



YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEVİN GÖRMEZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAZI AĞIR METALLERİN (Zn, Cu, Mn, Al, Li) *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENIS* TÜRÜNÜN GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

**T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI AĞIR METALLERİN (Zn, Cu, Mn, Al, Li) *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR.
ISRAELENSIS TÜRÜNÜN GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

NEVİN GÖRMEZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

DOÇ. DR. MUHİTDİN YILMAZ

SİNOP ÜNİVERSİTESİ/MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ

SİNOP –2017

TEZ KABUL

Nevin Görmez tarafından hazırlanan 'Bazı ağır metallerin (Zn, Cu, Mn, Al, Li) *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* türünün gelişimi üzerine etkileri' başlıklı bu çalışma, 24.11.2017 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak, jürimiz tarafından **YÜKSEK LİSANS tezi** olarak kabul edilmiştir.

Başkan Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ
Sinop Üniversitesi/Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi

İmza

Üye Doç. Dr. İnan KAYA
Kafkas Üniversitesi/Fen Edebiyat Fakültesi

İmza

Üye Yrd. Doç. Dr. Hülya SİPAHİ
Sinop Üniversitesi/Fen Edebiyat Fakültesi

İmza

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

07 / 12 / 2017

[Unvanı, Adı ve Soyadı]
Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Turgay KORKUT
Enstitü Müdürü

ÖZET

Canlılara doğal ortamı dışında olumsuz etki eden faktörler stres etmenleri olarak bilinmektedir. Bu faktörler ekosistemin tüm parçalarını farklı şekilde etkilemektedir. Mikroorganizmalar da ekosistemin oldukça önemli bileşeni olduklarından hayat döngülerinde sık sık bu faktörlere maruz kalmaktadırlar. Bazı mikroorganizmalar insektisidal özellikleriyle dikkat çekmektedir. İnsan sağlığını yakından ilgilendiren ya da tarım zararlısı olarak bilinen böceklerle mücadelede önemli oldukları düşünülmektedir. Ancak karşılaştıkları stres durumları bu özelliklerini kaybetmelerine ya da tamamen yok olmalarına neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra, stres faktörlerine karşı geliştirdikleri adaptasyon mekanizmaları bu canlı grubuyla ilgili dikkat çekici konulardan birini oluşturmaktadır. Mikroorganizmaların adaptasyon mekanizmaları, birçok bilimsel disiplinle karşılıklı ilişki içinde olan biyoteknoloji alanında da önemli bir yere sahiptir. Biyoteknolojik çalışmalar, tarım, gıda endüstrisi, tıp ve çevre gibi geleceği yakından ilgilendiren çalışmalara ışık tutmaktadır.

Bu çalışmada etkili bir entomopatojen olan ve topraktan izole edilen *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) bakterisi kullanıldı. Topraktaki kimyasal atıkların miktarına karşı Bti'nin canlılığını devam ettirme olasılığının hesaplanması amaçlandı. Ağır metallere bakır, mangan, alüminyum, çinko ve lityum'un belirli konsantrasyonlarının (0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.5 M) bakteriye muameleleriyle 12, 24 ve 48. saat periyotlarında Bti türünün spor ve vejetatif hücre canlılığı koloni sayımlarıyla tespit edildi. Farklı kimyasallarla strese maruz bırakılan bakteri solusyonlarının belirtilen 24. ve 48. saat periyotlarında protein ağırlıkları SDS PAGE ile hesaplandı. Yine aynı şekilde her kimyasalın 24. ve 48. saat periyodunda faz-kontrast mikroskop görüntüleri incelendi. En etkili ve etkisi önemsiz olan kimyasalın mikroskop görüntü sonuçları paylaşıldı.

Elde edilen bulgularda Bti'nin spor ve vejetatif hücre canlılığını; lityum etkinliği tüm konsantrasyonlarda devamını sağlarken, mangan ve alüminyum varlığı 0.01 M dan sonra canlılığın azalmasına ve bakır ve çinko ise bakterinin tamamen canlılığını kaybetmesine sebep olduğu bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: *Bacillus thuringiensis var. israelensis*, ağır metal, bakteri stresi, biyoteknoloji, sds-page, spor canlılığı, lityum, çinko

ABSTRACT

Factors affecting the organisms outside from their natural environment are known as stress factors. These factors affect all parts of the ecosystem differently. Microorganisms are frequently exposed to these factors in their life cycle because they are a very important component of the ecosystem. Besides, the adaptation mechanisms which developed against stress factors constitute one of the remarkable issues related to this living group. Bacteria have a very important place in biotechnological studies because of these properties. Biotechnological studies shed light on studies that are closely related to the future, such as agriculture, the food industry, medicine and the environment.

In this study, the bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) an effective entomopathogen, isolated from the soil were used. It was aimed to calculate the likelihood of maintaining the effectiveness of *Bti* against the amount of chemical waste (0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.5 M) in the soil. Spore and vegetative cell viability of the *Bti* strain were determined by colony counts at 12, 24 and 48 hours with bacterial treatments of certain concentrations of heavy metals such as manganese, iron, aluminum, zinc and lithium. Protein weights were calculated by SDS PAGE at indicated periods of the bacterial solutions exposed to stress with different chemistries at 24 and 48 hours. Likewise, phase-contrast microscope views were examined for each chemical for each hour period at 24 and 48 hours.

Lithium activity in the obtained findings has found that *Bti* maintains its spore and vegetative cell viability at all concentrations, after 0.01 M, manganese and aluminium activity are losing one's viability, causing the copper and zinc bacteria to lose their full vitality.

Keywords: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, heavy metal, bacterial stress, biotechnology, SDS PAGE, spore viability, lithium, zinc

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimde yaşadığım çeşitli maddi ve manevi sıkıntılardan dolayı tez yazım aşamasında bıraktığım sürecimin devamı için bana desteğini, yardımını ve bilgisini esirgemeyen danışmanım, sayın hocam Doç. Dr. Muhitdin YILMAZ'a, laboratuvar çalışmalarında ve tez konumun belirlenmesinde yardımcı olan sayın hocam Prof. Dr. İsmet BERBER'e teşekkürlerimi sunarım.

