ile birbirine olan genetik uzaklıkları %38 ile %49 arasında, *B. circulans* izolatları ile olan genetik uzaklıkları ise %53 ile %71 arasında değişmekte olduğu belirlenmiştir.

B. pumilus izolatlarının *B. circulans* izolatları ile arasındaki genetik uzaklıkları %16 ile %47 arasında, *B. licheniformis* izolatları ile olan genetik uzaklıkları %3 ile %14 arasında, *B. firmus* izolatları ile olan genetik uzaklıkları %22 ile %45, *B. megaterium* izolatları ile olan genetik uzaklıkları %23 ile %53' dür.

B. subtilis izolatlarının *B. circulans* izolatları ile birbirine olan genetik uzaklıkları %13 ile %45, *B. licheniformis* izolatları ile %13- %29, *B. firmus* izolatları ile %27- %31, *B. megaterium* izolatları ile %16- %58, *B. pumilus* izolatları ile %8- %47 arasında olduğu belirlenmiştir.

B. laterosporus izolatlarının *B. circulans* izolatları ile arasındaki genetik uzaklıkları %17- %73, *B. licheniformis* izolatları ile %22- %63, *B. firmus* izolatları ile %27- %65, *B. megaterium* izolatları ile %21- %63, *B. pumilus* izolatları ile %22- %68, *B. subtilis* izolatları ile %19- %60 arasında olduğu belirlenmiştir.

B. brevis izolatlarının *B. circulans* izolatları ile arasındaki genetik uzaklıkları %21- %71, *B. licheniformis* izolatları ile %21- %71, *B. firmus* izolatları ile %31- %63, *B. megaterium* izolatları ile %27- %76, *B. pumilus* izolatları ile %26- %73, *B. subtilis* izolatları ile %19- %73 ve *B. laterosporus* izolatları ile %31- %92 arasında olduğu belirlenmiştir.

B. stearothermophilus izolatlarının *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. laterosporus* ve *B. brevis* izolatları ile genetik uzaklıklarının sırasıyla %18- %58, %21- %58, %27- %58, %19- %53, %19- %53, %21- %82, %27- %79 ve %19- %53 arasında değiştiği görülmüştür.

B. sphaericus izolatlarının *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. laterosporus*, *B. brevis* ve *B. stearothermophilus* izolatları

ile olan genetik uzaklıklarının sırasıyla %19- %71, %24- %49, %33- %63, %33- %56, %21- %56, %21- %63, %36- %63, %33- %82 ve %8- %65 arasında olduğu belirlenmiştir.

4.4. *Bacillus* İzolatlarının Plazmit DNA Profil Analizleri

Toprak örneklerinden izole edilen ve tanımlamaları yapılan toplam 60 adet *Bacillus* izolatının ve kontrol *Bacillus thuringiensis* suşlarının plazmit DNA'ları Bölüm 3.2.5' de anlatıldığı şekilde izole edilmiş ve plazmit DNA'ların görüntülenmesi agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır.

İncelenen izolatlardan 57 tanesinde plazmit DNA'sına rastlanmış, 3 tanesinde ise plazmit DNA tespit edilememiştir. Plazmit DNA büyüklükleri λ -pUC mix-Markır 4 ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. İzolatların taşıdığı plazmit sayısının 1–9 arasında değiştiği ve plazmit DNA büyüklüklerinin ise >19,3 kb ile 1,1 kb arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

B. cereus olarak tanımlamaları yapılan izolatlara ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 4.6' da verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre FÖ15 nolu izolatın >19,3- 19,3- 13,7- 5,7- 1,2 kb büyüklüğünde 5 adet, FÖ27 nolu izolatın 19,3- 4,5- 3,7- 1,8 kb büyüklüğünde 4 adet, FÖ34 nolu izolatın 19,3- 11,3- 5,7- 1,8 kb büyüklüğünde 4 adet, FÖ20, FÖ24, FÖ36, FÖ41, FÖ46 ve FÖ51 nolu izolatların da 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

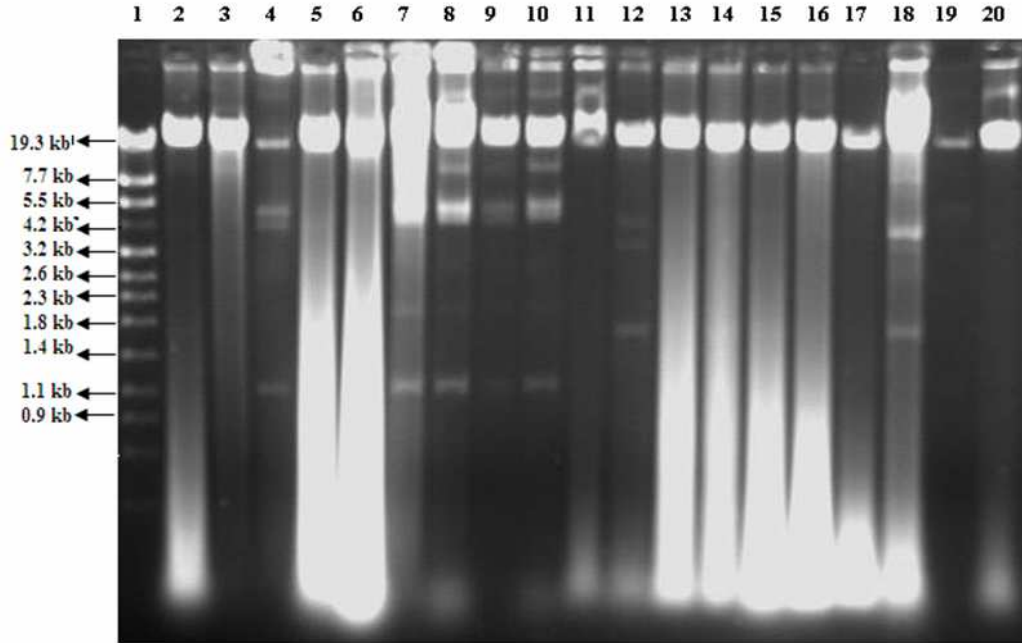
B. anthracis izolatına ait plazmit DNA' ların agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 4.6' da verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre *B. anthracis* FÖ25 nolu izolatın 19,3 kb büyüklüğünde bir adet plazmit DNA taşıdığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. *Bacillus* türlerinin plazmit DNA sayıları ve moleküler büyüklükleri

İzolatlar	Plazmit sayısı	Moleküler büyüklük (kb)
<i>B. brevis</i> FÖ1	5	>19,3- 19,3- 5- 4,2- 1,8
<i>B. sphaericus</i> FÖ2	1	19,3
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ3	2	>19,3- 19,3
<i>B. brevis</i> FÖ4	1	19,3
<i>B. sphaericus</i> FÖ5	1	19,3
<i>B. brevis</i> FÖ6	1	19,3
<i>B. thuringiensis</i> FÖ7	1	19,3
<i>B. thuringiensis</i> FÖ8	1	19,3
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ9	8	16,4- 7,7- 5,7- 5,2- 4,2- 3,7- 3,1- 2,3
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ10	2	16,4- 2,3
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ11	9	16,4- 7,7- 5,7- 5,2- 4,2- 3,7- 3,1- 2,3- 1,1
<i>B. megaterium</i> FÖ12	1	19,3
<i>B. subtilis</i> FÖ13	1	19,3
<i>B. megaterium</i> FÖ14	1	19,3
<i>B. cereus</i> 1 FÖ15	5	>19,3- 19,3- 13,7- 5,7- 1,2
<i>B. thuringiensis</i> FÖ16	4	19,3- 11,8- 5,5- 1,2
<i>B. megaterium</i> FÖ18	0	-
<i>B. thuringiensis</i> FÖ19	4	19,3- 11,8- 5,5- 1,2
<i>B. cereus</i> 1 FÖ20	1	19,3
<i>B. thuringiensis</i> FÖ21	4	19,3- 5,5- 4,5- 1,2
<i>B. megaterium</i> FÖ22	1	19,3
<i>B. pumilus</i> FÖ23	0	-
<i>B. cereus</i> 1 FÖ24	1	19,3
<i>B. anthracis</i> FÖ25	1	19,3
<i>B. circulans</i> 1 FÖ26	1	19,3
<i>B. cereus</i> 1 FÖ27	4	19,3- 4,5- 3,7- 1,8
<i>B. cereus</i> 1 FÖ28	1	19,3
<i>B. sphaericus</i> FÖ29	2	19,3- 1,1
<i>B. laterosporus</i> FÖ30	1	19,3
<i>B. licheniformis</i> FÖ31	1	19,3
<i>B. laterosporus</i> FÖ32	1	19,3
<i>B. pumilus</i> FÖ33	1	19,3
<i>B. cereus</i> 2 FÖ34	4	19,3- 11,3- 5,7- 1,8
<i>B. firmus</i> FÖ35	1	19,3

Çizelge 4.12. (Devam) *Bacillus* türlerinin plazmit DNA sayıları ve moleküler büyüklükleri

İzolatlar	Plazmit sayısı	Moleküler ağırlık (kb)
<i>B. cereus</i> 1 FÖ36	1	19,3
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ37	2	>19,3- 19,3
<i>B. megaterium</i> FÖ38	2	>19,3- 19,3
<i>B. licheniformis</i> FÖ39	1	19,3
<i>B. sphaericus</i> FÖ40	1	19,3
<i>B. cereus</i> 1 FÖ41	1	19,3
<i>B. brevis</i> FÖ42	1	19,3
<i>B. circulans</i> 1 FÖ43	0	-
<i>B. pumilus</i> FÖ44	3	19,3- 7,7- 6,1
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ45	1	19,3
<i>B. cereus</i> 1 FÖ46	1	19,3
<i>B. brevis</i> FÖ47	2	>19,3- 19,3
<i>B. laterosporus</i> FÖ48	1	19,3
<i>B. brevis</i> FÖ49	1	19,3
<i>B. sphaericus</i> FÖ50	2	>19,3- 19,3
<i>B. cereus</i> 1 FÖ51	1	19,3
<i>B. subtilis</i> FÖ52	1	19,3
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ53	1	19,3
<i>B. subtilis</i> FÖ54	1	19,3
<i>B. stearothermophilus</i> FÖ55	1	19,3
<i>B. pumilus</i> FÖ56	2	19,3- 7,1
<i>B. pumilus</i> FÖ57	2	19,3- 7,1
<i>B. pumilus</i> FÖ58	2	>19,3- 19,3
<i>B. circulans</i> 1 FÖ59	2	>19,3- 19,3
<i>B. laterosporus</i> FÖ60	1	19,3
<i>B. licheniformis</i> FÖ61	1	19,3
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1	4	19,3- 5,5- 4,5- 1,2
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-73	4	19,3- 11,3- 5,5- 4,7
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tolworthi</i> HD-125	4	19,3- 11,3- 6,6- 5
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> HD-137	3	19,3- 6,6- 4,2
<i>B. thuringiensis</i> 916	1	19,3
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	4	19,3- 5,5- 4,5- 1,2
<i>B. thuringiensis</i> RSKK 380	1	19,3
<i>B. thuringiensis</i> Mu4	1	19,3



Resim 4.6. *B. thuringiensis*, *B. cereus* ve *B. anthracis* türlerine ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi

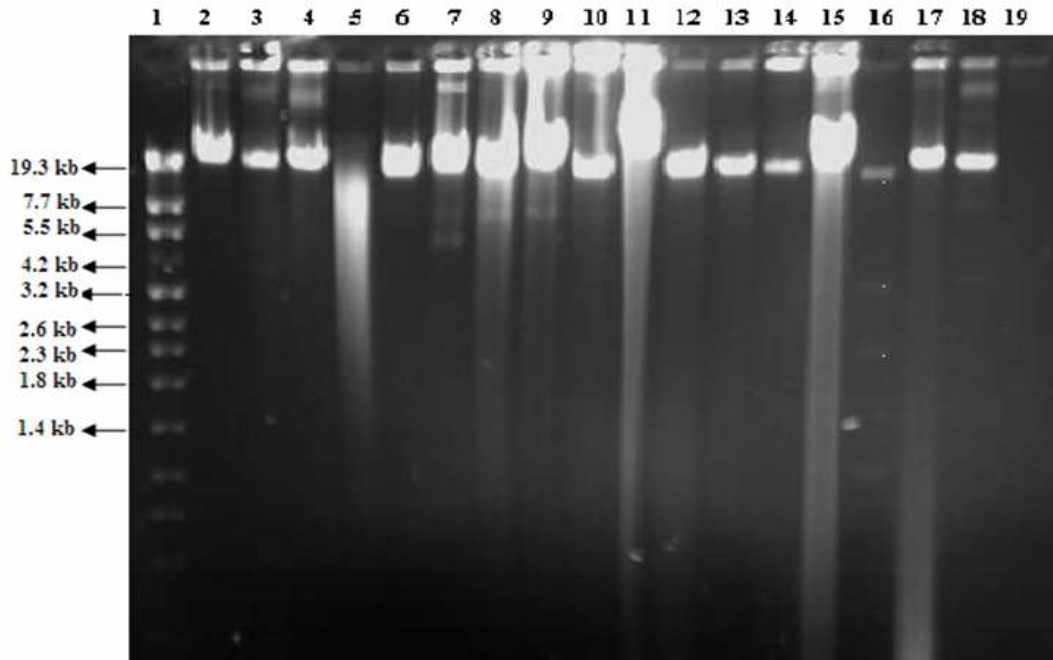
1. λ -pUC mix 2. *B. thuringiensis* RSSK 380 3. *B. thuringiensis* Mu4 4. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 5. *B. thuringiensis* FÖ7 6. *B. thuringiensis* FÖ8 7. *B. thuringiensis* FÖ16 8. *B. thuringiensis* FÖ19 9. *B. thuringiensis* FÖ21 10. *B. cereus*1 FÖ15 11. *B. cereus*1 FÖ24 12. *B. cereus*1 FÖ27 13. *B. cereus*1 FÖ28 14. *B. cereus*1 FÖ36 15. *B. cereus*1 FÖ41 16. *B. cereus*1 FÖ46 17. *B. cereus*1 FÖ51 18. *B. cereus*1 FÖ34 19. *B. cereus* FÖ20 20. *B. anthracis* FÖ25

B. megaterium izolatlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 4.7'de verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre *B. megaterium* FÖ14 ve FÖ22 izolatlarının 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet, *B. megaterium* FÖ38 izolatın >19,3 ve 19,3 kb büyüklüğünde iki adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir. *B. megaterium* FÖ18 izolatında ise plazmit DNA tespit edilememiştir.

B. pumilus izolatlarının ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 4.7'de verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre *B. pumilus* FÖ33 izolatının 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet, *B. pumilus* FÖ44 izolatının >19,3- 7,7 ve 6,1 kb büyüklüğünde 3 adet, *B. pumilus* FÖ56 ve FÖ58 izolatlarının da sırasıyla 19,3 -7,1 kb ve >19,3- 19,3 kb büyüklüğünde 2 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir. *B. pumilus* FÖ23 izolatında ise plazmit DNA tespit edilememiştir.

B. subtilis izolatlarına ait plazmit DNA' ların agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 4.7'de verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre *B. subtilis* FÖ13, FÖ52 ve FÖ54 izolatlarının 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir.

B. laterosporus izolatlarının ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 4.7'de verilmiştir. Yapılan hesaplamalar göre *B. laterosporus* FÖ30, FÖ32, FÖ48 ve FÖ60 izolatlarının 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir.



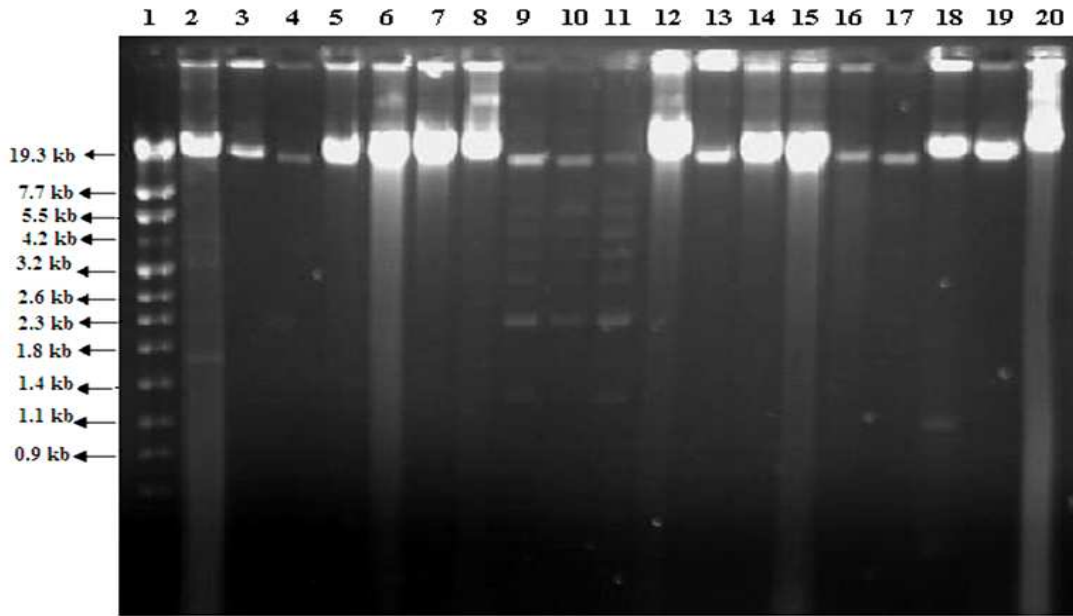
Resim 4.7. *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* ve *B. laterosporus* türlerine ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi

1. λ -pUC mix 2. *B. megaterium* FÖ12 3. *B. megaterium* FÖ14 4. *B. megaterium* FÖ22 5. *B. pumilus* FÖ23 6. *B. pumilus* FÖ33 7. *B. pumilus* FÖ44 8. *B. pumilus* FÖ56 9. *B. pumilus* FÖ57 10. *B. pumilus* FÖ58 11. *B. subtilis* FÖ13 12. *B. subtilis* FÖ52 13. *B. subtilis* FÖ54 14. *B. laterosporus* FÖ30 15. *B. laterosporus* FÖ48 16. *B. laterosporus* FÖ60 17. *B. laterosporus* FÖ32 19. *B. megaterium* FÖ18

B. brevis izolatlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 4.8'de verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre *B. brevis* FÖ4, FÖ6, FÖ42 ve FÖ49 izolatlarının 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet, *B. brevis* FÖ1 izolatının >19,3-

19,3- 5- 4,2- 1,8 kb büyüklüğünde 5 adet ve *B. brevis* FÖ47 izolatının ise >19,3- 19,3 kb büyüklüğünde 2 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir.

B. sphaericus izolatlarının plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 4.8'de verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre *B. sphaericus* FÖ2, FÖ5 ve FÖ40 izolatlarının 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet, *B. sphaericus* FÖ29 izolatının 19,3- 1,1 kb büyüklüğünde ve *B. sphaericus* FÖ50 izolatının >19,3- 19,3 kb büyüklüğünde 2 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir.

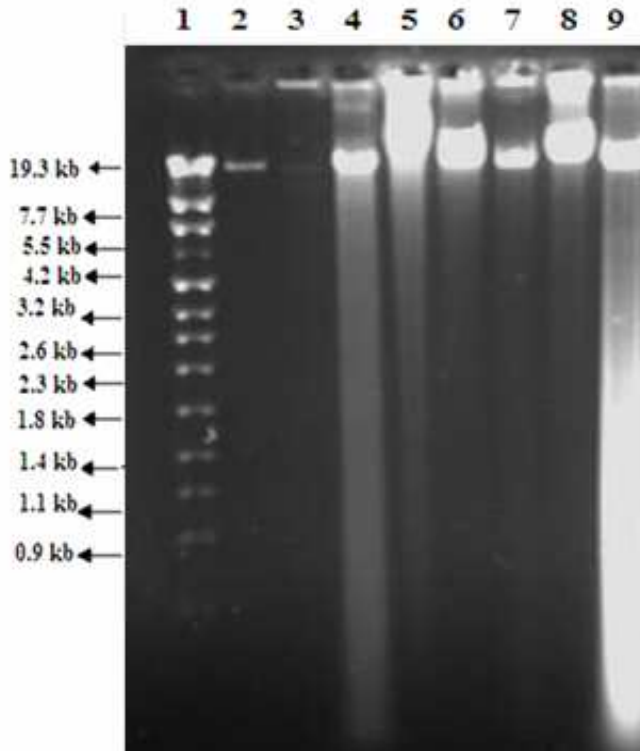


Resim 4.8. *B. brevis*, *B. stearothermophilus* ve *B. sphaericus* türlerine ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi

1. λ -pUC mix 2. *B. brevis* FÖ1 3. *B. brevis* FÖ4 4. *B. brevis* FÖ6 5. *B. brevis* FÖ42 6. *B. brevis* FÖ47 7. *B. brevis* FÖ49 8. *B. stearothermophilus* FÖ3 9. *B. stearothermophilus* FÖ9 10. *B. stearothermophilus* FÖ10 11. *B. stearothermophilus* FÖ11 12. *B. stearothermophilus* FÖ37 13. *B. stearothermophilus* FÖ45 14. *B. stearothermophilus* FÖ53 15. *B. stearothermophilus* FÖ55 16. *B. sphaericus* FÖ2 17. *B. sphaericus* FÖ5 18. *B. sphaericus* FÖ29 19. *B. sphaericus* FÖ40 20. *B. sphaericus* FÖ50

B. licheniformis, *B. firmus* ve *B. circulans* izolatlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 4.9' da verilmiştir. Yapılan hesaplamalara göre *B. licheniformis* FÖ31, *B. licheniformis* FÖ39, *B. licheniformis* FÖ61, *B. firmus* FÖ35,

B. circulans FÖ59 ve *B. circulans* FÖ26 nolu izolataların 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir. *B. circulans* FÖ43 nolu izolatta ise plazmit DNA tespit edilememiştir.



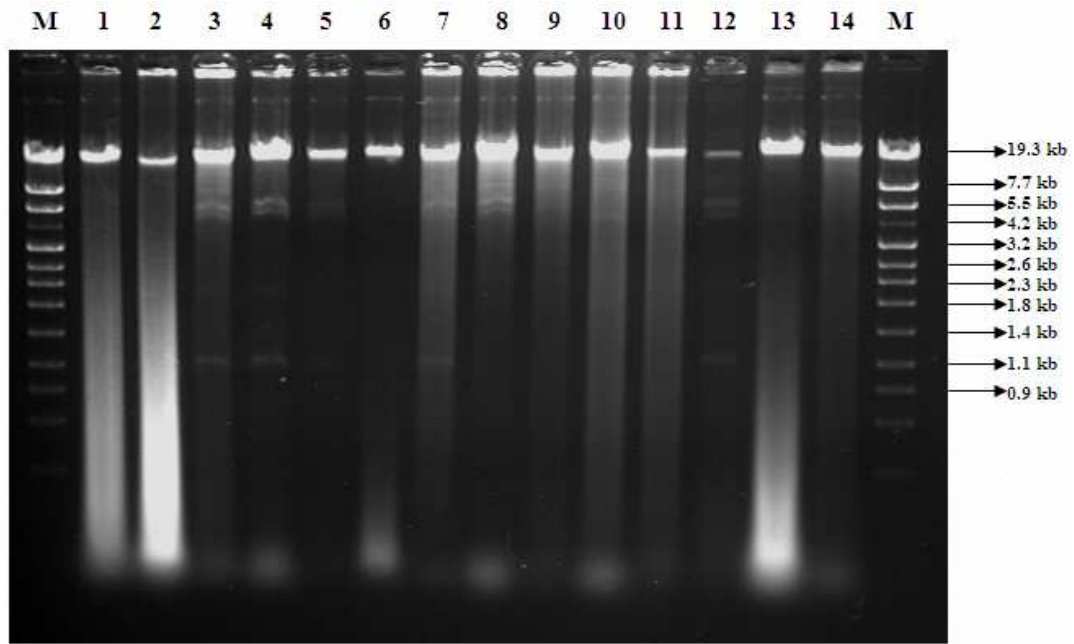
Resim 4.9. *B. circulans*, *B. licheniformis* ve *B. firmus* türlerine ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi

1. λ -pUC mix 2. *B. circulans*1 FÖ26 3. *B. circulans*1 FÖ43 4. *B. circulans*1 FÖ59 5. *B. licheniformis* FÖ31 6. *B. licheniformis* FÖ39 7. *B. licheniformis* FÖ61 8. *B. firmus* FÖ35

B. thuringiensis izolatlarına ve kontrol suşlarına ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri Resim 4.10' da verilmiştir.

Yapılan hesaplamalara göre *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 suşunun 19,3- 5,5- 4,5 ve 1,2 kb büyüklüğünde 4 adet, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 suşunun 19,3- 11,3- 5,5 ve 4,7 kb büyüklüğünde 4 adet, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-125 suşunun 19,3- 11,3- 6,6 ve 5 kb büyüklüğünde 4 adet, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-137 19,3- 6,6 ve 4,2 kb büyüklüğünde 3 adet, *B. thuringiensis* 916, *B. thuringiensis* RSKK380 ve *B. thuringiensis* Mu4 suşlarının ise

19,3 kb büyüklüğünde 1 adet plazmit DNA taşıdığı belirlenmiştir. *B. thuringiensis* FÖ21 izolatının 19,3- 5,5- 4,5 ve 1,2 kb büyüklüğünde 4 adet plazmit DNA taşıdığı belirlenmiştir. *B. thuringiensis* FÖ16 ve FÖ19 izolatlarında 19,3- 11,8- 5,5 ve 1,2 kb büyüklüğünde 4 adet, *B. thuringiensis* FÖ7 ve FÖ8 izolatlarında ise 19,3 büyüklüğünde bir adet plazmit DNA belirlenmiştir.



Resim 4.10. *B. thuringiensis* türlerine ait plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi
M. λ -pUC mix 1. *B. thuringiensis* FÖ7 2. *B. thuringiensis* FÖ8 3. *B. thuringiensis* FÖ16 4. *B. thuringiensis* FÖ19 5. *B. thuringiensis* FÖ21 6. *B. cereus* FÖ24 7. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 8. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 9. *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 10. *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 11. *B. thuringiensis* 916 12. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 13. *B. thuringiensis* RSKK 380 14. *B. thuringiensis* Mu4

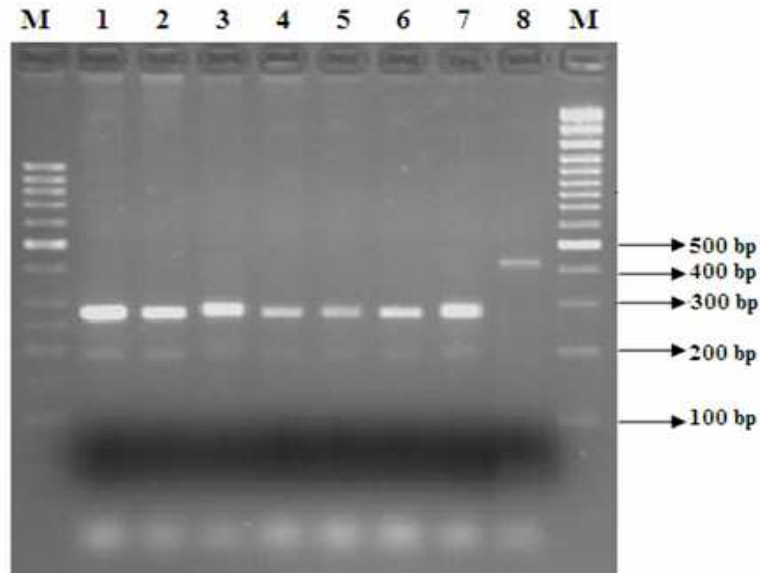
4.5. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının İnsektisidal Genlerinin Belirlenmesi

İzole edilen ve tanımlamaları yapılan *B. thuringiensis* izolatları, kontrol suşları ve API test kitleri ile *B. cereus* olarak tanımlanan türlerin insektisidal kristal gen taşıyıp taşımadıkları *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry7*, *cry8*, *cry5*, *cry12*, *cry14*, *cry21* ve *cyt1A* primerleri kullanılarak PZR işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve fotoğrafları çekilmiştir.

16S rRNA dizi analizi ile *B. thuringiensis* olarak tanımlanan FÖ21 izolatının *cryI* genel primeri ile yapılan PZR sonucunda yaklaşık olarak 272 bp'lık bir PZR ürünü verdiği gözlenmiştir (Resim 4.11.)

Kontrol suşlarından *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 ve *B. thuringiensis* 916'nın *cryI* genel primeri ile yaklaşık olarak 272 bp'lık, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* suşlarının ise *cryI* genel primeri ile yaklaşık olarak 290 bp'lık bir PZR ürünü verdiği gözlenmiştir (Resim 4.11.).

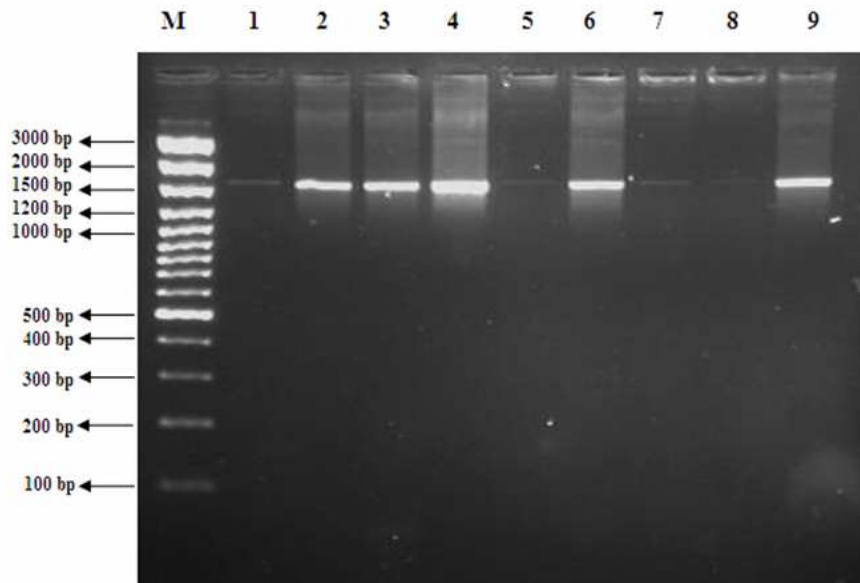
B. thuringiensis RSKK380 ve *B. thuringiensis* Mu4 suşlarında *cryI* genel primeri ile hiçbir amplifikasyon gözlenmemiştir. *B. cereus* izolatlarının *cryI* primeri ile yapılan analizi sonucunda FÖ24 izolatının yaklaşık olarak 410 bp'lık bir PZR ürünü verdiği tespit edilmiştir (Resim 4.11.). Diğer *B. cereus* izolatlarında *cryI* primeri ile pozitif reaksiyon gözlenmemiştir.



Resim 4.11. *cryI* genel primeri ile elde edilen PZR ürünleri

M. DNA ladder 50 bp 1. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 2. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 3. *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 4. *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 5. *B. thuringiensis* 916 6. FÖ21 7. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 8. FÖ24
M. DNA ladder 100 bp

cry2 primeri ile yapılan PZR işlemi sonucunda FÖ16, FÖ19 ve FÖ21 izolatlarının yaklaşık 1556 bp büyüklüğünde pozitif bir ürün verdiği belirlenmiştir (Resim 4.12). *B. thuringiensis* RSKK380 ve *B. thuringiensis* Mu4 suşları dışındaki diğer kontrol suşlarının da *cry2* primeri ile yaklaşık 1556 bp'lık pozitif bir ürün verdiği belirlenmiştir.



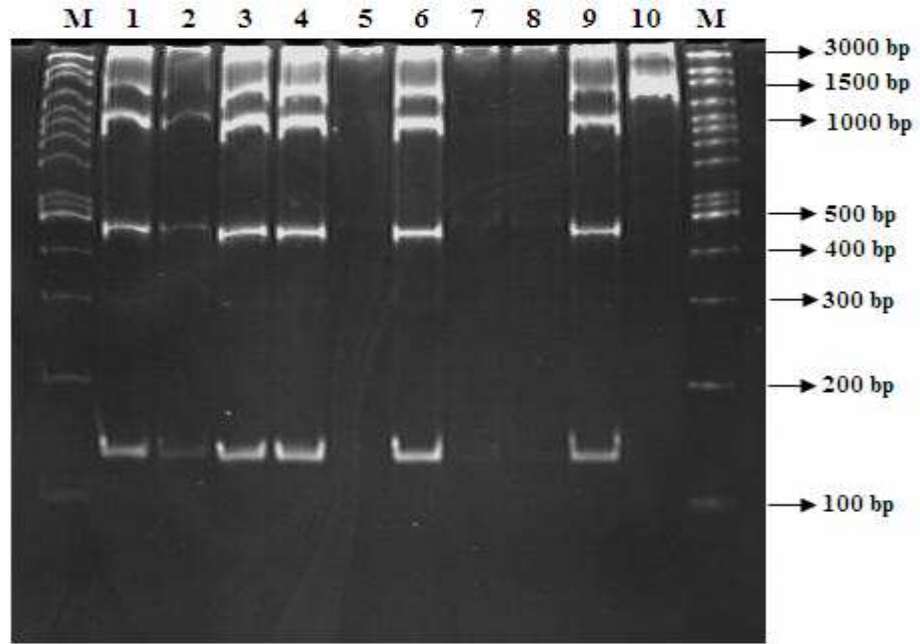
Resim 4.12. *cry2* genel primeri ile elde edilen PZR ürünleri

M. DNA ladder 100 bp 1. FÖ16 2. FÖ19 3. FÖ21 4. *B. subsp. kurstaki* HD-1 5. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 6. *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 7. *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 8. *B. thuringiensis* 916 10. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*

cry2 genlerinin DdeI restriksiyon enzimi aracılığı ile analizi

Farklı *cry2* genlerini belirlemek için de *cry2* genel primeri ile pozitif sonuç veren PZR ürünleri *DdeI* (Genmark) restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek restriksiyon parça uzunluk polimorfizimleri belirlenmiştir. Kesim sonuçları %10' luk poliakrilamit jelde yürütülerek etidyum bromür boyanmıştır.

Kesim sonucunda elde edilen DNA fragmentleri Resim 4.13' de gösterilmiştir. *DdeI* enzimi sonucunda beklenen DNA parça büyüklükleri Çizelge 4.13' de verilmiştir.



Resim 4.13. *cry2* genleri *DdeI* enzimi ile kesim sonucunda elde edilen restriksiyon fragmentleri

M. DNA ladder 100 bp, 1. FÖ16 2. FÖ19 3. FÖ21 4. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 5. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 6. *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 7. *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 8. *B. thuringiensis* 916 9. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 10. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1(kesilmemiş)

Çizelge 4.13. *cry2* geninin *DdeI* ile kesimi sonucunda beklenen restriksiyon parça büyüklükleri

Gen	Fragment büyüklüğü (bp)
<i>cry2Aa</i>	972, 450, 134
<i>cry2Ab</i>	1386, 134, 36
<i>cry2Ac</i>	915, 252, 162, 131, 36, 27
<i>cry2Ad</i>	663, 414, 309, 134, 36

DdeI enzimi ile kesim sonucunda FÖ16, FÖ19 ve FÖ21 izolatlarında yaklaşık olarak 1386, 972, 450, 134 bp büyüklüğünde dört DNA fragmenti oluşmuştur. 134, 450, 972 bp büyüklüğündeki DNA fragmentleri *Cry2Aa* proteinini kodlayan *cry2Aa* genini, 1386 ve 134 bp büyüklüğünde DNA fragmentleri ise *Cry2Ab* proteini kodlayan *cry2Ab* genini kodlamaktadır. Kontrol suşlarının da *cry2* PZR ürünlerinin

DdeI enzimi ile kesimi sonucunda FÖ16, FÖ19 ve FÖ21 izolatları ile aynı sonucu verdikleri belirlenmiştir. Yapılan restriksiyon analizi sonucunda FÖ16, FÖ19, FÖ21 izolatlarının ve kontrol suşlarının *cry2Aa* ve *cry2Ab* genlerini birlikte taşıdıkları belirlenmiştir.

cry3, *cry4*, *cry7*, *cry8*, *cry5*, *cry12*, *cry14*, *cry21* ve *cyt1A* genlerine ait genel primerlerle yapılan PZR işlemi sonucunda *B. thuringiensis* izolatlarının ve kontrol suşlarının hiçbirinde pozitif sonuç elde edilememiştir.