NEVİN GÖRMEZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikroorganizmalar ve Stres	3
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Genel Özellikleri	5
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> 'in Genel Özellikleri ve Biyoteknolojik Önemi	11
2.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> 'in Gelişmesini Etkileyen Faktörler	12
2.5. Ağır Metallerin Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri	14
2.6. Ağır Metallerin <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> Üzerine Etkisi	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Bakteri Stok Spor Süspansiyonlarının Hazırlanışı	23
3.2.2. Örneklerin Yapılışı	23
3.2.3. Faz-Kontrast Mikroskopik Çalışmalar	24
3.2.4. Elektroforez İçin Örneklerin Hazırlanışı	24
3.2.5. Proteinlerin Molekül Ağırlığının Hesaplanması	24
3.2.6. Sayımların Yapılışı	24
3.2.7. İstatistik Analiz	25
4. BULGULAR	25
4.1. Faz Kontrast Mikroskopik Bulgular	25
4.1.1. LiCl ₃ 'e ait Faz Kontrast Mikroskopik Bulgular	25
4.1.2. ZnSO ₄ 'e ait Faz Kontrast Mikroskopik Bulgular	27
4. 2. SDS – PAGE Bulgular	28
4.2.1. LiCl ₃ 'e ait SDS Bulguları	28

4.2.2. ZnSO ₄ 'e ait SDS Bulguları	30
4.2.3. MnCl ₂ 'e ait SDS Bulguları	31
4.2.4. CuSO ₄ 'e ait SDS Bulguları	33
4.2.5. Al (SO ₄) ₂ 'e ait SDS Bulguları	34
4.3. Bakteri Gelişimine ait Bulgular	35
4.3.1. MnCl ₂ 'nin Bti'in Gelişmesi ve Spor Canlılığı Üzerine Etkisi	35
4.3.2. CuSO ₄ 'ın Bti'nin Gelişmesi ve Spor Canlılığı Üzerine Etkisi	38
4.3.3. LiCl ₃ Uygulanan Bti'ye ait Bakteri Gelişimi ve Sporulasyona ait Bulgular	40
4.3.4. Al (SO ₄) ₂ 'ün Bti'nin Gelişmesi ve Spor Canlılığı Üzerine Etkisi	41
4.3.5. ZnSO ₄ 'e ait Bti'nin Gelişmesi ve Spor Canlılığı Üzerine Etkisi	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
6. KAYNAKLAR	49
EKLER	61
ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ	Mikron
σ	Sigma
β	Beta
α	Alfa
γ	Gama
h	Saat
kDa	Kilodalton
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
μm	Mikrometre
rpm	Devir sayısı/dakika

Kısaltmalar

<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	Bti
SDS - PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Bti koloni görünümü (Martin, 2007)	9
Şekil 2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> bakterisinin elektron mikroskop görüntüsü (Bozlağan, 2006)	10
Şekil 4.1. 24. saatte LiCl ₃ 'ün Bti'ye olan etkisine ait A) Kontrol B) 0.01 M C) 0.1 M D) 0.5 M faz kontrast mikroskop toplam hücre görünümü	26
Şekil 4.2. 48. saatte LiCl ₃ 'ün Bti'ye olan etkisine ait A) Kontrol B) 0.01 M C) 0.1 M D) 0.5 M faz kontrast mikroskop toplam hücre görünümü	27
Şekil 4.3. 24. saatte ZnSO ₄ 'ün Bti'ye olan etkisine ait A) Kontrol B) 0.01 M C) 0.05 M D) 0.5 M faz kontrast mikroskop toplam hücre görünümü	27
Şekil 4.4. 48. saatte ZnSO ₄ 'ün Bti'ye olan etkisine ait A) Kontrol B) 0.01 M C) 0.05 M D) 0.5 M faz kontrast mikroskop toplam hücre görünümü	28
Şekil 4.5. LiCl ₃ uygulanan Bti'ye ait 24. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri	29
Şekil 4.6. LiCl ₃ uygulanan Bti'ye ait 48. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri	30
Şekil 4.7. ZnSO ₄ uygulanan Bti'ye ait 24. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri	30
Şekil 4.8. ZnSO ₄ uygulanan Bti'ye ait 48. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri	31
Şekil 4.9. MnCl ₂ uygulanan Bti'ye ait 24. Saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri	32
Şekil 4.10. MnCl ₂ uygulanan Bti'ye ait 48. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri	33
Şekil 4.11. CuSO ₄ uygulanan Bti'ye ait 24. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri	33
Şekil 4.12. CuSO ₄ uygulanan Bti'ye ait 48. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri	34
Şekil 4.13. Al (SO ₄) ₂ uygulanan Bti'ye ait 24. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri	34
Şekil 4.14. Al (SO ₄) ₂ uygulanan Bti'ye ait 48. Saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri	35

Şekil 4.15. $MnCl_2$ uygulanan Bti'nin sayım sonuçları	37
Şekil 4.16. $CuSO_4$ sayım sonuçları	39
Şekil 4.17. $LiCl_3$ sayım sonuçları	41
Şekil 4.18. $Al(SO_4)_2$ sayım sonuçları	43
Şekil 4.19. $ZnSO_4$ sayım sonuçları	45



1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar, doğal ortamlarında farklı çevresel streslere maruz kalmaktadır. Mikroplar karşılaştıkları bu stres faktörleri sebebiyle ya canlılıklarını kaybederler yada geliştirmiş oldukları adaptasyon mekanizmaları sayesinde yaşamlarını devam ettirirler (Neidhard ve VanBogelen, 2000). Bakterilerin karşı karşıya kaldığı stres faktörleri arasında; atmosferik basınç, yüksek ve düşük pH, oksijen azlığı, aşırı sıcaklık, UV ışınları, kimyasal maddeler ve besin yetersizliği sayılabilmektedir. Bu faktörler, farklı zaman periyotlarında, bakteri gelişimleri üzerine değişik şekillerde etki göstermektedir. Mikroorganizmalar, farklı stres faktörlerine maruz kaldıklarında yapısal komponentlerini ve canlılıklarını korumak için oldukça karmaşık adaptasyon şekilleri geliştirmişlerdir. Olumsuz ortam şartlarında bakterilerin geliştirdikleri stresten korunma yöntemleri; spesifik stres proteinlerinin üretilmesi, hücre içerisindeki iyon dengesi korunması (osmoregülasyon) ve transkripsiyonda iş gören farklı sigma faktörlerine sahip olmaları şeklindedir (Lewis, 2002). Oksijen kıtlığı, aşırı sıcaklık, kimyasala maruz kalma, besin kaybı gibi çeşitli çevresel stres faktörleri karşısında mikrobiyal büyüme engellenmektedir. Bu nedenle bakteriler yaşam döngülerinin büyük bir bölümünü durgun fazda geçirirler (Msadek, 1999).

Mikroorganizmalarla ağır metallerin etkileşimlerine ilgi giderek artmaktadır. Çevre kirliliğinde metale dirençli organizmaların seçimleri ve kirliliğe neden olan metal iyonlarının bakteri yoğunluğunu ve içeriğini nasıl etkilediğine dikkat çeken çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda kirliliğin diğer canlı gruplarında neden olduğu zararın, mikroorganizmalarla azalıp azalmadığına yani mikroorganizmaların indikatör olarak kullanılabilmesi üzerine odaklanılmıştır (Chang, 1993; Hiroki, 1994; Nieto, 1989; Doelman, 1994; Rajini ve ark., 1994). Bazı bakteriler kullanılarak çevre kirliliğinin azaltılması ve diğer canlıların korunması amaçlanmaktadır (Holm, 1995; Mullen, 1989; Rohit ve Sheela, 1994). Toprak ve su kaynaklarının kirliliğinin artmasıyla çevresel salgınlar ve bunu takiben ekolojik kirlenme gündemimize girmeye başlamıştır. Bu kirliliğe neden olan etmenlerden biri ağır metallerdir ve arsenik, bakır, civa, kadmiyum, kurşun önemli örneklerdir. Ekolojik sistemlere ağır metallerin bulaşmalarına paralel olarak mikroorganizmaların bu ajanlara karşı adaptasyon yetenekleri yoğun bir şekilde incelenmeye başlanmıştır (Klassen, 2009).

Mikroorganizmalarda strese karşı cevap, çeşitli düzenleyici mekanizmalarla gerçekleşmektedir (Segal ve Ron, 1998). *Bacillus* cinsine ait bakterilerin çoğu Gram pozitif ve aerobik olup aynı zamanda yüksek ısı, kuruma, UV, çok sayıda dezenfektan gibi stres faktörlerine karşı dirençli spor oluşturma yeteneğine sahiptirler. Sporlar vejetatif hücrelerden

karmaşık yapı gösterirler ve sporlarında protoplazmalarını çevreleyen ekstra bir spor ceketi bulunmaktadır. Spor içeriğindeki su miktarının az oluşu, spor korteks yapısı sporların maruz kaldıkları olumsuz şartlarda neden daha dirençli olduklarını açıklamaktadır (Setlow, 1998; Melly ve ark., 2002; Aslan, 2007). *Bacillus* cinsine ait türler üzerinde etanol, ısı, hidrojen peroksit, tuz, düşük-yüksek pH, ağır metal gibi çeşitli stres çalışmaları yapılmıştır. Oluşturulan stres ortamları karşısında bakterilerin kendilerini korumak için stres faktörlerinin tipine göre spesifik proteinler ürettikleri belirlenmiştir (Browne ve Dowds, 2001; Melly ve ark., 2002; Periago ve ark., 2002; Berber ve ark., 2005). Son yıllarda farklı araştırmacılar *Bacillus* cinsine ait türlerin değişik stres koşullarına karşı etkilerini içeren birçok çalışma yapmışlardır (Berber ve ark., 2004; Burke ve ark., 1983; Hecker ve ark., 1988; Elçin ve ark., 1995; Bernhard ve ark., 1997; Browne ve ark., 2001).

Günümüzde, böcek patojenleri kullanılarak pestisit popülasyonunun kontrolü, kimyasal pestisit uygulamalarına önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Çünkü kimyasal mücadelenin çevreye verdiği zarar, organizmaların direnç kazanması ve sadece mücadele edilen zararlının değil, diğer canlıların da etkilenmesi göz önüne alındığında, biyolojik mücadele en uygun çözümdür ve *Bacillus thuringiensis* (Bt) alttürleri sivrisinek kontrolünde en çok kullanılan biyoinsektisitlerdir (Tokçaer, 2003; Alejandro ve ark., 2011). Bu çalışmalarda genellikle *Bacillus* cinsine ait bakterilerin seçilmesinin en önemli nedeni bu cinse ait bakterilerin stres faktörlerine karşı değişik özel proteinler üretebilen gen grupları içermesidir. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), ürettiği toksin proteinleri, biyolojik mücadelede etkin olarak kullanıldığından dolayı önemli bir bakteridir (Keawsompong, 2008). İlaveten kolayca kültüre alınabilen bir bakteri olmasından dolayı bu konuyu ele alan çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Hassen, 1998).

Yapılan literatür çalışmasında, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* alt türüne ağır metallerin etkisi ile ilgili çalışmaların yeterli olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* bakterisi suşuna 4 farklı konsantrasyonda 5 farklı kimyasal uygulamayı geliştiren sporların 12, 24, 48 saat sonunda spor, vejetatif, toplam hücre sayılarının belirlenmesi ve zamana bağlı protein profilleri ve sayım sonuçlarını karşılaştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikroorganizmalar ve Stres

Mikroorganizmaların dünya üzerindeki varlığı, bitki ve hayvanların varoluşundan milyarlarca yıl öncesine dayanmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmaların evrimsel çeşitliliği, yüksek organizmalarınkinin çok ötesindedir. Bu çeşitlilik, mikroorganizmalara çok farklı fonksiyonlar kazandırmaktadır. Mikroorganizmaların yüksek organizmalar için uygun olmayan yerlerde nasıl yaşayabilmesi ve sahip oldukları fizyolojik yetenekleri onların dünyanın en iyi kimyacıları olduğunun kanıtıdır. Bu nedenle bakteriler, biyosferdeki biyolojik faaliyetlerin merkezindedir (Madigan ve Martinko, 2010).