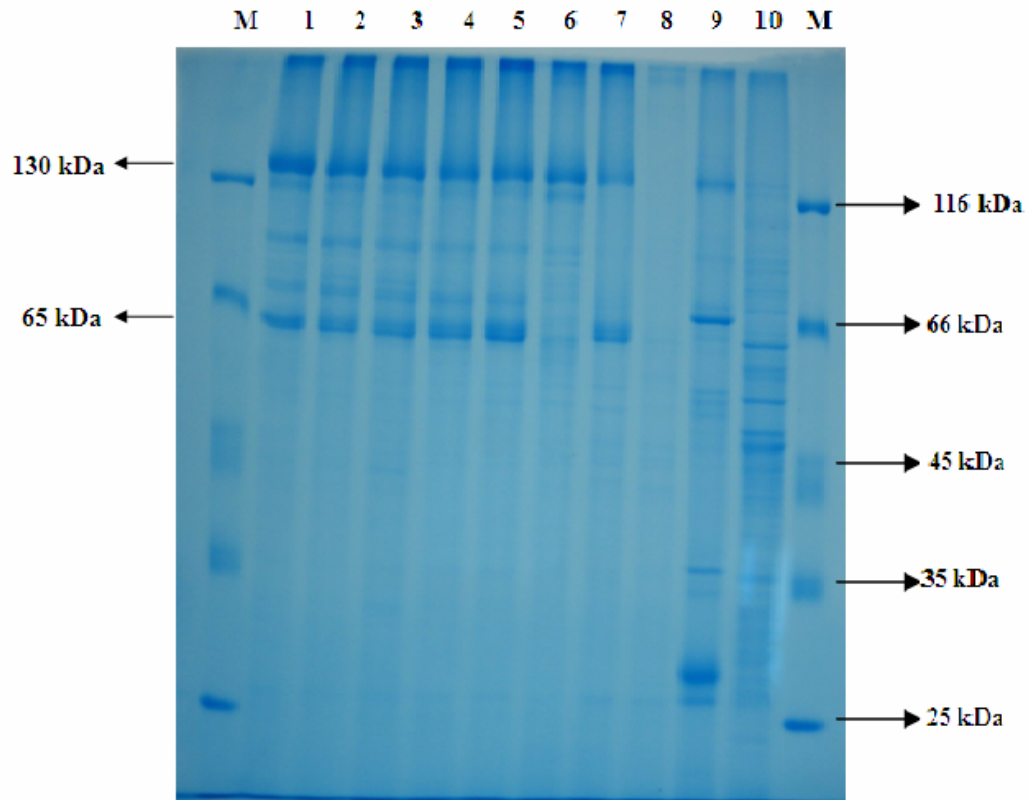
4.6. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının İnsektisidal Kristal Proteinlerinin Belirlenmesi

Bacillus thuringiensis izolatlarının ve kontrol suşlarının kristal proteinleri Bölüm 3.2.10' da anlatıldığı şekilde izole edilmiştir. Proteinlerin analizleri % 10'luk poliakrilamit jel kullanılarak SDS-PAGE elektroforezinde yapılmıştır (Resim 4.14).

Protein bantları markır ile karşılaştırılarak büyüklükleri tespit edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda *B. thuringiensis* FÖ21, FÖ16 ve FÖ19 izolatlarında yaklaşık olarak 130 kDa ve 65 kDa büyüklüğünde iki protein bandının bulunduğu belirlenmiştir.

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73, *B. thuringiensis* 916' ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* kontrol suşlarında da yaklaşık olarak büyüklüğü 130 kDa ve 65 kDa ağırlığındaki iki protein bandının, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125' de ise 130 kDa ağırlığında bir protein bandının olduğu tespit edilmiştir. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-137 suşunda ise yaklaşık olarak 130 kDa, 66 kDa ve 27 kDa ağırlığında üç protein bandının olduğu belirlenmiştir.

B. cereus FÖ24 izolatında ve *B. thuringiensis* 916 kontrol suşunda ise 130 kDa ve 65 kDa büyüklüğündeki protein bantları gözlenmemiştir.

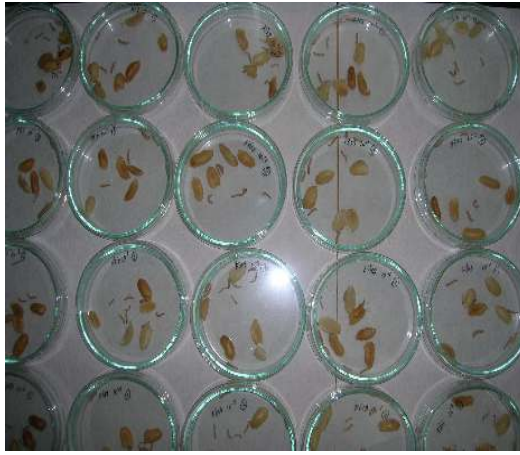


Resim 4.14. *B. thuringiensis* suşlarına ait insektisidal kristal proteinlerin elektroforezi

M. Protein Marker (116- β -galaktosidaz, 66-serum albumin, 45-ovalbumin, 35- laktat dehidrogenaz, 25- restriksiyon endonükleaz Bsp98) 1. *B. thuringiensis* FÖ16 2. *B. thuringiensis* FÖ19 3. *B. thuringiensis* FÖ21 4. *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* 5. *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 6. *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 7. *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 8. FÖ24 (*B. cereus* I) 9. *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 10. *B. thuringiensis* 916

4.7. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının İnsektisidal Etkisinin Belirlenmesi

Bacillus thuringiensis izolatlarının böcekler üzerine olan toksik etkileri denemeler yapılarak belirlenmiştir. Yapılan denemelerde Lepidoptera takımına ait *Ephestia kuehniella* ve Coleoptera takımına ait *Trogoderma granarium* türlerin 3. dönem larvaları kullanılmıştır. Bölüm 3.2.11’de anlatıldığı şekilde hazırlanan spor-parasporal kristal karışımları larvaların yiyeceklerine emdirilerek uygulanmıştır (Resim 4.15). Yedi gün sonraki larva ölümleri kaydedilmiştir.



a



b



c



d

Resim 4.15. *B. thuringiensis* spor- toksin karışımının *E. kuehniella* larvaları üzerine uygulanması

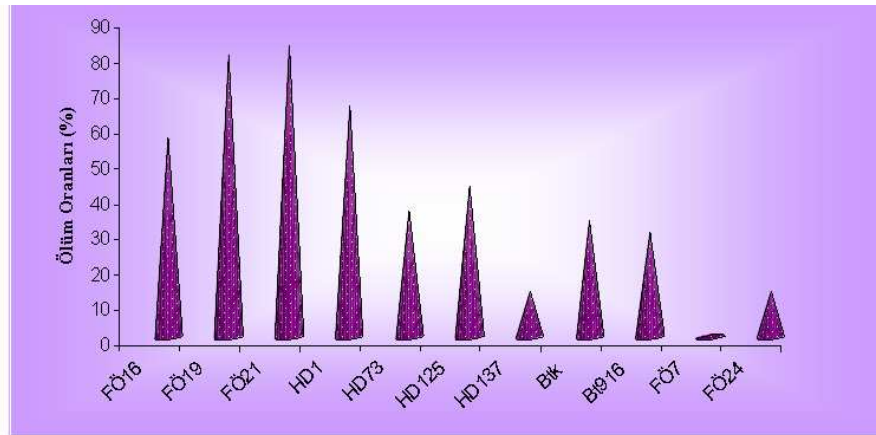
- a. Spor ve parasporal kristal karışımlarının *E. kuehniella* larvalarına uygulanması b. FÖ21 izolatının *E. kuehniella* larvalara uygulanması c. FÖ16 izolatının *E. kuehniella* larvalara uygulanması d. FÖ19 izolatının *E. kuehniella* larvalara uygulanması

Larvalar üzerinde yapılan deneme sonuçları kontrol suşları ile karşılaştırılarak her bir izolat için ve LC_{50} ve LC_{99} değerleri Probit analizi ile (Çizelge 4.14), ölüm oranları ise Abbot's eşitliği ile belirlenmiştir (Şekil 4.2).

Çizelge 4. 14. *B. thuringiensis* izolatlarının ve kontrol suşlarının Probit analiz sonuçları

İzolatlar	^a LC ₅₀	^a LC ₉₉	X ²	df	p
<i>B. t. subsp. kurstaki</i> HD-1	1,83	5,78	25,182	2	,0001
<i>B. t. subsp. kurstaki</i> HD-73	3,14	7,21	22,726	2	,0001
<i>B. t. subsp. kurstaki</i> HD125	2,95	9,36	30,502	2	,0001
<i>B. t. subsp. kurstaki</i> HD-137	10,29	26,83	13,008	2	,001
<i>B. thuringiensis</i> 916	3,68	8,56	6,367	2	,001
<i>B. t. subsp. kurstaki</i>	3,71	9,89	3,705	2	,001
<i>B. thuringiensis</i> FÖ16	2,17	6,56	38,354	2	,0001
<i>B. thuringiensis</i> FÖ19	1,48	4,58	18,444	2	,0001
<i>B. thuringiensis</i> FÖ21	1,08	4,06	18,088	2	,0001
<i>B. cereus</i> FÖ24	7,83	19,00	9,186	2	,010
<i>B. thuringiensis</i> FÖ7	-	-	-	-	-

^a LC₅₀ ve LC₉₉ = log (spor-kristal konsantrasyonu/ml)



Şekil 4.2. *E. kuehniella* larvaları üzerine etkili olan *B. thuringiensis* izolatlarının yüzde ölüm oranları

Yapılan denemeler sonucunda *B. thuringiensis* FÖ21 izolatının Lepidoptera takımına ait *Ephestia kuehniella* larvaları için LC₅₀ değeri 1,08 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 4,06 spor-kristal kons./ml ($X^2= 18,088$, df= 2, P<0,0001) olarak hesaplanmıştır. Abbot's formülüne göre yapılan hesaplama sonucunda FÖ21 izolatının larvalar üzerinde %83 oranında etkili olduğu belirlenmiştir.

B. thuringiensis FÖ19 izolatının *E. kuehniella* larvaları için LC₅₀ değeri 1,48 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 4,58 spor-kristal kons./ml ($X^2= 18,444$, df= 2, P<0,0001) olarak hesaplanmıştır. Abbot's formülüne göre yapılan hesaplama sonucunda FÖ19 izolatının larvalar üzerinde %80 oranında etkili olduğu belirlenmiştir.

B. thuringiensis FÖ16 izolatının *E. kuehniella* larvaları için LC₅₀ değeri 2,17 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 6,56 spor-kristal kons./ml ($X^2= 25,182$, df= 2, P<0,0001) olarak hesaplanmıştır. Abbot's formülüne göre yapılan hesaplama sonucunda FÖ16 izolatının larvalar üzerinde %57 oranında etkili olduğu belirlenmiştir.

B. cereus FÖ24 izolatının *E. kuehniella* larvaları için LC₅₀ değeri 7,83 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 19,00 spor-kristal kons./ml ($X^2= 13,008$, df= 2, P<0, 001) olarak hesaplanmıştır. Abbot's formülüne göre yapılan hesaplama sonucunda FÖ24 izolatının larvalar üzerinde % 13 oranında etkili olduğu belirlenmiştir. FÖ7 izolatının larvalar üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir.

E. kuehniella larvaları için *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 suşunun LC₅₀ değeri 1,83 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 5,78 spor-kristal kons./ml ($X^2=25,182$, df= 2, P<0,0001), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 suşunun LC₅₀ değeri 3,14 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 7,21 spor-kristal kons./ml ($X^2=22,726$, df= 2, P<0,0001), *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 suşunun LC₅₀ değeri 2,95 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 9,36 spor-kristal kons./ml ($X^2=0,502$, df= 2, P<0,0001), *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 suşunun LC₅₀ değeri 10,29 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 26,83 spor-kristal kons./ml

($X^2=9,186$, $df= 2$, $P<0,010$), *B. thuringiensis* 916 şusunun LC_{50} değeri 3,68 spor-kristal kons./ml ve LC_{99} değeri 8,56 spor-kristal kons./ml ($X^2=6,367$, $df=2$, $P<0,001$), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* şusunun LC_{50} değeri 3,71 spor-kristal kons./ml ve LC_{99} değeri 9,89 spor-kristal kons./ml ($X^2=3,705$, $df= 2$, $P<0,001$) olarak belirlenmiştir.

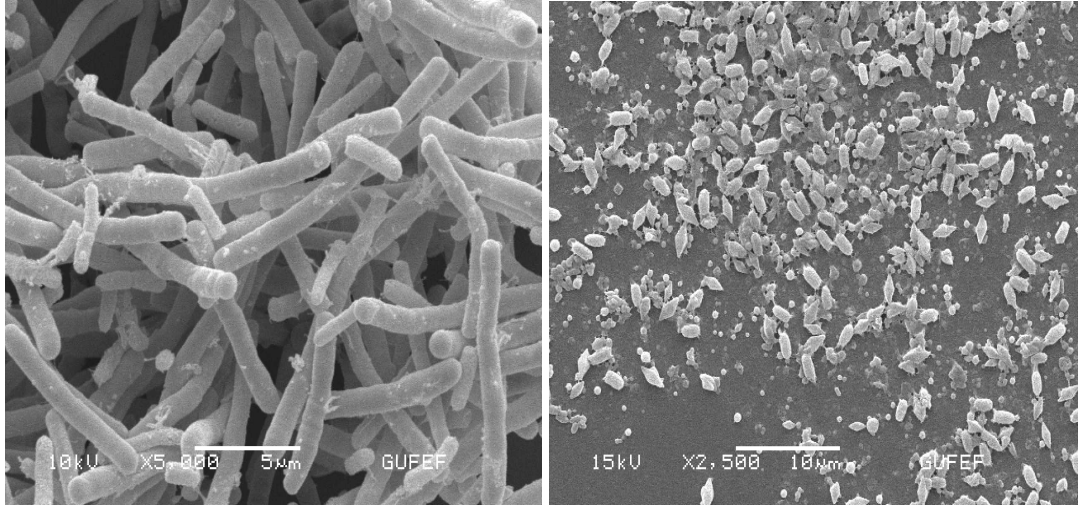
Abbot' s formülüne göre *E. kuehniella* larvaları üzerine *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 şusunun %67, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 şusunun %37, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 şusunun %43, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 şusunun %13, *B. thuringiensis* 916 şusunun %30 ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* şusunun %33 oranında etkili oldukları belirlenmiştir.

B. thuringiensis izolatlarının ve kontrol suşlarının Coleoptera takımına ait *Trogoderma granarium* larvaları üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

4.8. *Bacillus thuringiensis* Türlerinin Parasproral Kristal Yapılarının Taramalı Elektron Mikroskobu İle Belirlenmesi

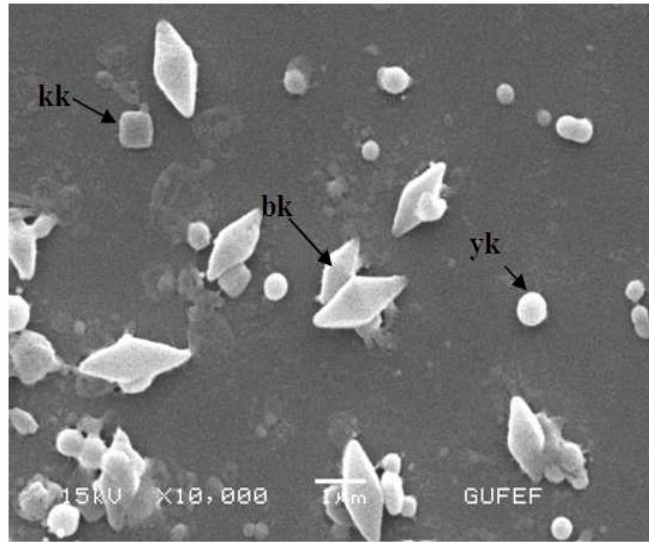
B. thuringiensis izolatlarının ve kontrol suşlarının parasproral kristal yapıları ve aynı zamanda spor yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) çalışması ile belirlenmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda izolatlardan *B. thuringiensis* FÖ21 izolatının baklava dilimi (bipiramidal), kübik ve yuvarlak şekilli parasproral kristal yapıları taşıdıkları belirlenmiştir. *B. thuringiensis* FÖ21 izolatına ait kristal yapıların ve sporların şekilleri Resim 4. 16' da verilmiştir.



a

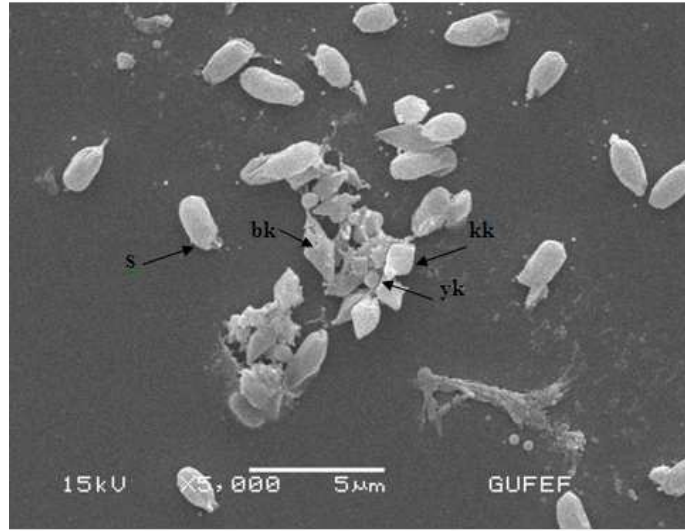
b



c

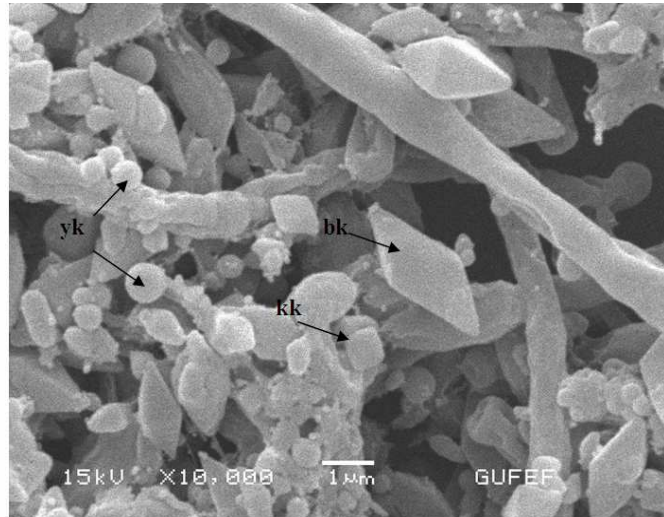
Resim 4.16. *B. thuringiensis* FÖ21 izolatının elektron mikroskop fotoğrafları
 a. İzolatın genel görünüşü b. parasporal kristal yapıları ve sporlar
 c. Baklava dilimli (bk), yuvarlak (yk) ve kübik (kk) şekilli kristal yapıları

B. thuringiensis FÖ19 izolatına ait kristal yapıların SEM görüntüleri Resim 4.17’ de verilmiştir. Resimden de görüldüğü gibi *B. thuringiensis* FÖ19 izolatının da baklava dilimi, kübik ve yuvarlak şeklinde parasporal kristal yapılar taşıdığı belirlenmiştir.