Bakteriler doğada farklı çevresel faktörlere maruz kalmaktadır. Bu faktörler, ya bakterilerin canlılıklarını kaybetmelerine neden olur ya da adaptasyon mekanizmalarını aktif hale getirebilir. Bu sayede yaşamlarını devam ettirebilirler. Etkin adaptasyon mekanizmaları geliştirerek stresli ortama uzun süre dayanabilirler. Stresin devamlılığında popülasyonlarının azalmasıyla karşılaşabilirler. Bakteriler yaşam ortamlarındaki stres faktörlerinin yanısıra (ışık, oksijen, soğuk vb.) gıdalarda bulunan asidite, sodyum klorür, ısı, ağır metal, bakteriyosinler, rekabetçi flora gibi streslere de maruz kalabilmektedirler. Gıda, tarım ürünleri gibi insan sağlığı için önem arz eden ortamlarda direnç mekanizmaları sayesinde dayanıklı hale gelebilir. Strese dirençli olan bu bakteriler insan vücudunda dahi ölümcül ortamlara karşı da adaptasyon yeteneklerini geliştirebilirler. Yapılan çalışmalar incelendiğinde stres varlığında adaptasyon mekanizmaları aktif hale gelen patojenlerin enfektif dozunun azalarak patojenitesinin arttığı görülmüştür. Ölümcül ortamlarda dahi bakterilerin enfeksiyon oluşturabilecekleri bilindiğinden gıdalarda bakteri adaptasyonları halk sağlığı açısından önemli tehditler olarak kabul edilmektedir (Dikici, 2009; Kılıç, 2008).

Farklı alanlara göre stresin tanımı değişiklik gösterebilir. Bir fizikçi için stres, birim alana uygulanan kuvvet anlamına gelmektedir. Ancak bir biyologa göre ise canlıların uygun olmayan fiziksel şartlar altında, toksik maddelere ve zararlı ortamlara maruz kalması demektir. Özetle mikroorganizmaların maruz kaldıkları gelişme ve üremelerini olumsuz yönde etkileyen faktör ya da ortama stres adı verilmektedir. Her ortamda şiddetleri farklılık gösteren stres faktörleriyle karşılaşabilirler (Neidhart ve Vanbogelen, 2000). Mikroorganizmalar stresin tipine ve şiddetine göre farklı cevaplar oluşturabilir. Bakteriler zayıf strese maruz kaldıklarında sayılarında azalma olmamasına rağmen üremelerinde durma veya azalma görülmektedir. Orta şiddetli bir stres ile karşılaştıklarında ise mikrobiyal gelişimleri durabilir ve yaşamsal kabiliyetlerinde bir azalma da meydana geldiği görülmüştür.

Ölümcül sonuçlarına neden olan şiddetli stres durumunda bakteri popülasyonunun büyük oranda kaybı gerçekleşmektedir (Yousef, 2003).

Bakteriler herhangi bir stres faktörüyle karşılaştığında, genetik kodlarında bir direnç mekanizmasına sahipse, gerekli proteinleri üreterek korunmaya çalışırlar. Maruz kalınan stres sonucunda bakteri DNA'sında transkripsiyonla mRNA oluşmakta ve oluşan bu mRNA ribozomlarda translasyonla ilgili stresi düzenleyen şok proteini sentezlemektedir. Sentezlenen şok proteini bakterinin fizyolojisini etkiler ve strese karşı mücadele etmesini sağlar. Sentezlenen bu şok proteini bir ya da birden fazla stres faktörüne karşı etkili olabilmektedir. Bunun yanı sıra her bakterinin stres faktörüne karşı oluşturdukları direnç mekanizmaları aynı ya da farklı olabilmektedir (Arsene, 2000; Crona, 2002).

Değişik stres faktörlerinin *Bacillus* cinsinin spor oluşumu üzerine etkisi gibi protein sentez üzerine olan etkisine ilişkin de birçok çalışma yapılmıştır (Lindquist, 1988). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ve *Bacillus sphaericus*'un böcek larva aktivitesi ve canlılığına biyotik ve abiyotik faktörlerin etkisi Mulla ve Lacey tarafından 1990 yılında özetlenmiştir. Her iki bakteride güneş ışığı ya da UV ışığının etkisiyle entomopatojen özelliğinde azalma gözlemlenmiştir (Burke, 1983; Mulligan, 1980; Garcia ve DES Rochers, 1984; Mulla ve Lacey, 1990). Alkolofilik *Bacillus*'ların değişik stres faktörlerine karşı, diğer *Bacillus* cinsi bakterilerden farklı protein üretebilen gen grupları içerebileceği olasıdır. *Bacillus sphaericus* üzerinde yapılan başka bir çalışmada *Bacillus sphaericus* 2362 ırkı spor toksin bileşeni karboksimetilselülaz (CMC) ile kapsüllenmiştir. Kapsülleme işlemi sonucunda spor toksin bileşeninin proteinlerinin bakteriyi asidik pH, UV ışınları ve sıcaklığa karşı daha dayanıklı hale getirdiği, kapsüllenmiş sporlarda toksin protein etkisinin serbest kapsüllenmeyenlere oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlarda kapsüllenmemiş sporların 50°C sıcaklık uygulaması sonucunda 60 gün sonra 1000-100 kat düştüğü gözlenirken, kapsüllenmiş sporların 50°C sporların sayısında bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir (Elçin ve ark., 1995). Yapılan başka bir çalışmada ise güneş ışığından dolayı inaktive olan *Bacillus thuringiensis* (bt)'in korunumu incelenmiş, spor canlılığına etkisi araştırılmıştır. 300-400 nm dalga boyundaki güneş ışınlarının bakterinin spor canlılığını ve larvasidal aktivitesini hızla düşürdüğü bildirilmiştir (Morris, 1983). Çok etkili bir entomopatojen olan Bt'nin en önemli dezavantajı uygulamadan sonra güneş ışınlarına maruz kaldığında toksik etkisinin kaybolmasıdır. Özellikle Bt'nin H-7 serotipi ve diğer H serotipleri 254 nm dalga boyundaki UV ışınlarına oldukça yüksek hassasiyet göstermektedir (Martin ve Travers, 1989). Bu gibi risklerden dolayı UV'ye dayanıklı mutantların elde edilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Jones, 1991).

Bacillus sphaericus 2362 ırkı ile yapılan farklı bir çalışmada 12 farklı ticari pestisit in spor canlılığı, toksin kararlılığı ve sivrisinekler üzerindeki larvasidal etkisi araştırılmıştır (Berber ve ark., 2003). *B. sphaericus* 2362 ve 1593 ırkları üzerinde yapılan çalışmalar paraquat içerikli Gramaxone herbisit in bulunduğu ortamlarda spor yaşama kabiliyetleri ve larvasidal etkileri incelenmiştir. Herbisit in bulunduğu şartlar altında spor çimlenmesi 24 ve 48 saat sonra durduğu ve toksin proteinlerinin kaybolduğu SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Ayrıca 50, 100, 200 mg/mL herbisit oranı bulunan ortamda toplam hücre sayısı ve ısıya dayanıklı spor sayısının hızla azaldığı bulunmuştur (Berber ve ark., 2004). *B. sphaericus* ile ilgili yapılan başka bir stres faktörüyle ilgili çalışmada ise bakteriye UV ışığının etkileri ve bakterinin kimyasallar tarafından korunması incelenmiş, çalışmada kullanılan 5 kimyasal in spor canlılığı ve larvasidal aktivitesini UV inaktivasyonundan korunduğu belirlenmiştir (Çökmüş ve ark., 2000).

Bacillus subtilis PS 832 ırkına çeşitli sıcaklık stresleri uygulanmış ve sporların vejetatif hücrelerden daha dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir. Bu bakteri 21-48 °C'ye kadar farklı sıcaklık stresine maruz bırakılması sonucunda spor korteksindeki bazı değişimlerin ısıya direnç sırasında oluşturduğu ortaya konmuştur. Çalışmada kültürler 30°C'de sporlandırılarak maksimum eş zamanlı kültür elde edildikten sonra sıcaklık 45°C'a çıkarılır, kültürler 30 dakika bekletildikten sonra oluşan sporların nemli sıcaklık, formaldehit, hidrojen peroksit ve daha farklı kimyasallar gibi stres şartları altında oluşturduğu sporlardan daha dirençli olduğu saptanmıştır (Melly ve ark., 2002).

Başka bir stres faktörü çalışmasında ise farklı seviyelerde çözünmemiş oksijen oranlarının *B. sphaericus* 2362 ırkının gelişimi ve sporulasyonu üzerindeki etkilerini incelenmiştir. Sonuçta çözünmemiş oksijenin %20, %50 ve %100 olduğu durumlarda serbest spor oluşumu hızla artmıştır. %100'lük çözünmemiş oksijenin olduğu durumda gelişen hücrelerin önemli derecede toksik etkilerinin azaldığı bulunmuştur (Karim ve ark., 1993). *B. sphaericus* ile ilgili yapılan başka bir stres ortamı oluşturulan çalışmada ise, farklı sıcaklıklarda bakterinin sporlarındaki su miktarı incelenmiş ve en az su miktarı ve besin içeriği 30°C'de bulunmuştur (Ludlow, 1992).

2.2. *Bacillus thuringiensis*'in Genel Özellikleri

Bacillus thuringiensis (Bt)'in tarihçesi kronolojik olarak şu şekildedir. 1911 yılında Berliner tarafından tanımlanmıştır. 1928 yılında Avrupa'da mısır zararlısı olan *Oarinianubilalis* (Hübner)'e karşı mücadelede, 1960 yılında Sovyetlerde ve ABD'de endüstriyel formülasyonları üretilmiş ve zararlı mücadelesinde kullanılmıştır. 1972'de ise

Fransa'da zararlılara karşı kullanımı için ilk resmi izin verilmiştir. Bu tarihe kadar sadece Lepidoptera takımındaki türler için kullanılan Bt 1977'de bazı Diptera türleri için kullanılmıştır. İlk Bt genleri 1981'de klonlanmıştır. 1983 yılında ilk kez bir alttürü Coleopterler için kullanılmıştır. 1995'de Bt toksini sentezleyebilen genetik olarak değiştirilmiş tarım bitkilerinin (tütün ve domates) üretim izni alınmış ve piyasaya sürülmüştür (USEPA 1999). 2000'li yıllara gelindiğinde ise ağaçlarda Bt toksini sentezlemeye yönelik genetik çalışmalar başlatılmıştır (Kumbaşlı, 2004).

Bt, Firmicutes filumunun Bacilli sınıfından Bacillales takımından Bacillaceae familyasına aittir. İlk olarak Japon bakteriyolog Ishiwata tarafından 1901'de hasta ipek böceği larvasından izole edilmiştir. 1911 yılında ise Ernest Berliner bakterinin bilimsel tanımlamasını yapmıştır. 1916'da Aoki ve Chigasaki Bti'nin spor kültürlerindeki bir toksin yüzünden toksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Beegle ve Yamamoto, 1992). Bazı böceklere karşı toksik özellik barındıran bir bakteri olan Bt 20. yüzyılın başında ipek böceklerine etkili olan bir patojen olarak düşünülmüşse de, toksik özelliği üzerine yapılan araştırmalar sonucunda böceklerle mücadelede önemli bir ajan olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bt, toksik özelliği bulunan protoksin adı verilen protein kristalleri sentezler. Böcekler tarafından oral yolla alınan bu protoksinler böcek bağırsağında aktive olur. Aktive olan bu toksinler bağırsaktaki özgün reseptörlere bağlanarak bağırsağın yırtılmasına neden olur. Bt'in birçok alttürü bulunmaktadır. Her alttür farklı yapıda toksin üretir ve etki ettiği böcek türleri farklılık gösterir. Bt arazide 20 yılı aşkın süredir yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat, laboratuvar denemeleri sonuçları böceklerin bu biyolojik insektisite karşı dayanıklılık geliştirebilme ihtimaline sahip olduğunu desteklemektedir (Kumbaşlı, 2004).