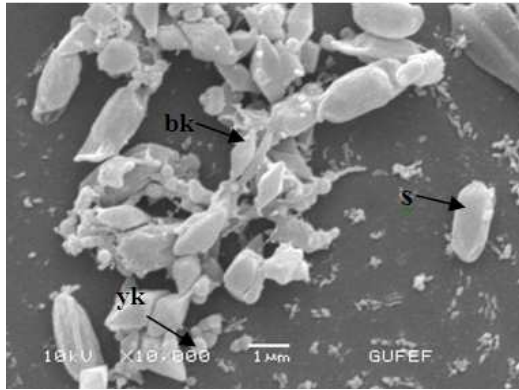


Resim 4.17. *B. thuringiensis* FÖ19 izolatının kristal yapılarının elektron mikroskop fotoğrafı
(s-spor, bk-baklava dilimli kristaller, yk-yuvarlak kristaller, kk-kübik kristaller)

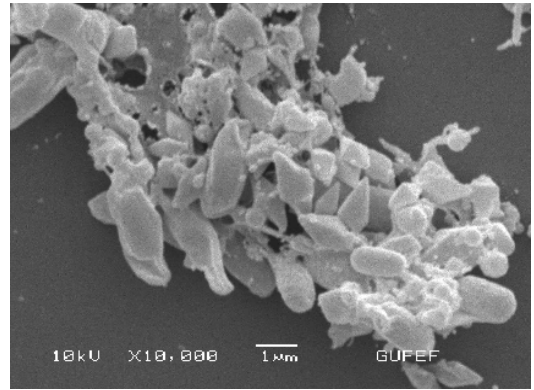
B. thuringiensis FÖ16 izolatına ait kristal yapıların SEM görüntüleri Resim 4.18’ de verilmiştir. *B. thuringiensis* FÖ16 izolatının da yapılan çalışma sonucunda baklava dilimi, kübik ve yuvarlak şeklinde parasporal kristal yapılar taşıdığı belirlenmiştir.



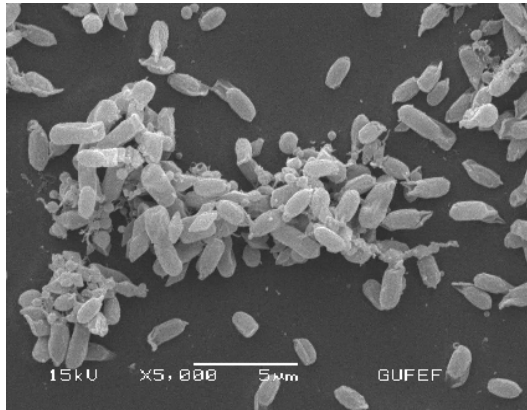
Resim 4.18. *B. thuringiensis* FÖ 16 izolatının kristal yapılarının elektron mikroskop fotoğrafı
(bk-baklava dilimli kristaller, yk-yuvarlak kristaller, kk-kübik kristaller)



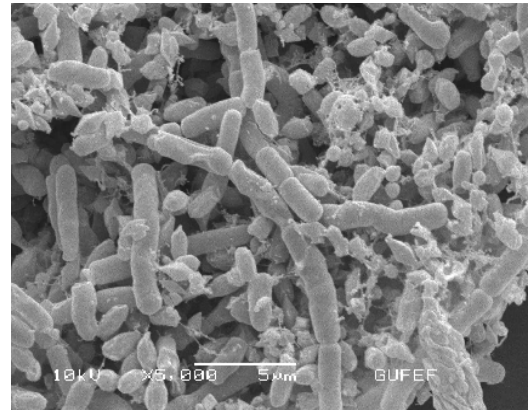
a



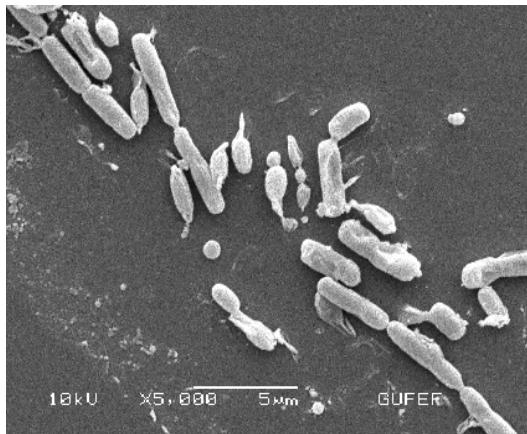
b



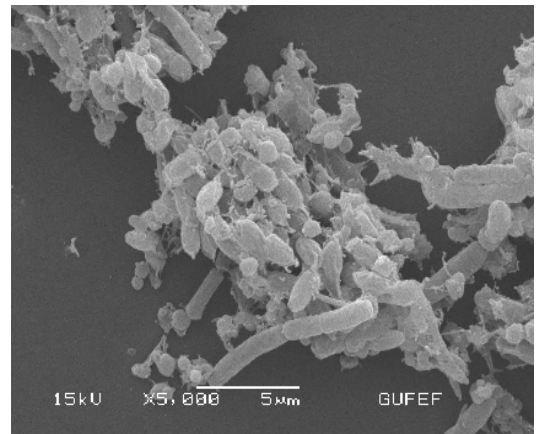
c



d



e



f

Resim 4.19. Kontrol *Bacillus thuringiensis* suşlarının kristal yapılarının elektron mikroskop fotoğrafları

a. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* b. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 c. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 d. *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 e.- *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 f. *B. thuringiensis* 916 (s;spor, bk;baklava dilimli kristaller, yk;yuvarlak kristaller)

Kontrol suşlarının parasporal kristal yapılarının elektron mikroskop görüntüleri Resim 4.19’ da verilmiştir. Yapılan inceleme sonucunda *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* kontrol suşlarının baklava dilimi, yuvarlak ve kübik şeklinde üç parasporal kristal yapıyı birlikte taşıdıkları belirlenmiştir. *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 ve *B. thuringiensis* 916 suşlarının ise yuvarlak şekilli parasporal kristal yapılar taşıdıkları belirlenmiştir. SEM’ de yapılan ölçümler sonucunda parasporal kristal yapıların büyüklüklerinin 404 nm ile 3,13 µm arasında olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada kullanılan *Bacillus* suşlarının 52 tanesi Ankara'nın farklı yerlerinden alınan toprağın ısıtılması ve seyreltilmesi sonucunda izole edilmiştir. Bu suşların tanımlanması API 20 E ve API 50 CHB test kitleri kullanılarak yapılmıştır. Biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmakta olan *Bacillus thuringiensis* türlerinin izolasyonu asetat zenginleştirme metoduyla yapılmıştır. *B. thuringiensis* türleri API test kitlerinde *B. cereus* ile aynı sonuçları verdiği için tanımlanmaları 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılması ve PZR ürünlerinin analizi ile gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen bakterilerin tanımlanmaları daha hızlı ve daha güvenilir bir yöntem olarak kullanılan API 20 E ve API 50 CHB test kitleri ile yapılmıştır. Yapılan çalışma ile *B. cereus* (8), *B. anthracis* (1), *B. sphaericus* (5), *B. subtilis* (3), *B. licheniformis* (3), *B. laterosporus* (4), *B. pumilus* (7), *B. megaterium* (2), *B. stearothermophilus* (8), *B. brevis* (6), *B. firmus* (1) ve *B. circulans* (3) türlerine toplam 52 izolatin tanımlanması yapılmıştır (Bkz. Çizelge 4.1).

Bacillus cinsi bakterilerin sınıflandırılmasında, aerobik, Gram-pozitif, çubuk şekilli olmaları ve endospor oluşturmaları önemli yer tutmasına rağmen, türlerin ayrımının güç olduğu ve yanlış tanımlamalar yapılabileceği bildirilmektedir. Yüksek derecedeki heterojenitenin standart testler ile tanımlamayı zorlaştırdığı ifade edilmektedir [6,18]. Cinsin sahip olduğu geniş fenotipik çeşitliliğin aynı zamanda geniş bir filogenetik dağılıma neden olduğu ve gelişmiş moleküler tekniklerle elde edilen kriterlerin organizmaların gruplandırılmasında esas yeri teşkil ettiği belirtilmiştir [6].

İzole edilen birçok suşun birbiriyle karıştırılması, suşlar arasında ayırım geliştirmek ve suşların teşhisinin doğruluğunu ispatlamak zorunluluğunu gündeme getirmiştir. Ancak, sınıflandırma için geliştirilen morfolojik ve biyokimyasal testler ve fenotipik özellikler suşların ayırımı için yeterli olmadığından değişik yöntemler geliştirilmiştir [47].

Ribozomal RNA genleri (rDNA) (16S, 23S ve 5S) bakterilerde yüksek derecede korunmuş bölgelerdir. Özellikle de 16S rRNA genleri bakteri türleri arasında filogenetik yakınlığın belirlenmesi için oldukça sık kullanılmaktadır [129].

16S rRNA dizi analizinin tür ya da cins seviyesinde bilinmeyen bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılması için kesin bir yöntem olduğu düşünülmektedir [130].

Bacillus cereus' un tanımlanması ve *B. cereus* ile yakın olan türlerin ayrımı biyokimyasal testler ile yapılmaktadır. Ancak *B. cereus* ve *B. thuringiensis*' in birbirinden ayrımı biyokimyasal testler ile tam olarak yapılamamaktadır. Bu nedenle *B. cereus* ve *B. thuringiensis*' in 16S rRNA' larının değişken bölgelerine göre özel DNA probları oluşturulmuştur. Bu problemlerin kullanılması ile yapılan analizler sonucunda biyokimyasal testlerle *B. cereus* olarak tanımlanan türlerin gerçekte *B. thuringiensis* olduğu anlaşılmıştır [67].

B. thuringiensis' in 16S rRNA geninden oluşturulan DNA probları *L. cuprina*' ya karşı larvisidal aktivite gösteren *B. thuringiensis* suşları arasındaki farklılıkları belirlemek için kullanılmıştır [131].

16S rRNA' dan oluşturulan DNA probları *Staphylococcus*, *Listeria* ve *Legionella* türlerinin tanımlanması [132,133], karışık mikrobiyal populasyonların analizi [134] ve anaerobik siliatlardan endosimbiyotik sülfat indirgeyici bakterilerin tanımlanması gibi birçok çalışmada kullanılabilmektedir [135].

Çalışmamızda asetat zenginleştirme metodu ile topraktan izole edilen ve faz kontrast mikroskobu ile yapılan inceleme sonucunda parasporal kristal yapılar taşıdıkları belirlenen toplam 8 izolatin tanımlanmaları 16S rRNA dizi analizi ile yapılmıştır (Bkz. Çizelge 4.2). Gen bankasındaki kayıtlı 16S rRNA dizileri ile yapılan karşılaştırma sonucunda FÖ21 izolatinın *Bacillus thuringiensis* 2000031508 (AY138286.1) ile FÖ7 izolatinın *Bacillus thuringiensis* 2000032755 (AY138282.1)

ile ve FÖ8 izolatının *Bacillus thuringiensis* 2000031485 (AY138289.1) suşu ile % 99 oranında benzer oldukları belirlenmiştir.

FÖ16 izolatının *Bacillaceae* familyasından kültüre edilmemiş bakteri klonu 8F345r (AY387385.1) ile %94 oranında, FÖ19 izolatının ise *Bacillus* sp. H-09 (AY461750.1) suşu ile %100 oranında benzer olduğu bulunmuştur.

Bacillus thuringiensis suşlarının dışında 16S rRNA dizi analizi ile FÖ18 ve FÖ14 numaralı iki izolat *B. megaterium* ve FÖ15 numaralı bir izolat ise *B. cereus* olarak tanımlanmıştır. FÖ18 nolu izolatın *Bacillus megaterium* SAFN-040 (AY167803.1) suşu ile arasında bir nükleotid bakımından farklılık olduğu ve %99 oranında benzer olduğu belirlenmiştir. FÖ14 nolu izolatın da *Bacillus megaterium* SAFN-040 suşu (AY167803.1) ile %100 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir.

API test kitleri ve 16S rRNA dizi analizi ile *Bacillus* cinsine ait toplam 60 bakteri izolatının tanımlanması yapılmıştır.

Toplam hücre proteininin, SDS-PAGE analizi ile protein yapısındaki farkların belirlenerek, tür içi ve türler arası benzerlik ve farklılıkları ortaya konmasının mümkün olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda mikroorganizmaların sınıflandırılmasında, özellikle aynı türler veya alt türlere ait suşların hücresel proteinlerinin karşılaştırılması ve ayrımı için duyarlı bir teknik olan protein jel elektroforezinin kullanılabileceği belirtilmiştir [46, 48-50].

Protein elektroforezi çoğu bakteri taksonlarının tanımlanması için oldukça önemlidir. Bakteri genomunun nükleotid baz dizisinin tamamlanmasından sonra, hücrede ikinci seviyedeki bilgi hücresel proteinler tarafından elde edilir. Elektroforezin farklı tipleri kullanılarak tür seviyesindeki yakınlıklar açıklanabilir [136].

Bakterilerin SDS-PAGE yöntemi ile analiz edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profillerinin DNA-DNA hibridizasyon sonuçları ile yakından ilgili olduğu

gözlenmiş ve bakterilerin hızlı bir şekilde tanımlanması için uygun olabileceği düşünülmüştür [137,138].

Birçok çalışmada *Bacillus* cinsine ait suşların diğer bakteri cinslerinden çok daha fazla fenotipik olarak heterojenite gösterdikleri belirlenmiştir.

Yılmaz, topraktan izole edilen toplam 29 adet *Bacillus* suşunun SDS-PAGE yöntemi ile elde edilen protein profillerini karşılaştırarak suşların benzerliklerini ve farklılıklarını belirlemeye çalışmıştır. Yapılan çalışmada *Bacillus* türlerinin protein profili yönünden oldukça heterojen bir yapı gösterdikleri belirlenmiştir [31].

Bazı araştırmacılar SDS-PAGE ile elde edilen protein profillerinin çeşitli bilgisayar programları ile analiz edilmesinin, bakteriler arasındaki filogenetik ilişkinin açıklanması için etkili bir yaklaşım olabileceğini bildirmişlerdir [139, 140].

Berber ve Yenidünya, beş referans *Bacillus* suşu ile Van Gölü suyu ve çevresindeki topraklardan izole edilen toplam 17 yerel alkalofilik *Bacillus* izolatını fenotipik özellikleri ve SDS-PAGE ile elde edilen hücre dışı protein profillerine göre tanımlamışlardır. Hücre dışı protein profil sonuçları esas alınarak yapılan nümerik analizle, yerel izolatlar ve referans *B. megaterium*’ u içeren benzerlik seviyesi %69 ve %100 arasında değişen dört grup ve benzerlik seviyesi %70’ in üzerinde diğer referans *Bacillus* türlerini içeren bir grup olmak üzere beş ayrı grup ortaya konulmuştur. Yapılan bu çalışma ile SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen hücre dışı protein profillerinin yerel alkalofilik *Bacillus* izolatlarının ve diğer *Bacillus* türlerinin taksonomik ilişkilerinin incelenmesinde etkili bir yaklaşım sağladığı gösterilmiştir [141].

Toprak, bitki ve su gibi farklı kaynaklardan izole edilen yedi adet *B. thuringiensis* izolatı ve beş adet kontrol *B. thuringiensis* suşları arasındaki benzerlikler RAPD DNA markırlar kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışmada, Jaccard’s benzerlik indeksine göre izolatlar arasında %67,5 oranında benzerlik olduğu

belirlenmiştir. Oluşturulan dendrogramda kontrol suşları ile yerel izolatların farklı gruplarda yer aldığı tespit edilmiştir [142].