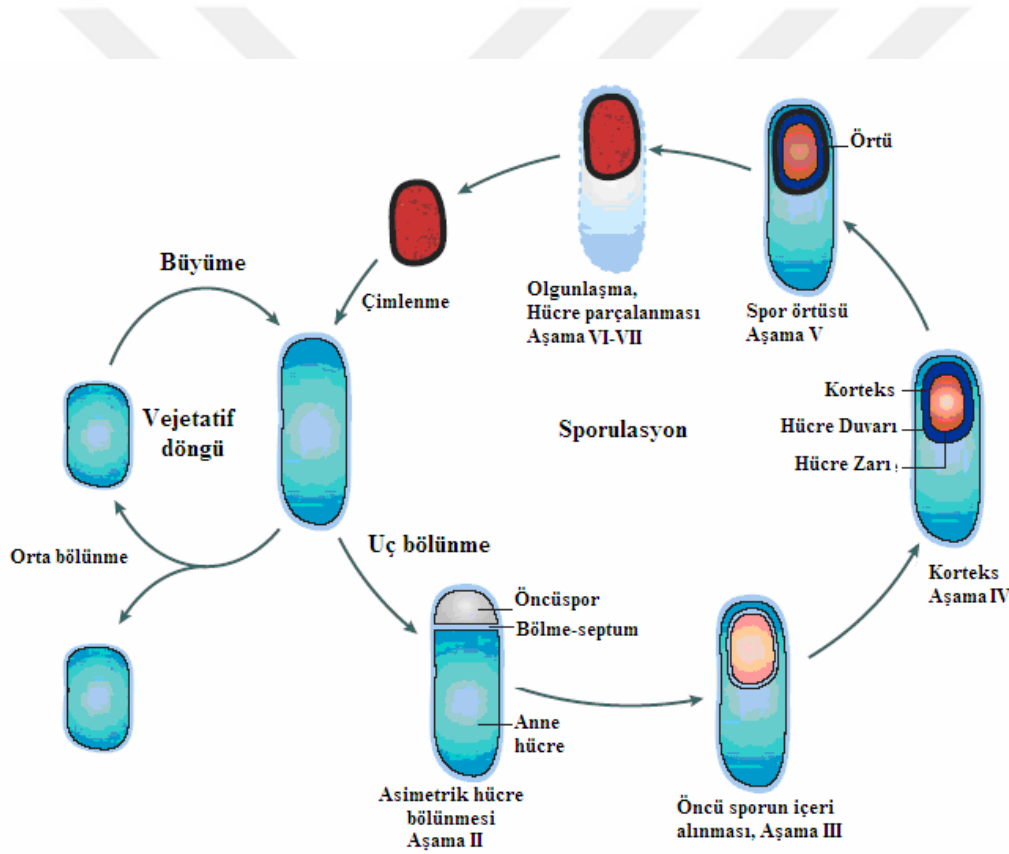
Bacillus cinsi bakteriler kolay üretilen, olumsuz koşullarda sporlanma özelliği gösteren ve endüstriyel öneme sahip (toksin, antibiyotik, biyoplastik, enzim üretebilmek gibi) mikroorganizmalardır. Bu nedenle bilim insanlarının odak noktası olmuştur (Rosovitz, 1998, Waheed ve Kogan, 2006). *Bacillus* cinsine ait türler çomak şeklinde Gram pozitif (+) veya fakültatif anaerob, sporlu ve peritrik kamçılı, çeşitli şartlarda yaşama özelliğine sahip canlılardır. *Bacillus* türlerine ait organizmaların vejetatif hücreleri tek başına veya zincir halinde bulunabilir. $0.5 \times 1.2 \mu\text{m}$ – $2.5 \times 10 \mu\text{m}$ büyüklükte olan hücreler yuvarlak ya da köşeli şekilde görümlere sahiptir. *Bacillus* cinsine ait bakteri hücreleri genelde sitoplazmik membran üzerinde bir veya birkaç anyonik polimere sahip ve birkaç peptidoglikan tabaka ile sarılmış bir hücre duvarına sahiptir. Bazı *Bacillus* türleri hücre duvarına ek olarak, hücre duvarının dışında yapısı jelatinöz, viskoz, elastik veya mukoid olan bir kapsül içermektedirler. *Bacillus anthracis*'deki kapsül diğer türlerden farklı olarak virülans özelliğe

sahiptir (Claus ve Berkeley, 1986; Slepecky ve Hemphill, 1992; Arda, 2011; Sneath, 1986). *Bacillus* bakterilerinin karbon kaynağı olarak şeker, organik asit ve alkol nitrojen kaynağı olarak ise amonyum içeren besiyerlerindeki gelişimleri daha iyidir. Sıvı ve katı besiyerlerinin üst kısımlarında gelişen *Bacillus* bakterileri, katı besiyerlerinde kenarları ve üzeri pürüzlü, granüller yapıda koloniler meydana getirirler (Taubman, 1992; Sneath, 1986). *Bacillus* cinsi; psikrofilik, termofilik, asidofilik ve tuza toleranslı birçok türü içermesi nedeniyle farklı ortamlarda yaşama kabiliyetine sahip olup genellikle kemoorganotrofturlar.

Bacillus genellikle 30-40°C'de ve pH 7 civarında ürerler (Slepecky ve Hemphill, 1992). *Bacillus*'lar spor oluşturdukları için hemen hemen her yerden izole edebilirler. Toprak, toz, saman, gıda ürünleri, su, bitki rizosferleri, tatlı su ve deniz sedimentleri, hayvan gübreleri, bazı böcek larvaları ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinde bulunabilirler. İzolasyonda sporların ısıya dirençli olma özelliğinden yararlanılır (Burke, 1983; Tunail ve Köşker, 1985). 19. Yüzyılın ikinci yarısında bazı bakteri türleri yaşamlarının bir kısmını endospor olarak bilinen dormant hücresel yapıda geçirdikleri bilinmekteydi. Bakteriler dormant yapıya ekstrem nemli ve kuru sıcaklık, UV ve gama radyasyonu, aşırı kuruma, oksitlenmeler, besin kıtlığı, ekstrem pH, kimyasallara maruz kalma gibi sebepler söz konusu olduğunda geçebilirler (Nicholson ve ark., 2002). *Bacillus* türlerinin en önemli özelliklerinden biri büyüme evresinin bekleme fazında, besin azlığına bağlı olarak endospor oluşturmalarıdır. Spor oluşturan hücrelerin şekli ve sporangiyumlar *Bacillus* türleri için karakteristiktir (Welsh, 1994). Sporlar silindirik, elipsoidal, oval şekillerde bulunabilmektedir. Sporlar sporangium içerisinde sentral, parasentral, subterminal, terminal ya da lateral olarak yerleşirler. Bu formlar çevresel faktörlere (ısı, ışık, nem, radyasyon, vs) dezenfektan gibi çeşitli kimyasallara ve mekanik etkilere karşı vejetatif formlarla kıyaslandığında çok daha fazla dayanıklıdır (Rosovitz, 1998; Arda, 2000; Claus ve Berkeley, 1986).