Çalışmamızda tanımlanan izolatların SDS-PAGE ile toplam hücre protein profilleri analiz edilmiş ve elde edilen protein bantlarındaki farklılıklar POPGEN istatistik programında değerlendirilerek bireyler arasındaki genetik uzaklıklar UPGMA (unweighted pair group methods) metodu ile hesaplanmıştır (Bkz. Çizelge 4.7). İzolatların protein profilleri arasındaki benzerlikler ve farklılıklar kullanılarak TREEWIEV bilgisayar programında filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogramlar oluşturulmuştur (Bkz. Şekil 4.1). Oluşturulan dendrograma göre *Bacillus* türleri iki ana grupta toplanmışlardır.

Birinci ana grupta *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* türlerine ait izolatlar ve kontrol *B. thuringiensis* suşları yer almıştır. Birinci ana grupta yer alan bakteri türleri arasındaki genetik uzaklıkların % 1 ile % 79 arasında değiştiği belirlenmiştir. Grupta yer alan izolatların protein profili yönünden benzerlik gösterdikleri, 73 ve 46 kDa ağırlığında iki protein bandının bütün izolatlar da bulunduğu belirlenmiştir. *B. thuringiensis* FÖ21, FÖ7 ve FÖ8 izolatlarının protein profili yönünden benzer oldukları ancak bazı bantlar bakımından aralarında farklılık olduğu görülmüştür. *B. thuringiensis* FÖ7 ve FÖ8 izolatlarının *B. thuringiensis* FÖ21 izolatına olan genetik uzaklıkları da sırasıyla % 26 ve % 33 olarak belirlenmiştir.

B. thuringiensis FÖ16 ve FÖ19 izolatları protein profili yönünden *B. thuringiensis* FÖ21 izolatı ile karşılaştırıldığında aralarında farklılık olmadığı ve protein profili bakımından izolatların aynı olduğu görülmüştür. İki izolatın *B. thuringiensis* FÖ21 izolatına olan genetik uzaklıklara ise % 58 olarak hesaplanmıştır.

Bacillus thuringiensis izolatlarının kontrol suşları ile protein profili bakımından karşılaştırılması sonucunda protein bantları bakımından benzer oldukları, ancak bazı bantlar yönünden de farklılıklar gösterdikleri belirlenmiştir. *Bacillus thuringiensis* olarak tanımlanan FÖ21 izolatının kontrol suşlarından *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 ve *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 ile protein profili

yönünden benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu izolatın *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 suşuna olan genetik uzaklığı % 35, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 suşuna olan genetik uzaklığı ise % 8 olarak hesaplanmıştır.

İkinci ana grupta ise *Bacillus* cinsine ait *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. firmus*, *B. brevis*, *B. laterosporus*, *B. sphaericus*, *B. pumilus*, *B. circulans* olarak tanımlanan diğer türler yer almaktadır. İkinci ana grupta yer alan izolatların genetik uzaklıkları ise %4 ile %95 arasında olduğu belirlenmiştir. Grupta yer alan bakteri türlerinin protein profili yönünden oldukça heterojen bir dağılım gösterdikleri belirlenmiştir. Türlerin kendi içerisinde bazı bantlar yönünden benzerlik göstermelerine rağmen farklı protein yapılarına sahip oldukları belirlenmiştir.

Çalışmamızda izolatlar arasında benzer elektroforetik görünüm olmasına rağmen, türler arasında farklılıkların bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı türe ait izolatların birbirine benzer elektroforetik bir yapı göstermelerine rağmen, izolatlar arasında ayrılıkların da olabildiği, ancak türlerin birbirinden ayrıldıkları görülmüştür.

Bacillus cinsi bakterilerde plazmit DNA izolasyonu ve teşhisine dayalı çalışmalara olan ilgi artmaktadır. Birçok *Bacillus* türünde plazmit DNA araştırılmıştır. Özellikle bazı *Bacillus* suşlarının antibiyotiklere direnç özelliği taşıyan plazmitler bulundurması, rekombinant DNA çalışmalarında vektör olarak kullanılabilmeleri şansını artırmış ve birçok çalışma için aranan türler olmalarına neden olmuştur [34, 43].

Genelde *Bacillus* türlerinin içerdiği plazmitlerin kriptik plazmitler olduğu belirtilmiş olmasına rağmen [34,43], *B. thuringiensis*' in bir plazmitinin insektisidal kristal protein üretimiyle ilgili olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir [143-145]. Bazı türlerin ise plazmit DNA kaynaklı antibiyotik direnç geni taşıdıkları ve bu türler arasında yer alan *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* ve *B. subtilis* türlerinin tetrasiklin antibiyotiğine, *B. sphaericus*' un kloramfenikol antibiyotiğine [38] ve yine *B. subtilis*' in eritromisine dirençli olma özelliği

taşıdıkları tespit edilmiştir [43]. Bunların yanı sıra, *B. megaterium*' un ürettiği megasin A gibi bazı bakteriyosinlerin [146] ve *B. amyloliquefaciens*' in alfa amilaz enziminin üretiminde olduğu gibi bazı farklı metabolik aktivitelerin de plazmit DNA ile kontrol edildiği bildirilmektedir [147].

Yoshimura ve arkadaşları, 111 adet *Bacillus* suşunun plazmit DNA' larını sezyum klorür-etidyum bromür denge santrifügasyon metoduna göre izole etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda yalnızca suşların 13 tanesinde plazmit DNA bulunduğu ve büyüklüklerinin de 2,8 ile 45,2 Md arasında değiştiği belirlenmiştir [43].

Omboui ve arkadaşları, süttten izole ettikleri toplam 72 adet *B. cereus* izolatının antibiyotik dirençlilik ve plazmit DNA profillerini araştırdıkları çalışmalarında, izolatların % 72' sinde sayıları 1 ile 5, büyüklükleri ise 0,1- 60 Md arasında değişen plazmit DNA' ya rastlamışlardır. Araştırmacılar tüm suşların ampisilin antibiyotigine dirençli olduğunu ancak bunun plazmit DNA ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir [148].

Çelebi ve arkadaşlarının üropatojen *E. coli* suşlarının antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu direncin plazmit DNA ile olan ilgisi üzerine yaptıkları çalışmada, *E. coli* suşlarının sayıları 1 ile 10 arasında değişen, 1- 24 kb büyüklüğünde plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir. Ancak plazmit DNA varlığı ile antibiyotik dirençlilik arasında bir bağlantı olmadığını belirtmişlerdir. [149].

Çalışmamızda toplam 67 *Bacillus* suşunun 64 tanesinde plazmit DNA tespit edilmiş, 3 tanesinde ise plazmit DNA' ya rastlanmamıştır (Bkz. Çizelge 4.8, Resim 4.6–4.10). İzolatların taşıdığı plazmit sayısı 1–9 arasında bulunmuştur. Plazmit DNA' ların büyüklükleri λ -pUC mix-Markır 4 ile karşılaştırılarak hesaplanmış ve plazmit DNA büyüklüklerinin yaklaşık olarak >19,3 kb ile 1,1 kb arasında olduğu belirlenmiştir.

B. cereus türüne ait izolatlarının sayıları 1-5, büyüklükleri yaklaşık >19,3 kb ve 1,2 kb arasında olan plazmit DNA taşıdıkları belirlenmiştir. *B. anthracis* olarak

tanımlanan FÖ25 izolatının 19,3 kb büyüklüğünde bir adet plazmit DNA taşıdığı belirlenmiştir. *B. megaterium* olarak tanımlanan izolatların >19,3 ve 19,3 kb büyüklüğünde iki plazmit DNA'ya sahip oldukları, ancak FÖ18 nolu izolatın plazmit DNA taşımadığı görülmüştür. *B. pumilus* izolatlarının sayıları 2–3 arasında değişen >19,3 kb ve 6,1 kb büyüklüğünde plazmit DNA'ya sahip oldukları, FÖ23 numaralı *B. pumilus* izolatının ise plazmit DNA taşımadığı belirlenmiştir. *B. sphaericus* izolatlarının >19,3, 19,3 ve 1,1 kb büyüklüklerinde sayıları 1–2 arasında değişen plazmit DNA'lara sahip oldukları tespit edilmiştir. *B. brevis* izolatlarında sayıları 1–5, büyüklükleri >19,3 kb ile 1,1 kb arasında değişen plazmit DNA'lar belirlenmiştir. *B. subtilis*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. firmus* ve *B. circulans* izolatlarının 19,3 kb büyüklüğünde birer adet plazmit DNA taşıdıkları tespit edilmiştir.

Bacillus thuringiensis türlerinin halkasal ve lineer yapıda çeşitli plazmit DNA taşıdıkları ve *cry* genlerin bu plazmitler üzerinde bulunduğu bilinmektedir [150].

Clark ve arkadaşları, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* suşunda, hücre içi kristal protein üretimi ile ilgili olduğunu bildirdikleri 108 kb büyüklüğündeki bir plazmit DNA izole ettiklerini rapor etmişlerdir [144]. Jaoua ve arkadaşları ise, *Bacillus*'lar da hücre içi kristal proteinini kodlayan genlerin 30 Md'dan büyük olduğunu bildirmişlerdir [145]. Himeno ve arkadaşları da, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'de delta endotoksin proteini ile ilişkili 72 Md büyüklüğünde bir plazmit ve 4- 4,4 Md büyüklüğünde küçük plazmitlerin bulunabileceğini bildirmişlerdir [151].

B. thuringiensis subsp. *thuringiensis* suşunun 12 ile 16 molekülden oluşan, 3,6- 5,3- 6,8 ve 8,3 Md büyüklüğünde 4 büyük ve 1 ile 3 molekülden oluşan, 2,0- 10,7- 12,5- 13,4- 28,2- 29,6 ve 33,0 Md büyüklüğünde 7 küçük plazmit DNA olmak üzere toplam 11 adet plazmit DNA'ya sahip olduğu belirlenmiştir. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* suşunda 2,4- 5,0- 6,3 ve 10,3 Md büyüklüğünde, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* suşunda ise 5,6- 6,6- 8,0 ve 15,2 Md büyüklüğünde 4 plazmit DNA bulunduğu tespit edilmiştir [43].

Arjantin’ de topraktan izole edilen *B. thuringiensis* INTA 51-3 suşunda 4,9- 9,6- 30 ve 40 Md büyüklüğünde dört plazmit DNA’ nın bulunduğu ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1’ in plazmit DNA’ ları ile benzer oldukları belirlenmiştir [152].

Apaydın ve arkadaşları, Türkiye’ nin Orta Anadolu ve Akdeniz Bölgesinin tarım alanlarından izole ettikleri *B. thuringiensis* suşlarında 15 kb büyüklüğünde büyük bir plazmit DNA’ nın bulunduğunu ve bazı izolatların ise 15 kb ile 22 kb arasında değişen büyüklüklerde plazmit DNA taşıdıklarını tespit etmişlerdir [78].

Çalışmamızda *Bacillus thuringiensis* türlerine ait kontrol suşlarının ve izolatların taşıdıkları plazmit DNA’ lar tespit edilmiştir (Bkz. Resim 4. 10). *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 suşunun 19,3- 5,5- 4,5 ve 1,2 kb büyüklüğünde 4 adet, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 suşunun 19,3- 11,3- 5,5 ve 4,7 kb büyüklüğünde 4 adet, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-125 suşunun 19,3- 11,3- 6,6 ve 5 kb büyüklüğünde 4 adet, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-137 19,3- 6,6 ve 4,2 kb büyüklüğünde 3 adet, *B. thuringiensis* 916, *B. thuringiensis* RSKK380 ve *B. thuringiensis* Mu4 suşlarının ise 19,3 kb büyüklüğünde 1 adet plazmit DNA taşıdığı belirlenmiştir.

B. thuringiensis olarak tanımlanan FÖ21 izolatının 19,3- 5,5- 4,5 ve 1,2 kb büyüklüğünde 4 adet plazmit DNA taşıdığı ve kontrol suşlarından *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 ile plazmit DNA profili yönünden aynı olduğu belirlenmiştir. *B. thuringiensis* FÖ7 ve FÖ8 izolatlarında ise 19,3 büyüklüğünde bir adet plazmit DNA, *B. thuringiensis* FÖ16 ve FÖ19 izolatlarında ise 19,3- 11,8- 5,5 ve 1,2 kb büyüklüğünde 4 adet plazmit DNA tespit edilmiştir.

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde tarım alanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olan zararlı böcekler ile mücadele kullanılan kimyasal ilaçların ekosistemde meydana getirmiş olduğu zararlı etkiler nedeniyle alternatif yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerin en önemlisi de biyolojik mücadeledir. Biyolojik mücadelede bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar ve protozoa grubuna ait organizmalar biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Bunlar

arasında, toprak grubu bakteriler en çok gelecek vaat eden biyolojik kontrol ajanlarıdır. Özellikle *Bacillus* grubu bakteriler önemli bir yer teşkil ederler. Biyolojik mücadelede kullanılan mikroorganizmaların %90'nını *Bacillus thuringiensis* oluşturmaktadır.

Çalışmada topraktan asetat zenginleştirme metodu ile izole edilerek 16S rRNA dizi analizi sonucunda *B. thuringiensis* olarak tanımlanan türlerin biyoinsektisit özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

B. thuringiensis' in insektisidal aktivitesinin, sporulasyon sırasında parasporal kristal formda proteinleri sentezleyebilme yeteneğinden dolayı olduğu bildirilmiştir. Bu kristal proteinler plazmit DNA üzerinde yerleşen *cry* genleri tarafından sentezlenmektedir. *cry* gen çeşitlerinin insektisidal aktivite ile ilgili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu yüzden bir *B. thuringiensis* suşunun *cry* gen içeriğinin tanımlanması o suşun insektisidal potansiyelinin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Son on yıldan bu yana *B. thuringiensis* izolatlarının *cry* gen içeriklerinin belirlenmesi için PZR'a dayalı yöntemler kullanılmaktadır [153- 155].

İlk olarak Carozzi ve arkadaşları, *cry1Ab*, *cry3A* ve *cry4A* genlerinden oluşturulan primerler kullanılarak PZR reaksiyonu ile 28 adet izolatın, biyolojik aktivite ve amplifikasyon ürün profiline göre toksisitelerini belirlemiştir [66].

Ceron ve arkadaşları, Meksika' da topraktan izole edilen 11 adet *B. thuringiensis* izolatının PZR metodu ile *cry1* genlerini analiz etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda izolatların çoğunun *cryIA(a)*, *cryIA(b)* ve *cryIA(c)* genlerini taşıdıklarını tespit edilmiştir [156].

Bravo ve arkadaşları, 503 toprak örneğinden izole ettikleri toplam 496 *B. thuringiensis* izolatlarını *cry1*, *cry3*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cry12*, *cry13*, *cry14*, *cry21* ve *cyt* genlerini belirlemek için genel ve özel primerler kullanarak PZR ile analiz etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda izolatların % 49,5' nin *cry1*, % 21,7' sinin *cry3*, % 7,9' unun *cry11* ve *cyt* geni taşıdıklarını, *cry7*, *cry8* ve *cry9*

genlerinin çok nadir olarak bulunduğunu ve *cry5*, *cry12*, *cry13*, *cry14* ve *cry21* genlerinin ise hiçbir izolatta bulunmadığını belirlemişlerdir [120].

Latin Amerika ülkelerinden izole edilen *B. thuringiensis* izolatlarının sivrisineklere karşı toksik etki gösteren proteinleri sentezleyen *cry* ve *cyt* genleri *cyt1*, *cyt2*, *cry2*, *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cry17*, *cry19*, *cry24*, *cry25*, *cry27*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cry39* ve *cry40* genlerine özgü primerler kullanılarak analiz edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda LBIT315, LBIT348 ve IB604 numaralı izolatların *A. aegypti* ve *C. quinquefasciatus* larvalarına karşı *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* suşundan üç kata daha fazla toksik etki gösterdiği ve izolatların *cry4A*, *cry4B*, *cry11*, *cyt1* ve *cyt2* genlerini taşıdıkları belirlenmiştir [157].

Bobrowski ve arkadaşları, *A. gemmatilis* (Lepidoptera:Noctuidae) larvalarına karşı % 90 oranında toksik etki gösterdiğini belirledikleri *B. thuringiensis* izolatlarının *cry1* genlerini genel primerler (CJI-1, CJI-2) kullanarak PZR ile analiz etmişler ve çalışma sonucunda toksik etki gösteren izolatların 280 bp büyüklüğünde pozitif bir ürün verdiklerini, toksik etki göstermeyen izolatların ise hiçbir ürün vermediklerini ya da 200-900 bp büyüklüğünde ürünler meydana getirdiklerini tespit etmişlerdir [158].

Çalışmamızda *Bacillus thuringiensis* izolatlarının ve kontrol suşlarının *cry* gen analizleri *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry7*, *cry8*, *cry5*, *cry12*, *cry14*, *cry21* ve *cyt1* genleri için oluşturulmuş genel primerler (Bkz. Çizelge 3.1) kullanılarak PZR ile belirlenmiştir.

Bacillus thuringiensis olarak tanımlanan FÖ21 izolatının *cry1* genel primeri ile yapılan PZR sonucunda yaklaşık olarak 272 bp' lik bir PZR ürünü verdiği tespit edilmiştir (Bkz. Resim 4.11.). Kontrol suşlarından *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 ve *B. thuringiensis* 916'nın *cry1* genel primeri ile yaklaşık olarak 272 bp' lik, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* suşlarının ise *cry1* genel primeri ile yaklaşık olarak 290 bp' lik bir PZR ürünü

verdikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 suşunun 272 bp' lik PCR ürünü ile *cry1A* genlerini, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 suşunun *cry1Ac*, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 suşunun *cry1Aa*, *cry1C* ve *cry1D* genlerini, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 suşunun ise 290 bp'lik PCR ürünü ile *cry1E* genlerini taşıdıkları belirlenmiştir. FÖ21 izolatında kontrol grubu ile yapılan karşılaştırma sonucunda 272 bp' lik PZR ürünü ile *cry1A* genlerini ihtiva ettikleri düşünülmektedir. *B. thuringiensis* RSKK380 ve *B. thuringiensis* Mu4 suşlarında *cryI* genel primeri ile hiçbir amplifikasyon gözlenmemiştir.