Spor oluşması anında bakteri hücresi içinde birçok değişiklik meydana gelmektedir. Vejetatif hücrede bazı genler aktivitelerini kaybederken sporların oluşmasında etkili olan genler aktivite kazanırlar. Spor direncinde çok önemli role sahip olan spor ceket iç ve dış olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Spor ceketin altında bir korteks kısım ve bunun da içinde spor çekirdek bulunmaktadır. Spor çekirdeğin merkezinde ise nükleosit vardır. İlk olarak çekirdek sporun oluşacağı bölgede yerleşir. Bunun etrafını çöküntü oluşturarak katlanan sitoplazmik zar çevreler ve bakteri içerisinde ayrı bir yerde tutar. Oluşan bu çift zarın sentezlenmesi ile spora ait şu bölümler oluşur. Birinci bölüm içinde tam bir nükleus ve enerji yapıcı sistem ve protein sentezi için gerekli bileşenlerin olduğu çekirdek kısmıdır ve sporun

protoplastını oluşturur. Bu bölümde Sitokrom bulunmaz, ancak çeşitli enzimler bulunur. Sporların sıcaklığa dirençli olmalarını sağlayan yapılarındaki bol kalsiyum dipikolinattır. Dipiklonik asit katyon yoğunluklu bir yapıya sahiptir, düşük oranda su içerir. Sporlarda bulunan ikinci bölüm spor protoplastını çevreleyen, yapısında peptidoglikan bulunan spor duvarıdır. Oluşacak bakterinin hücre çeperi bu kısımdan gelişir. Sporlarda bulunan üçüncü bölüm ise sporun en kalın tabakası olan kabuk, yani kortekstir. Bu kısım değişik özellikte peptidoglikan tabakasına sahip olup korteks kısmının dışında protein özellikli bir kılıf içerir. En dışta da karbonhidratlı bir protein zar (ekzosporiyum) bulunur. Silindirik, elipsoidal, oval veya yuvarlak olabilen endosporlar vejetatif hücrelerden birçok yönden (optik kırılma, ince yapı, kimyasal pozisyon, kimyasal ve fiziksel stres, dirençlilik) farklıdırlar (Fitz-James ve ark., 1969; Bilgehan, 1992).



Şekil 2.2. *Bacillus* türlerinin spor döngüsü (Erington, 2003)

Clostridium, *Bacillus* ve *Thermoactinomyces* türlerinin sporları üzerinde detaylı çalışmalar yapıldığı Setlow ve ark. (1988) tarafından bildirilmiştir. Spor çimlenmesi sırasında dormant sporların proteinlerinin parçalanmasıyla serbest aminoasit miktarının arttığı belirlenmiştir. Çimlenme sırasında ise proteolizis adı verilen bu olayın başka bir fonksiyonu da protein sentezinin başlatıcısı olduğu bilinmektedir. Spor çimlenmesi boyunca proteolizis büyüklüğü

asitte çözünebilir proteinlerin (SASP) tanımlanmasıyla sağlanır. Bu proteinler geç sporulasyon evresinde sentezlenir ve spor çimlenmesinin erken döneminde parçalanırlar. SASP tipi ve oranı sporulasyon ortamının değişmesinden önemli ölçüde etkilenir. *B.subtilis* α/β yada γ tip olarak adlandırılan SASP tipleri bulunmaktadır. Genel olarak α/β SASP'ler toplam SASP'lerin %40- 50'ini, γ tip ise %30-40'ını oluşturmaktadır. Bunların yanında minör SASP proteinleri, major SASP'lere paralel olarak sentezlenmekte ve çimlenme boyunca parçalanmaktadır. Bu proteinleri kodlayan genler tespit edilerek üzerinde kopyalama çalışmaları yapılmıştır. Bu genler *sspA*, *sspB*, *sspC* ve *sspD* olarak adlandırılmıştır. SASP sentezi vejetatif ve geç sporulasyon hücrelerinde bulunmamaktadır. Sporulasyonda SASP sentezi, dipiklonik asit sentezinden 1-2 saat önce başlar ve glukozdehidrogenaz enzim sentezi ile eş zamanlı meydana gelir. SASP'lerin başlıca fonksiyonu spor çimlenmesinde protein sentezi boyunca parçalanarak aminoasit sağlamak, stres sırasında oluşabilecek hasara karşı DNA'yı korumak ve spor çimlenmesi sırasında gerekli enerjiyi sağlamaktır. Diğer bir fonksiyonu ise spor DNA'sı ile birleşerek sporları daha dirençli hale getirmektir (Setlow, 1988; Nicholson, 2002).

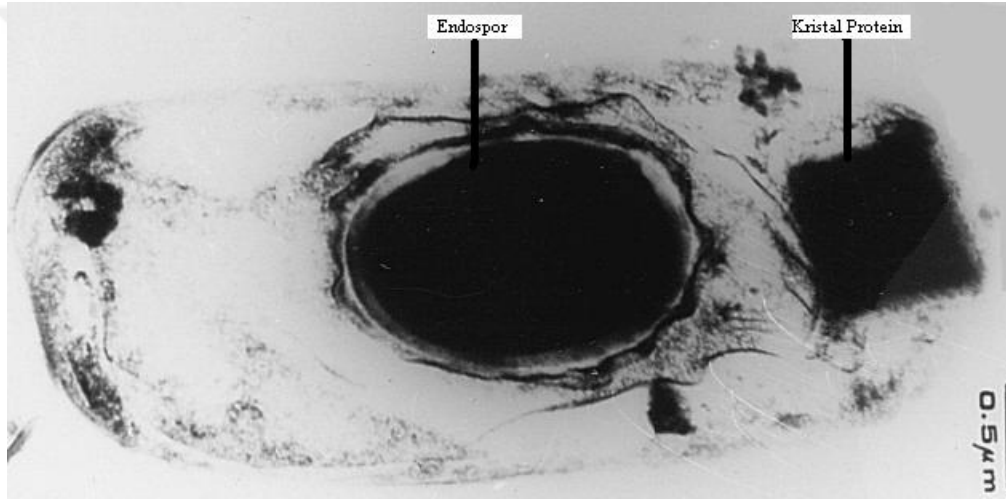


Şekil 2.1. Bti koloni görünümü (Martin, 2007)

Genellikle Embden-Meyerhof metabolizma yolunu kullanan *Bacillus* bakterileri terminal elektron alıcısı olarak da oksijeni kullanırlar. *Bacillus* bakterileri tarafından üretilen enzimler (subtilisin, proteaz, amilaz gibi) besin, eczacılık, gibi farklı endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır (Johnvesly ve Naik, 2001).