B. cereus izolatlarının *cryI* primeri ile yapılan analizi sonucunda FÖ24 izolatının yaklaşık olarak 410 bp'lik bir PZR ürünü verdiği tespit edilmiştir (Bkz. Resim 4.11.). Diğer *B. cereus* izolatlarında *cryI* primeri ile pozitif reaksiyon gözlenmemiştir.

Wang ve arkadaşları tarafından Çin'in farklı ekolojik bölgelerinden izole edilen *B. thuringiensis* izolatları, yeni *cry* genlerinin belirlenmesi ve *cry* genlerinin çeşitliliği ve dağılımının belirlenmesi için analiz edilmiştir. Bu çalışmaya göre izolatların % 76,5' inin *cry1* tipi, % 70' nin *cry2* tipi ve % 15,5' inin *cry9* tipi gen taşıdıklarını belirlemişlerdir. Yeni *cry1* ve *cry2* genlerinin belirlenmesi için *AluI* ve *Sau3AI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile RFLP analizine göre yeni bir *cry1A* tipi gen belirlemişlerdir [159].

Arjantin'in farklı kaynaklarında izole edilen *B. thuringiensis* suşlarının *cry2* genlerinin tanımlanması için PCR-RFLP metodu kullanılmıştır. Çalışma sonucunda *cry2Aa*, *cry2Aa/cry2Ab* ve *cry2Ab* olmak üzere 3 farklı *cry2* gen profili belirlenmiştir [118].

Çalışmamızda *cry2* primeri ile yapılan PZR işlemi sonucunda FÖ16, FÖ19 ve FÖ21 izolatlarının yaklaşık 1556 bp büyüklüğünde pozitif bir ürün verdiği belirlenmiştir (Bkz. Resim 4.12). Elde edilen sonuca göre 16S rRNA dizi analizine göre kültüre edilmemiş bakteri klonu 8F345r (AY387385.1) suşuna % 94 oranında benzerlik

gösteren FÖ16 izolatının ve *Bacillus* sp. H-09 (AY461750.1) suşu ile % 100 oranında benzerlik gösteren FÖ19 izolatının *Bacillus thuringiensis* olduğu kesin olarak belirlenmiştir.

cry2 gen profilini belirlemek için *cry2* genel primeri ile pozitif sonuç veren PZR ürünleri *DdeI* (Genmark) restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek restriksiyon parça uzunluk polimorfizimleri belirlenmiştir. *DdeI* enzimi ile kesim sonucunda *B. thuringiensis* FÖ16, FÖ19 ve FÖ21 izolatlarında 1386, 972, 450, 134 bp büyüklüğünde dört DNA fragmenti olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Resim 4.13). Literatür ile yapılan karşılaştırma sonucunda 134, 450, 972 bp büyüklüğündeki DNA fragmentlerinin *Cry2Aa* proteinini kodlayan *cry2Aa* genini, 1386 ve 134 bp büyüklüğünde DNA fragmentlerinin ise *Cry2Ab* proteini kodlayan *cry2Ab* genini kodladığı belirlenmiştir. Kontrol *B. thuringiensis* izolatlarının da *DdeI* enzimi ile RFLP analizi sonucunda doğal izolatlarla aynı büyüklükte DNA fragmentleri meydana getirdikleri belirlenmiştir. Yapılan restriksiyon analizi sonucunda *B. thuringiensis* FÖ16, FÖ19, FÖ21 izolatlarının ve kontrol suşlarının *cry2Aa* ve *cry2Ab* genlerini birlikte taşıdıkları ve *cry2* gen profillerinin *cry2Aa/cry2Ab* olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda *cry3*, *cry4*, *cry7*, *cry8*, *cry5*, *cry12*, *cry14*, *cry21* ve *cyt1A* genlerine ait genel primerlerle yapılan PZR işlemi sonucunda *B. thuringiensis* izolatlarının ve kontrol suşlarının hiçbirinde pozitif sonuç elde edilememiştir.

Bacillus thuringiensis suşlarının *cry1* genlerinin 130–160 kDa ağırlığında Lepidoptera larvaları üzerinde toksik etki gösteren, *cry2* genlerinin 65 kDa ağırlığında proteinler sentezledikleri ve *Cry2A* proteinlerinin hem Lepidoptera hem de Diptera larvalarına karşı, *Cry2B* proteinlerinin ise sadece Lepidoptera larvaları üzerinde toksik etki gösterdikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [81,160, 161].

Yapılan çalışmada kristal gen içerikleri belirlenen *Bacillus thuringiensis* izolatlarının ve kontrol suşlarının *cry* genleri tarafında sentezlenen insektisidal kristal proteinleri SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen bantların

Protein markır ile karşılaştırması sonucunda *cry1* ve *cry2* geni taşıyan *B. thuringiensis* FÖ21, FÖ16 ve FÖ19 izolatlarının yaklaşık olarak 130 kDa ve 65 kDa büyüklüğünde iki protein bandına sahip oldukları belirlenmiştir. Kontrol suşlarının SDS-PAGE ile analizi sonucunda *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73, *B. thuringiensis* 916' ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* suşlarında da yaklaşık olarak büyüklüğü 130 kDa ve 65 kDa ağırlığındaki iki protein bandının, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125' de ise 130 kDa ağırlığında bir protein bandının olduğu tespit edilmiştir. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-137 suşunda ise yaklaşık olarak 130 kDa, 66 kDa ve 27 kDa ağırlığında üç protein bandının olduğu belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda 130kDa ağırlığındaki proteinin *cry1* geni, 65 kDa ağırlığındaki proteinin ise *cry2* geni tarafından sentezlendiği tespit edilmiştir.

Bacillus thuringiensis suşlarının insektisidal aktiviteleri çoğunlukla Cry proteinlerine ve böcek çeşidine göre değişmektedir. *B. thuringiensis*' in doğal izolatları Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera ve Acari gibi farklı böcek takımlarına karşı biyolojik pestisit olarak kullanılmaktadır [162]. İlave olarak *B. thuringiensis*' in bazı suşlarının nematodlar ve protozoalara karşı toksik olabileceği de yapılan çalışmalarla bildirilmiştir [163].

Çalışmamızda *Bacillus thuringiensis* izolatlarının biyolojik aktiviteleri Lepidoptera takımına ait *Ephestia kuehniella* ve Coleoptera takımına ait *Trogoderma granarium* türlerinin 3. dönem larvaları üzerinde yapılan denemelerle belirlenmeye çalışılmıştır. Denemeler üçlü tekrar grupları şeklinde nemi 70 ± 5 , sıcaklığı $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ve foto periyodu 16:8 (ışık: karanlık) olan yetiştirme odalarında yedi gün süresince yapılmıştır. Larvalar üzerinde yapılan deneme sonuçları kontrol suşları ile karşılaştırılarak her bir izolat için ve LC_{50} ve LC_{99} değerleri Probit analizi ile (Bkz. Çizelge 4.10), ölüm oranları ise Abbot's eşitliği ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.2).

Yapılan çalışma sonucunda *B. thuringiensis* FÖ21 izolatının Lepidoptera takımına ait *Ephestia kuehniella* larvaları için LC_{50} değeri 1,08 spor-kristal kons./ml ve LC_{99} değeri 4,06 spor-kristal kons./ml olarak hesaplanmıştır. Larvalar üzerinde % 83

oranında etkili olduğu belirlenmiştir. *B. thuringiensis* FÖ19 izolatının *E. kuehniella* larvaları için değeri 1,48 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 4,58 spor-kristal kons./ml olarak hesaplanmıştır. Larvalar üzerinde % 80 oranında etkili olduğu belirlenmiştir. *B. thuringiensis* FÖ16 izolatının *E. kuehniella* larvaları için LC₅₀ değeri 2,17 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 6,56 spor-kristal kons./ml olarak hesaplanmıştır. *B. thuringiensis* FÖ16 izolatının larvalar üzerinde % 57 oranında etkili olduğu belirlenmiştir. *B. cereus* FÖ24 izolatının *E. kuehniella* larvaları için LC₅₀ değeri 7,83 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 19,00 spor-kristal kons./ml olarak hesaplanmıştır. Abbot's formülüne göre yapılan hesaplama sonucunda *B. cereus* FÖ24 izolatının larvalar üzerinde % 13 oranında etkili olduğu belirlenmiştir. *B. thuringiensis* FÖ7 izolatının larvalar üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Sonuçlar P<0,0001 oranında istatistikî olarak anlamlı bulunmuştur.

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1 şusunun *E. kuehniella* larvaları için LC₅₀ değeri 1,83 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 5,78 spor-kristal kons./ml, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 şusunun LC₅₀ değeri 3,14 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 7,21 spor-kristal kons./ml, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 şusunun LC₅₀ değeri 2,95 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 9,36 spor-kristal kons./ml, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 şusunun LC₅₀ değeri 10,29 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 26,83 spor-kristal kons./ml, *B. thuringiensis* 916 şusunun LC₅₀ değeri 3,68 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 8,56 spor-kristal kons./ml, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* şusunun LC₅₀ değeri 3,71 spor-kristal kons./ml ve LC₉₉ değeri 9,89 spor-kristal kons./ml olarak hesaplanmıştır. *E. kuehniella* larvaları üzerine *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 şusunun %67, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 şusunun %37, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 şusunun %43, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 şusunun %13, *B. thuringiensis* 916 şusunun %30 ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* şusunun %33 oranında etkili oldukları belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre *B. thuringiensis* FÖ21 (%83) ve *B. thuringiensis* FÖ19 (%80) izolatlarının Lepidoptera larvalarına karşı kontrol grubundan daha yüksek

toksik etki gösterdiği, *B. thuringiensis* FÖ16 (%57) izolatının ise HD-1 (%67) suşundan daha az toksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Obeidat ve arkadaşları, Ürdün' ün farklı coğrafik alanlarından izole edilen *B. thuringiensis* serotiplerinin *Ephestia kuehniella* larvaları üzerine olan etkisini araştırmışlar ve bu çalışma ile serotiplerin LC₅₀ değerlerinin 5,83- 7,25 spor-kristal kons./ml arasında değiştiğini belirlemişlerdir. *B. thuringiensis* subsp. kurstaki HD-1 suşu (LC₅₀= 4.61) ile yapmış oldukları karşılaştırma ile de doğal izolatların daha düşük aktiviteye sahip olduklarını belirlemişlerdir [122]. Çalışmamız da ise doğal izolatların LC₅₀ değerleri 1,08–2,17 spor-kristal kons./ml değerleri arasında bulunmuş ve HD-1 suşu (LC₅₀= 1,83) ile yapılan karşılaştırmada ise FÖ21 ve FÖ19 izolatlarının daha yüksek aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir.

Saadoun ve arkadaşları, topraktan izole ettikleri *B. thuringiensis* izolatlarının *D. melonagaster* larvaları için LC₅₀ değerlerinin 4,60- 8,65 spor-kristal kons./ml, *C. pulex* için ise LC₅₀ değerlerinin 5,30- 6,74 spor-kristal kons./ml arasında değiştiğini rapor etmişlerdir [164].

Çalışmada *B. thuringiensis* izolatlarının ve kontrol suşlarının Coleoptera takımına ait *Trogoderma granarium* larvaları üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Çünkü bu izolatların Coleoptera takımı böcekler üzerinde etkili olan proteinleri sentezleyen *cry3*, *cry7* ve *cry8* genlerinden hiçbirini taşımadıkları yapılan PZR analizi ile tespit edilmişti.

Kore'de toprak izole edilerek tanımlaması yapılan *B. thuringiensis* K1 izolatının insektisidal aktivitesinin *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1'den çok farklı olduğu belirlenmiştir. İzolatın *Spodoptera exigua* larvalarına karşı HD-1 suşundan daha aktif ve *Plutella xylostella* larvalarına karşı ise HD-1 suşundan daha toksik olduğu rapor edilmiştir [165]. Wang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada *cry1* genleri taşıyan *B. thuringiensis* izolatlarının spor-toksin karışımlarının *Helicoverpa virescens* ve *Helicoverpa zea* larvalarına karşı %71–83 oranında etkili oldukları belirlenmiştir [159].

Kristal genleri tarafından sporulasyon sırasında sentezlenen ve hedef böcek grubu üzerinde insektisidal etki gösteren kristal proteinlerinin, hücre içerisinde farklı şekillerde bulunan inklüzyonlarda toplandığı yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Elektron ve ışık mikroskobunda yapılan çalışmalar sonucunda Cry1 proteinlerinin baklava dilimli, Cry2 proteinlerinin kübik ve baklava dilimli, Cry3 proteinlerinin düz kare ve Cry4 ve Cyt proteinlerinin ise şekilsiz ve karmaşık yapılarda bulunduğu belirlenmiştir [166] Lepidoptera takımına ait böcekler üzerinde toksik etkiye sahip olan *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* alttürü genellikle bir adet baklava dilimli ve bir adet yuvarlak yapılı kristalleri taşıırken [167], sinekler ve sivrisinekler üzerinde toksik etki gösteren *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* alttürünün ise etrafı ağ ile çevrilmiş çeşitli büyüklükte ve şekillerde fazla sayıda cisimcik taşıdıkları belirlenmiştir [168,169].

Taiwan’ da izole edilen doğal *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* A3–4 izolatının taramalı ve geçirmeli elektron mikroskobunda yapılan incelemeleri sonucunda hücre içerisinde gömülü halde bulunan tipik baklava dilimli kristal yapıların olduğu tespit edilmiştir [123].

B. thuringiensis suşlarının kristal morfolojileri, etki gösterecekleri hedef böcek grubu hakkında bilgi vermektedir [170]. Bu yüzden *B. thuringiensis* izolatlarının kristal morfolojilerini belirlemek amacıyla izolatlar sporlanma besiyerinde yetiştirilmiş ve preparatlar hazırlanarak taramalı elektron mikroskobunda incelemeler yapılmıştır. Yapılan çalışma ile *B. thuringiensis* FÖ21 izolatının baklava dilimi (bipiramidal), kübik ve yuvarlak şekilli parasporal kristal yapıları taşıdıkları belirlenmiştir (Bkz. Resim 4.16). *B. thuringiensis* FÖ21 izolatının taşıdığı olduğu *cry1* ve *cry2* genleri tarafından sentezlenen 130 kDa ve 65 kDa ağırlığındaki kristal proteinlerin bu yapılarda toplanmış olduğu tespit edilmiştir. Cry2 proteini sentezledikleri belirlenen *B. thuringiensis* FÖ16 ve FÖ19 izolatlarının da baklava dilimi, kübik ve yuvarlak şekilli parasporal kristal yapıları taşıdıkları görülmüştür.

Kontrol suşlarından *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD–1, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD–73, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD–125 ve *B. thuringiensis*

subsp. *kurstaki*' nin de üç parasporal kristal yapıyı birlikte taşıdıkları belirlenmiştir. *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-137 ve *B. thuringiensis* 916 suşlarının ise yuvarlak şekilli parasporal kristal yapılar bulundurdıkları tespit edilmiştir. Kristal morfolojilerinin hedef böcek grubu ile olan ilgisi bakımından sonuçları değerlendirdiğimizde bipramidal yapıda kristal taşıyan izolatların Lepidoptera takımı böcek grubu üzerinde etkili olduğu yapılan bu çalışma ile belirlenmiştir.

Bu çalışmada toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanmaları API test kitleri ile yapılmıştır. Tanımlanan bu türlerin birbirine olan genetik uzaklıkları toplam hücre protein profillerine göre belirlenmiştir. Toplam hücre protein analizine göre türler arasında benzer elektroforetik görünüm olmasına rağmen, farklılıkların bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı türe ait izolatların birbirine benzer elektroforetik bir yapı göstermelerine rağmen, izolatlar arasında ayrılıkların da olabildiği, ancak türlerin birbirinden ayrıldıkları görülmüştür. Türlerin plazmit DNA' ları belirlenmiş, tür içi ve türler arasında plazmit DNA farklılıkları olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca zararlı böceklerle mücadele konusunda kimyasal insektisitlere karşı alternatif bir yöntem olarak kullanılan *B. thuringiensis* türleri izole edilmiş ve tanımlanmaları 16S rRNA dizi analizi ile yapılmıştır. *cry* gen içeriklerinin ve bu genlerin ürünü olan kristal proteinlerin belirlenerek hedef böcek üzerindeki toksik etkisinin incelenmesiyle tanımlanan *B. thuringiensis* izolatlarının biyoinsektisit özellikleri belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma ile moleküler özellikleri bakımından tanımlanmış ve depo zararlısı *Ephesia kuehniella* larvaları üzerinde toksik etkisi belirlenmiş doğal üç *B. thuringiensis* izolatu elde edilmiştir. Ancak bu izolatların biyolojik kontrol ajanı olarak sahada kullanımlarının tam olarak belirlenebilmesi için ekonomik olarak önemli bitkiler ve depolanmış ürünlerde zarar meydana getiren başka böcekler üzerinde denemelerin yapılmasının daha güvenilir sonuçlar vereceği kanaatindeyiz.

Ülkemizde tarım alanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olan zararlı böceklerde patojen olan birçok bakteri bulunmaktadır. Bu bakterilerin tespit

edilmesi ve geliştirilmesi üzerine çalışmalar yoğunlaştırılmalı ve bu çalışmalar desteklenmelidir. Böyle organizmaların izole edilip geliştirilerek zararlılar ile mücadelede kullanılmasının gelecek nesilleri tehdit eden kimyasalların kullanılma oranlarını azaltacağı düşüncesindeyiz. Bu sayede zararlı böceklere karşı mücadelede kullanılabilecek insektisidal aktivitesi yüksek etkin, güvenilir ve ülkemize ait biyolojik kontrol ajanlarının oluşturulması yolunda adımlar atılmış olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bülbüloğlu Ö., “Çeşitli toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus thuringiensis*’ lerin izolasyonu, karakterizasyonu ve insektisidal etkilerinin belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, **KTU Fen Bilimleri Enstitüsü**, Trabzon, 1-11 (2000).
2. Peter, G., “Plant Pests and Their Control”, **Fenemore**, London, 45-47 (1984).
3. Ecevit, O., “Ziraî Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri”, **Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları**, Samsun, 5-8 (1988).
4. Yaman, M., Demirbağ, Z., “Biyolojik ajanların insektisidal etkilerini belirleme yöntemleri”, **Ekoloji Çevre Dergisi**, 29 (8): 11-14, (1998).
5. National Research Council, Subcommittee on Insect Pest, **Insect Pest management and Control**, Washington, 150-155 (1984).
6. Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I., Chambliss, G. H., “*Bacillus*, Topley and Wilson’s Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology”, 9nd Edition, Volume 2, by edited Collier L., Balows, A. and Susman, M., **Oxford University Press**, New York, 709-730 (1998).
7. Wipat, A., Harwood, CR., “The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium”, **FEMS Microbiology Ecology**, 28: 1-9 (1999).
8. Chang, Y. H., Shangkuan, Y. H., Lin, H. C. and Liu, H. W., “PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells”, **Applied and Environmental Microbiology**, 69 (8): 4502-4510 (2003).
9. Ayvaz, A., “Un güvesi, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae) ve yumurta parazitoidi *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera : Trichogrammatidae)’un bazı biyolojik özellikleri üzerine gamma radyasyonunun etkileri”, Doktora Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Eğitimi**, Ankara, 1-5 (2001).
10. Özgür, A. F., “Depolanmış ürün zararlıları”, **Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları**, 23: 38-40 (1990).
11. Anonymous, “Zirai Mücadele Teknik Talimatları”, Cilt: 1, **Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü**, Ankara, 393 (1995a).
12. Anonymous, “Zirai Mücadele Teknik Talimatları”, Cilt: 4, **Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü**, Ankara, 393 (1995b).

13. Öztürk, F., “Malathion ve gamma radyasyonun kırma biti (*Tribolium confusum* J. du Val.)’nin gelişim evreleri üzerine etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kayseri, 1-8 (2001).
14. Vural, N., “Toksikoloji, Çevremizde ve endüstride bulunan önemli toksik maddeler”, *Ankara Üniversitesi Basımevi*, Ankara, 344-401 (1996).
15. Smith, R. F., “Consideration on safety of certain biological agents for arthropod control”, *Bull WHO*, 48: 685-698 (1980).
16. Chattopadhyay, A., Bhatnaga, N.B. and Bhatnagar, R., “Bacterial Insecticidal Toxins”, *Critical Reviews in Microbiology*, 30 (1): 33-54 (2004).
17. Sneath, P. H. A., “Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci, Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, Volume 2, edited by PHA Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe, J.G., *Williams and Wilkins*, Holt, 1104-1139 (1986).
18. Priest F. G., “*Bacillus*, Biotechnology, Biological Fundamentals”, Vol. 1, by edited Sahm H., *Wiley-Vch Verlag GmbH*, Weinheim, 1267-1280 (1993).
19. Ishib, T., Ohba, M., “Characterization of Mosquito specific *Bacillus thuringiensis* strains coisolated from a soil population”, *Syst. Appl. Microbiol.*, 16: 494-499 (1993).
20. Young, C. S., Lethbridge, G., Shaw, L. J., Burns, R. G., “Survival of inoculated *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in nonplanted and rhizosphere soil”, *Soil Biol. Biochem*, 27 (8): 1017-1026 (1995).
21. Nicholson, W. L., Law, J. F., “Method for purification of bacterial endospores from soils: UV resistance of natural sonoran desert soil populations of *Bacillus spp.* with reference to *B. subtilis* strain 168”, *Journal of Microbiological Methods*, 35: 13-21 (1999).
22. Massle, J., Roberts, G. and White, O. J., “Selective isolation of *Bacillus sphaericus* from soil by use of acetate as major source of carbon”, *Applied and Enviromental Microbiology*, 1478-1481 (1985).
23. Burke, W. F., McDonald, K. O., Davidson, E., “Effects of UV lighth on spore viability and Mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593”, *Applied and Enviromental Polymer Degredation*, 4 (2): 91-102 (1983).
24. Chilcott, C. N. and Wigley, P. J., “Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* froms soil and insect habitats in New Zealand”, *Journal of Invertebrate Pathology*, 61: 244-247 (1993).

25. Fitz- James, P.C., Young, F.E., “Morphology Sporulation” , The Bacterial Space (editors) In Gould and Hurst, *Academic Pres*, London and New York, 39-72 (1969).
26. Bilgehan, H., “Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi”, *Barış Yayınları*, İzmir, 42-47 (1992).
27. Errington, J., “Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*”, *Nature Reviews: Microbiology*, 1: 117-127 (2003).
28. Carlson, C. R., Gronstad, A., Kolsto, A. B., “Physical maps of the genomes of three *Bacillus cereus* strains”, *Journal of Bacteriology*, 174 (11): 3750-3756 (1992).
29. McDonald W. C., Felkner, J. C., Turetsky, A., Matney, T. S., “Similarity in base composition of deoxyribonucleates from several strains of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*”, *Journal of Bacteriol.*, 85: 1071-1073 (1963).
30. Golovacheva, R. S, Loginova, L. G., Salikhow, T. A., Kolesnikov, A. A., Zaitseva, G. N., “A new thermophilic species *Bacillus thermocatenulatus* nov. spec.”, *Mikrobiologiya*, 44: 265-268 (1975).
31. Yılmaz, M., “Topraktan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolic özelliklerinin belirlenmesi, plasmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-20 (2003).
32. Woodford, N. and Johnson, A. P., “Plasmid Analysis”, Molecular Bacteriology, *Humana Pres*, New Jersey, 68-71 (1998).
33. Arda, M., “Temel Mikrobiyoloji”, *Medisan Yayınları*, Ankara, 375-389 (2000).
34. Tanaka, T., Kuroda, M. and Sakaguchi, K., “Isolation and characterization of four plasmids from *Bacillus subtilis*”, *Journal of Bacteriology*, 129 (3): 1487-1494 (1977).
35. Voskuil, M. I. and Chambliss, G. H., “Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis*”, *Applied and Enviromental Microbiology*, 59 (4): 1138-1142 (1993).
36. Ombui, J. N., Mathenge, J. M., Kimotho, A. M., Macharia, J. K. and Nduhiu, G., “Frequency of antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from milk” , *East African Medical Journal*, 73 (6): 380-384 (1996).

37. Andrup, L., Damgaard, J. and Waaermann, K., "Mobilization of small plasmids in *Bacillus subsp. israelensis* is accompanied by specific aggregation", *Journal of Bacteriology*, 175 (220): 6530-6536 (1993).
38. McDonald, K. O. and Burke, W. F., "Plasmid transformation of *Bacillus sphaericus* 1593", *Journal of General Microbiology*, 130: 203-208 (1984).
39. Parini, C., Fortina, M. G., Manachini, P. L., De Rossi, E., Riccardi, G., "Detections and characterization of naturally occurring plasmids in *Bacillus licheniformis*", *FEMS Microbiology Letters*, 5 (3): 329-334 (1991).
40. Kunnimalaiyaan, M., Stevenson, D. M., Zhou, Y., Vary, P. S., "Analysis of the replicon region and identification of an rRNA operon on pBM400 of *Bacillus megaterium* QM B1551", *Molecular Microbiology*, 39 (4): 1010-1021 (2001).
41. Dobritsa, A. P., Dobritsa, S. V., Tanyashin, V. I., "Isolation and characterization of plasmid from the *Bacillus brevis* var. G-B cells", *Molecular & General Genetics*, 164 (2): 195-204 (1978).
42. Bodorova-Urgosikova, J., Benada, O., Tich, P., "Large-scale isolation and partial characterization of plasmid DNA from *B. larvae*", *Folia Microbiologica*, 37 (2): 82-86 (1992).
43. Yoshimura, K., Yamamoto, O., Seki, T., Oshma, Y., "Distrubition of heterogenous and homologous plasmids in *Bacillus spp.*", *Applied and Enviromental Microbiology*, 46 (6): 1268-1275 (1983).
44. Chang, Y. H., Shangkuan, Y. H., Lin, H. C. and Liu, H. W., "PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells", *Applied and Enviromental Microbiology*, 69 (8): 4502-4510 (2003).
45. Tourasse, N.J., Helgason, E., Okstad, O.A., Hegna, I.K. and Kolsto A.-B., "The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics", *Journal of Applied Microbiology*, 101: 579-593 (2006).
46. Cash, P., "Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis", *Analytica Chimica Acta*, 372: 121-145 (1998).
47. Bağcı, H., Shareef, S. R. ve Özdamar. K., "*Bacillus thuringiensis* varyetelerinin sınıflandırılmasında sayısal taksonominin uygulanması", *Doğa Tr. J. of Biology*, 5: 70-81 (1991).
48. Çökmüş, C. and Younsten, A. A., "Characterization of *Bacillus sphaericus* strains by SDS-PAGE", *Journal of Invertebrate Pathology*, 64: 267-268 (1994).

49. Matar, G. M., Slieman, T. A., Nabbut, N. H., "Subtyping of *Bacillus cereus* by total cell protein patterns and arbitrary primer polymerase chain reaction", *European Journal of Epidemiology*, 12 (3): 309-314 (1996).
50. Kampf, P., "An efficient method for preparation of extracts from Gram-Positive bacteria for comparison of cellular protein patterns", *Journal of Microbiological Methods*, 21: 55-66 (1995).
51. Swiecicka, I., "Protein profile and biochemical properties of *Bacillus circulans* isolated from intestines of small free-living animals in Poland", *Folia Microbiologica*, 46(2): 165-171 (2001).
52. Berber, İ., "Characterization of *Bacillus* species by numerical analysis of their SDS-PAGE protein profiles", *Journal of Cell and Molecular Biology*, 3: 33-37 (2004).
53. Jobin, M. P., Clavel, T., Carlin, F., Schmitt, P., "Acid tolerance response is low-pH and late-stationary growth phase inducible in *Bacillus cereus* TZ415", *International Journal of Food Microbiology*, 79 (1-2): 65-73 (2002).
54. Turnbull, P. C. B., Kramer, J. and Melling, J., "Bacillus", In Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity, vol. 2, 8th ed. *Edward Arnold*, London, 188-210 (1990).
55. Drobniewski F.A., "*Bacillus cereus* and related species", *Clinical Microbiology Reviews*, 6 (4): 324-338 (1993).
56. Logan, N. A. and Berkeley, R.C.W., "Identification of *Bacillus* strains using the API system", *Journal of General Microbiology*, 130: 1871-1882 (1984).
57. Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R. and Noller, H. R., "Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids", *Microbiol. Rev.* 47: 621-669 (1983).
58. Joung K. B. and Cote J. C., "A phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars by RFLP-based ribotyping", *Journal of Applied Microbiology*, 91: 279-289 (2001).
59. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane D. J., "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology*, 91: 697-703 (1991).
60. Ash, C., Farrow, J. A., Dorsch, M., Stackebrandt, E. and Collins. M. D., "Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S ribonucleic acid", *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 343-346 (1991).

61. Sacchi, C. T., Whitney, A. M. Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R. S. and Popovic, T., "Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*", ***Emerging Infectious Diseases***, 8 (10): 1117-1123 (2002).
62. Te Giffel, M. C., Beumer, R. R., Klijn, N., Wagendorp, A. and Rombouts, F. M., "Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16S rRNA", ***FEMS Microbiol. Lett.***, 146: 47-51 (1997).
63. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", ***Science***, 239: 487-491 (1988).
64. Glare, T. R. and O'Callaghan, M., "***Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety**", ***John Wiley and Sons, Ltd.***, Chichester, New York, 1-40 (2000).
65. Zeigler, D. R., "*Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*", *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains Seventh Edition*, ***National Science Foundation***, Columbus, Ohio, 36-38 (1999).
66. Carozzi, N. B., Kramer, V. C., Warren, G. W., Evola, S. and Koziel, M. G., "Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles", ***Appl. Environ. Microbiol.***, 57: 3057-3061 (1991).
67. Akar, N., "Klinik Moleküler Patolojiye Giriş", ***Antip***, Ankara, 58-62 (1998).
68. Kuo, W. S. and Chak, K. F. "Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA", ***Appl. Environ. Microbiol.***, 62: 1369-1377 (1996).
69. The Inter Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, "Environmental Health Criteria 217-Microbial Pest Control Agent *Bacillus thuringiensis*", ***World Health Organization***, 1-125 (1999).
70. De Barjac, H., "Insect pathogens in the genus *Bacillus*", The aerobic endospore-forming bacteria: Classification and identification, ed. Berkley RCW & Goodfellow M., ***Academic Press Inc.***, New York, London, 241-250 (1981b).
71. Andrews, R. E. Jr., Faust, R. M., Wabiko, H., Raymond, K. C. and Bulla, L. A. Jr., "The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*", ***CRC Crit Rev Biotechnol***, 6: 163-232 (1987).

72. Beegle, C.C., Yamamoto, T., “History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development”, **Can. Entomol.**, 124: 587-616 (1992).
73. Carlson, C. R., Caugant, D. A., Kolsto, A. B., “Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains”, **Appl. Environ. Microbiol.**, 60: 1719-1725 (1994).
74. Gonzales, J. M. Jr., Dulmage, H. T., Carlton, B. C., “Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*”, **Plasmid**, 5: 351-365 (1981).
75. Lereclus, D., Delecluse, A., Lecadet, M. M., “Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes”, *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice, Cory, P.F., Bailey, J.S., Higgs, M.J., (eds.), **John Wiley and Sons Ltd.**, Chichester, 37-70 (1993).
76. Carlton, B., “Development of genetically improved strains of *Bacillus thuringiensis*”, Biotechnology for Crop Protection, Hadin, P., Mann, J., Hollingworth, R., (eds.), **American Chemical Society**, Washington, D.C., 260-279 (1988).
77. Mahillon, J., Resohazy, R., Hallet, B., “IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a Review”, **Genetica**, 93: 13-26 (1994).
78. Apaydin, O., Yenidunya, A. F., Harsa, S. and Gunes, H., “Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey”, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 21: 285–292 (2005).
79. Boucias D. G. and Pendland J. C., “Principles of Insect Pathology”, **Kluwer Academic Publishers**, Boston Dordrecht London, 568 (1998).
80. Tanada, Y. and Kaya H. K., “Insect Pathology”, **Academic Pres**, Inc., London, (1993).
81. Höfte, H., Whiteley, H. R., “Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*”, **Microbiol. Rev.**, 53: 242-255 (1989).
82. Gough, J. M., Kemp D. H., Akhurst R. J., Pearson, R. D., Kongsuwan, K., “Identification and characterization of proteins from *Bacillus thuringiensis* with high toxic activity against the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*”, **Journal of Invertebrate Pathology**, 90: 39–46 (2005).
83. Mohd-Salleh, M. B, Beegle, C. C. and Lewis, L. C., “Fermentation media and production of exotoxin by three varieties of *Bacillus thuringiensis*”, **J Invertebr Pathol**, 35: 75–83 (1980).

84. Levinson, B. L., Kasyan, K. J., Chiu, S. S., Currier, T. C. and Gonzales, J. M., "Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography", **J. Bacteriol.**, 172: 3172-3179 (1990).
85. Honda, T., Shiba, A., Seo, S., Yamamoto, J., Matsuyama, J. and Miwatani, T. "Identity of hemolysins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*", **FEMS Microbiol. Lett.**, 79: 205-210 (1991).
86. Matsuyama, J., Yamamoto, K., Miwatani, T., Honda, T. "Monoclonal antibody developed against a hemolysin of *Bacillus thuringiensis*", **Microbiol. Immunol.**, 39: 619-622 (1995).
87. Abdel Hameed, A. and Landen, R., "Studies on *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Swedish soils: insect toxicity and production of *B. cereus*-diarrhoeal-type enterotoxin", **World J. Microbiol. Biotech.**, 10: 406-409 (1994).
88. Damgaard, P. H., Jacobsen, C. S., and Sorensen, J., "Development and application of a primer set for specific detection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil using magnetic capture hybridization and PCR amplification", **Sys. Appl. Microbiol.**, 19: 436-441 (1996a).
89. Reddy, S. T., Kumar, N. S., Venkateswerlu, G., "Comparative analysis of intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* strains", **Biotech. Lett.**, 20: 279-281 (1998).
90. Sampson, M. N., and Gooday, G. W., "Involvement of citinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects", **Microbiol. Reading**, 144: 2189-2194 (1998).
91. Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J.A. and Koziel M. G., "Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against Lepidopteran insect", **Proc. Nat. Acad. Sc. USA**, 93: 5389- 5394 (1996).
92. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. and Dean, D. H., "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins", **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62: 775-806 (1998).
93. Kronstad, J. W. and Whiteley, H. R., "Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene", **Gene**, 43: 29-40 (1986).
94. Yamamoto, T. and McLaughlin, R. E., "Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva *Aedes taeniorhynchus*", **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 103: 414-421 (1981).

95. Widner, W. R. and Whiteley, H. R., "Two highyl related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* posses different host range specificities", *J. Bacteriol.*, 171: 965-974 (1989).
96. McPherson, S. A., Perlack, F. J., Fuchs, R. L., Marrone, P. G., Lavrik, P. B. and Fischhoff, D. A., "Characterization of the coleopteran- specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*", *Bio-Technology*, 6: 61-66 (1988).
97. Rukmini, V., Reddy, C. Y., Venkateswerlu, G., "*Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin", *Biochimie*, 82: 109–116 (2000).
98. Parker, M. W., Feil, S. C., "Pore-forming protein toxin: from structure to function", *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 88: 91-142 (2005).
99. Bravo, A., Gill, S. S., Soberon, M., "Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control", *Toxicon*, 49 (4): 423-435 (2007).
100. Visser, B., Bosch, D., Honee, G., "Domain-function studies of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins, A Genetic Approach" , *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide, Theory and Practice In Entwistle Cory, P.F., Bailey, J.S., Higgs, M.J., *Willey and Sons*, New York, Toronto, 71-88 (1993).
101. Mark, E. W., Byron, A. W., "Bt: Mode of Action and Use", *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54: 200–211 (2003).
102. Eschriche, B. B., Tabashnik, N., Finson, N., and Fere, J., "Immunochemical detection of binding of CryIA crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* in highly resistant strains of *Plutella xylostella* from Hawaii", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 212: 388-395 (1995).
103. Hoffman, C., Van der Bruggen, H., Höfte H., Van Rie J., Jansens S. and Mellaert HV., "Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midgets" , *Proc. Nat. Acad. Sci.USA*, 85: 7844-7848 (1988).
104. Van Rie J., Jansens S., Höfte H., Degheele D. and Mellaert H. V., "Receptors on the brushborder membranes of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins", *Appl. Environ. Microbial.*, 56: 1378-1385 (1990a).
105. Promdonkoy, B. and Ellar, D. J., "Structure-function relationships of a membrane pore forming toxin revealed by reversion mutagenesis", *Mol. Membr. Biol.*, 22: 327–337 (2005).

106. Butko, P., "Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses", *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (5): 2415–2422 (2003).
107. Kim, H. S., Lee, D. W., Woo, S. D., Yu, M. Y., Kang, K. S., "Distribution, serological identification, and PCR analysis *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea", *Current Microbiology*, 37: 195-200 (1998).
108. Travers, R. S., Martin, P. A. W. and Reichelderfer, C. F., "Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp.", *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1263–1266 (1987).
109. Cruikshank, R., "Medical Microbiology 11th ed.", *Livingstone*, London, 356 (1972).
110. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor*, New York, 1-25 (1989).
111. Kishore, L., Natarajan, K., Babu, L.R., "Total soluble protein and membrane lipopolysaccharide profiles in differentiating *Rhizobium* isolates", *Microbios*, 86: 143-156 (1996).
112. Esen, A., "A simple method for quantitative, semiquantitative and qualitative assay of protein", *Analytical Biochemistry*, 89: 264-273 (1978).
113. Laemli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227: 680-684 (1970).
114. Demiralp, H., Celik, S. and Koksel H., "Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing", *Eur Food Res Technol.* 211: 322-325 (2000).
115. Anderson, D. G. and McKay, L. L., "Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic *Streptococci*", *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (3): 549-552 (1983).
116. Elder, J. K. And Southern, E. M., "Measurement of DNA length by gel electrophoresis (II): comparison of methods for plating mobility of fragment length", *Analytica Biochemistry*, 170: 38-44 (1983).
117. Ceron, J., Ortiz, A., Quintero, R., Güereca, L. and Bravo, A., "Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection", *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (11): 3826-3831(1995).
118. Sauka, D. H., Cozz, J. G. and Benintende, B., "Screening of *cry2* genes in *Bacillus* isolates from Argentina", *Antonie van Leeuwenhoek*, 88: 163-165 (2005).

119. Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N. and Margalith, Y., "Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4883–4890 (1997).
120. Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., "Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection", *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (12): 4965–4972 (1998).
121. Armengol, G., Escobar, M.C., Maldonado, M.E. and Orduz, S., "Diversity of colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects", *Journal of Applied Microbiology*, 102: 77–88 (2007).
122. Obeidat, M., Hassawi, D., Ghabeish, I., "Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Jordan and their toxicity to the Lepidoptera, *Ephestia kuehniella* Zeller", *African Journal of Biotechnology* 3 (11): 622–626 (2004).
123. Feng, K. C., Liu, B. L., Chan, H. S., and Tzeng, Y. M., "Morphology of spectrum of parasporal endotoxin crystals from cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolate A3-4", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17: 119-123 (2001).
124. Suludere, Z., Kalender, Y., Çakmakçı, L., Alten, B., Ayvalı, C., Çetinkaya, G., "Türkiye'nin çeşitli yörelerinden izole edilen bazı *Bacillus sphaericus* ve *Bacillus thuringiensis* suşlarının spor ve parasporal kristallerinin elektron mikroskopuyla incelenmesi", *Doğa-Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 16: 1-14 (1992).
125. Nei, M., "Genetic distance between population", *The American Naturalist*, 949: 283-292 (1972).
126. Page, RD., "TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers", *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358 (1996).
127. Bourgoïn, C., Delecluse, A., Torre, F., Szulmajster, J., "Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and their expression", *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (2): 340-344 (1990).
128. Abbot, W. S., "A method of computing the effectiveness of an insecticide", *J. Econ. Entomol.*, 18: 265-267 (1925).

129. Rainey, F. A., Fritze, D., Stackebrandt, E., "The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis", ***FEMS Microbiol. Lett.*** 115: 205–212 (1994).
130. Siefert, J.L., Larios-Sanz, M., Nakamura, L.K., Slepecky, R.A., Paul, J.H., Moore, E.R., Fox, G.E., Jurtshuk Jr., P., "Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico", ***Curr. Microbiol.*** 41: 84–88 (2000).
131. Akhurst, R. J., Lyness, E. W., Zhang, Q. Y., Cooper, D. J. and Pinnock, D. E., "A 16S rRNA gene oligonucleotide probe for identification of *Bacillus thuringiensis* isolates from sheep fleece", ***Journal of Invertebrate Pathology***, 69: 24–31 (1997).
132. Bentley, R.W., Harland, N. M., Leigh, J. A., and Collins, M. D., "A *Staphylococcus aureus*-specific oligonucleotide probe derived from 16S rRNA gene sequences", ***Letts Appl. Microbiol.*** 16: 203–206 (1993).
133. Saunders, N.A., Harrison, T.G., Kachwalla, N. and Taylor, A.G., "Identification of species of the genus *Legionella* using a cloned rRNA gene from *Legionella pneumophila*", ***Journal of General Microbiology***, 134: 2363–2374 (1988).
134. Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., and Stahl, D. A., "Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations", ***Appl. Environ. Microbiol.***, 56: 1919–1925. (1990).
135. Fenchel, T. and Ramsing, N. B., "Identification of sulphate reducing ectosymbiotic bacteria from anaerobic ciliates using 16S rRNA binding oligonucleotide probes", ***Arch. Microbiol.***, 158: 394–397 (1992).
136. Goodfellow, M., O'Donnell, A., "Handbook of New Bacterial Systematics", ***Academic Press Limited***, London, 342–343 (1993).
137. Vauterin, L., Vantomme, R., Pot, B., "Taxonomic analysis of *Xhantomonas campestris* pv. *begonidae* and *X. campestris* pv. *pelargonii* by means of phythopathological, phenotypic, protein electrophoretic and DNA hybridization methods", ***Systematic and Applied Bacteriol.***, 13: 166–167 (1990).
138. Niemi, R. M., Niemela, S. I., Bamford, D. H., "Presumptive fecal Streptococci in environmental samples characterized by one dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis", ***App. Env. Microbiol.***, 59: 2190–96 (1993).

139. Kersters, K., "Numerical methods in the classification of bacteria by protein electrophoresis", In: Goodfellow M, Jones D, Priest FG et al. Computer Assisted Bacterial Systematic. **Academic Press.**, 337-368 (1985).
140. Costas, M., Holmes, B., Frith, K. A., "Identification and typing of *Proteus penneri* and *Proteus vulgaris* biogroups 2 and 3, from clinical sources, by computerized analysis of electrophoretic protein patterns", **J. Applied Bacteriology**, 75: 489-498 (1993).
141. Berber, İ., Yenidünya, E., "Identification of alkaliphilic *Bacillus* species isolated from lake Van and its surroundings by computerized analysis of extracellular protein profiles", **Turk J Biol**, 29: 181-188 (2005).
142. Monther, S., Hala, K.H., Luma, A.B., "Application of RAPD technique to study polymorphism among *Bacillus thuringiensis* isolates from Jordan", **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 22(12): 1307-1312 (2006).
143. Faust, R. M., Abe, K., Held, G. A., Iizuka, T., Bulla, L. A., Meyers, C. L., "Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*", **Plasmid**, 9(1): 98-103 (1983).
144. Clark, B. D., Boyle, T. M., Chu, C. and Dean, D. H., "Restriction endonuclease mapping of three plasmids from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*", **Gene**, 129: 169-171 (1985).
145. Jaoua, S., Zouari, N., Tounsi, S., Ellouz, R., "Study of endotoxins produced by three recently isolated strains of *Bacillus thuringiensis*", **FEMS Microbiology Letters**, 145: 349-354 (1996).
146. Rostas, K., Dobritsa, S. V., Dobritsa, A. P., Konez, C., Alfoldi, L., "Magacinogenic plasmid from *Bacillus megaterium* 216", **Molecular & General Genetic**, 180(2):323-329 (1980).
147. Hillier, P., Wase, D. A.J., Emery, A. N. and Solomons, G. L., "Instability of α -amylase production and morphological variation in continuous culture of *Bacillus amyloliquefaciens* is associated with plasmid loss", **Process Biochemie**, 32(1): 51-59 (1997).
148. Omboui, J. N., Mathenge, J. M., Kimotho, A. M., Macharia, J. K. and Nduhiu, G., "Frequency of antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from milk", **East African Medical Journal**, 73(6): 380-384 (1996).
149. Çelebi, A., Duran, N., Öztürk, F., Açıık, L., Aslan, G. And Aslantaş, Ö., "Identification of clinic uropathogen *Escherichia coli* isolates by antibiotic susceptibility, plasmid and whole cell protein profiles", **Advances in Molecular Biology**, 1(1): 31-40, 2007

150. Carson, C. R., Johenson, T., Lecadet, M.M. and Kolsto, A. B., "Genomic organization at the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* 1715", **Microbiology**, 142: 1625- 1635 (1996).
151. Himeno, M., Ikeda, M., Sen, K., Koyama, N., Komana, T., Yamamoto, H. and Nakayama, I., "Plasmids and insecticidal activity of delta-endotoxin crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*", **Agric. Biol. Chem.**, 49(3): 573-580 (1985).
152. Benintende G. B., Lopez-Meza, J. E., Cozzi, J. G., Piccinetti, C. F., Ibarra, J. E. "Characterization of INTA 51-3, a new atypical strain of *Bacillus thuringiensis* from Argentina", **Current Microbiology** , 41: 396–401(2000),
153. Gleave, A.P., Williams, R. and Hedges, R.J. "Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of cryV-like insecticidal protein genes and characterization of a cryV gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*", **Appl. Environ. Microbiol.**, 59: 1683-1687 (1993).
154. Chak, K.F., Chao, D.C., Tseng, M.Y., Kao, S.S., Tuan, S.J. And Feng, T.Y., "Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan", **Appl. Environ. Microbiol.**, 60: 2415-2420 (1994).
155. Ferrandis, M.D., Juarez-Perez, V.M., Frutos, R., Bel, Y. and Ferre, J., "Distribution of *cryI*, *cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain", **Syst. Appl. Microbiol.**, 22: 179-185 (1999).
156. Ceron, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L. and Bravo. A., "PCR analysis of the cry1 insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*", **Applied and Environmental Microbiology**, 60(1): 353–356 (1994).
157. Ibarra, J. E., Rincon, M. C., Orduz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., Oliveira, M. F., Lanz, H., Rodriguez, M. H., Sanchez, J., Pena, G. and Bravo, A., "Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species", **Applied and Environmental Microbiology**, 69(9): 5269–5274 (2003).
158. Bobrowski, V. L., Pasquali, G., Bodanese-Zanettini, M. H., Fiuza L. M., "Detection of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from South of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera:Noctuidae)", **Brazilian Journal of Microbiology**, 32: 105-109 (2001).
159. Wang, J., Boets, A., Rie, J. V. and Ren, G., "Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China", **Journal of Invertebrate Pathology** 82: 63–71 (2003).

160. Wider, W.R., Whitely, K.H.R., “Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities”, *J. Bacteriol.* 72: 965–974 (1990).
161. Aronson A.I., “Two faces of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins and post-exponential survival”, *Mol. Microbiol.* 7: 489–496 (1993).
162. Cannon, R.J.C., “Prospects and progress for *Bacillus thuringiensis* based pesticides”, *Pesticide Science* 37: 331–335. 1993
163. Feitelson, J.S., Payne, J. & Kim, L. “*Bacillus thuringiensis*: insects and beyond”, *Bio/Technology* 10: 271–275 (1992).
164. Saadoun, I., Al-Momani, F., Obeidat, M., Meqdam M. and Elbetieha A., “Assessment of toxic potential of local Jordanian *Bacillus thuringiensis* strains on *Drosophila melanogaster* and *Culex sp.* (Diptera)”, *Journal of Applied Microbiology*, 90: 866-872 (2001).
165. Li, M.S., Je, Y.H., Lee, I.H., Chang, J.H., Roh, J.Y., Kim, H.S., Oh, H.W., Boo, K.S., “Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* containing a new δ -endotoxin gene”, *Current Microbiology*, 45: 299–302 (2002).
166. Lopez-Meza, J. E. and Ibarra, J. E., “Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*”, *Applied and Enviromental Microbiology*, 62(4): 1306-1310 (1996).
167. Tyrell, D. J., Bulla L. A. Jr., Adreus R. E. Jr., Kramer, K. J., Davidson L. I. and Nordin, P., “Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis*”, *Journal of Bacteriology*, 145: 1052-1062 (1981).
168. Mikkola, A. R., Carlberg, G. A., Vaara, T. and Gyllenberg, H. G., “Comparison of inclusions in different *Bacillus thuringiensis* strains. An electron microscope study”, *FEMS Microbiology Letters*, 13: 401-408 (1982).
169. Abdel-Hameed, A., Lounatmaa, K., Carlberg, G. and El-Tayep, O. M., “Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt-II. Ultrastructure studies”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6: 305-312 (1990).
170. Maeda, M., Mizuki, E., Nakaramu, Y., Hatano, T. and Ohba, M., “Recovery of *Bacillus thruingiensis* from marine sediments of Japan”, *Current Microbiology*, 40: 413-422 (2000).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZTÜRK, Fatma
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1977 Kayseri
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (312) 202 12 03
 Faks : 0 (312) 212 22 79
 e-mail : fatmaozturk@gazi.edu.tr,

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi /Biyoloji Bölümü	2007
Yüksek lisans	Erciyes Üniversitesi /Biyoloji Bölümü	2001
Lisans	Erciyes Üniversitesi /Biyoloji Bölümü	1998
Lise	Kayseri Sümer Lisesi	1994

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2000–2002	Erciyes Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2002-...	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Ayvaz, A., Öztürk, F., Yaray, K. and Karahacioğlu, E. “Effects of the gamma radiations and malathion on confused flour beetle, *Tribolium confusum* J. Du Val.” Pakistan Journal of Biological Sciences, 5(5): 560-562,2002

2. Tunçbilek, A.Ş., Ayvaz, A., Öztürk F. and Kaplan, B., “Gamma radiation sensitivity of larvae and adults of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst” , Anz. Schadlingskunde/ J. Pest Science 76, 129–132, 2003
3. Aslantaş, Ö., Öztürk, F., Çelebi, A., Açıık, L., Ergün, Y., “ Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinic bovine mastitis by protein patterns, antibiotic resistance and plasmid profile”, Ankara Üniv Vet Fak Derg, 53: 47-51, 2006
4. Çelebi, A., Duran, N., Öztürk, F., Açıık, L., Aslan, G. And Aslantaş, Ö., “Identification of clinic uropathogen *Escherichia coli* isolates by antibiotic susceptibility, plasmid and whole cell protein profiles”, Advances in Molecular Biology, 1(1): 31–40, 2007

Bildiriler ve Posterler

1. Abdurrahman Ayvaz, Fatma Öztürk, Aydın Ş. Tunçbilek, “Un güvesi *Ephestia kuehniella*’ nın bazı biyolojik özelliklerinin incelenmesi ve besin çeşidinin yumurta verimi üzerine etkisi” XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, 4–7 Eylül 2002, Malatya.
2. Fatma Öztürk, Selcen Babaoğlu, Leyla Açıık, “Bakteriler Aracılığı İle Ham Petrol Ve Türevlerinin Biyodegradasyonu”, 18. Ulusal Biyokimya Kongresi, 15–19 Mayıs 2004, Trabzon.
3. Fatma Öztürk, Ayten Çelebi, Özkan Aslantaş, Leyla Açıık, Yaşar Ergün, “Subklinik mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının antibiyotik dirençliliği, toplam hücre protein ve plazmit profillerine göre tanımlanması”, XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 31 Ağustos- 2 Eylül 2005, Eskişehir.
4. Duran N, Öztürk F, Aslan G, Aslantaş Ö, Açıık L, “Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin SDS-PAGE yöntemiyle karakterizasyonu” XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji Ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 16- 20 Kasım 2005, Belek-Antalya.
5. Aslantaş Ö, Çelebi A, Öztürk F, Aslan G, Duran N, Leyla Açıık, , “Klinik üropatojen *Escherichia coli* izolatlarının plazmit ve toplam hücre proteinlerine göre karakterizasyonu” , 1. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi, 2005, İstanbul.

6. Öztürk, F., Uzunhisarcıklı, E., Babaoğlu, S., Vural, M., Açık, L., “Taxonomical relations among species of *Althaea* (Malvaceae) growing in Turkey as revealed by RAPD-PCR and SDS-PAGE” IV. Balkan Botanical Congress, 20-26th June 2006, Sofia, Bulgaria
7. Fatma Öztürk, Leyla Açık “*Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu, *cry1* Genlerinin Belirlenmesi ve *Ephestia kuehniella* Larvaları Üzerine Olan Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi”, Entomopatojenler ve Mikrobiyal Mücadele Sempozyumu, 21–24 Haziran 2007, Trabzon.