Bacillus bakterileri böceklere karşı insektisit etki göstermektedir. *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* entomopatojen türler olarak bilinmektedir (Yoshimura ve

Yamamoto, 1990, 2002). Bazı böcek türlerine karşı patojenik etkileri olup, ticari kullanımlarında da başarılı olan türlerinden biri *Bacillus thuringiensis* (Bt) olmuştur. Kendisi gibi toprak bakterisi olan *Bacillus cereus* ile yakından akraba olan Bt, sporulasyon boyunca bir kristal protein (Cry) üretme yeteneğine sahip olması yönünden *Bacillus cereus*'den ayrılır (Höfte, 1989; Beegle ve Yamamoto, 1992). Bt sporları içerisinde terminal ve subterminal elipsoid sporlar bulunur. Bu sporlar herhangi bir şişkinlik oluşturmaz. Hücrelerinde parasporal kristaller bulunmasından dolayı diğer türlerden ayrılır (Şekil. 2.3.). Bu kristaller bakteriye insektisidal aktivite üretilmesi ile entomopatojen özelliği sağlar (Bozlağan, 2010). Bt suşlarının ürettiği farklı toksinler bazı kaynaklar başlıklar halinde toplamıştır; δ -endotoksinler, β -ekzotoksinler, hemolizinler, enterotoksinler, ekzoenzimler, vejetatif insektisidal proteinlerdir (Glare, 2000).



Şekil 2.2. *Bacillus thuringiensis* bakterisinin elektron mikroskop görüntüsü (Bozlağan, 2006)

Bt suşları genelde topraktan, böceklerden, depolanmış ürünlerden ve ağaç yapraklarından izole edilebilir (Yamamoto, 1992; De Luca ve ark., 1981; Travers, 1987).

Bt genel *Bacillus* özelliklerini taşır. Biyokimyasal özelliklerinde en çok sitratı karbon kaynağı olarak kullanmasından bahsedilir. Hatta ağır metal çalışmalarında sitrat döngüsü ile ilgili yayınlar mevcuttur (Hassen, 1997). Bt suşları 2.4-5.4 milyon baz çifti uzunluğunda bir genom içerirler (Carlson, 1994). Nukleoid dışında sayıları 2-11 ve büyüklükleri 2-272 kb arasında değişen plazmitlere sahiptir (Gonzales, 1981; Lereclus, 1994; Carlton, 1988). Bt sınıflandırmasında, tanımlanmasında genel mikrobiyolojik yöntemler, ışık ve faz-kontrast mikroskobu, H-serotiplendirme, rastgele çoğaltılan polimorfik DNA yöntemi (RAPD), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), sodyum doedesil sulfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemleri kullanılmaktadır (De Barjac, 1962; Carozzi ve ark., 1991; Sauka 2010; Williams ve ark., 1990; Brosseau, 1993).

2.3. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*'in Genel Özellikleri ve Biyoteknolojik Önemi

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* (Bti) İsrail'de 1976 yılında Negev çölündeki küçük bir göletten izole edilmiştir. Bu izolata ONR 60A adı verilmiştir. *Anopheles sergentii* Theobald, *Uranotaenia unguiculata* Edwards, *Culex univitallus* Theobald, *Aedesa egypti* Linnaeus ve *Culex pipiens* Linnaeus üzerinde test edilerek yüksek larvasidal etkisi tespit edilmiştir (Goldberg ve Margalith, 1977). Bu suş daha sonra de Barjac tarafından *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Serotip H-14 olarak tanımlanmış ve günümüzde kullanılmakta olan *Bti* kültürleri türetilmiştir (de Barjac 1978; Margalith ve Dean 1985; İmamzade, 2008). *Bti*, Diptera takımının Nematocera alttakımına bağlı olan Culicidae, Simuliidae, Dixiidae, Chironomidae ve bazı Ceratopogonidae'ler üzerinde toksik etkilidir ancak diğer sucul canlılara karşı (balıklar, deniz kabukluları, amfibiler, Odonata, Hemiptera ve Coleoptera takımları) toksik etkili değildir (Garcia ve ark. 1981, Mulla ve ark. 1982). *Bti*, sivrisinek ve *Simulium spp.*'lere karşı etkinliğinin keşfinden sonra, Batı Afrika'da yıllarca Onchocerciasis Kontrol Programı'nda kullanılmıştır (Glare ve O'Callaghan, 1998). *Bti*, Gram (+), aerobik, spor oluşturan, entomopatojenik bir bakteridir, biyoteknolojik kullanımlarında *Bti Bacillus*'un en etkili alt türüdür (Tyrell ve ark., 1979; Regis ve ark., 2001; Mittal, 2003; Toparlak ve Vuruşaner, 2006). *Bti* şişkinlik oluşturmamış sporangiyumlar içerisinde eliptik endosporlar ve parasporal kristaller bulundurulur (Yamamoto ve ark., 1983). *Bti* toksin proteini birden fazladır. 28 kDa, 65 kDa, 135 kDa proteini gibidir. Bu proteinler hemolitikdir. *Bti* hemolitik toksini hücreler üzerindeki bir lipid reseptörüne bağlanır (Davidson ve ark., 1987).

Bti'nin toksin proteini ile ilgili yapılmış çalışma sayısı çok fazladır. *Bti*'den izole edilen Cyt1A endotoksini karakterize edilen ilk Cytendotoksindir. Cyt1A endotoksini (27.3kDa) total kristal proteinin % 40'nı oluşturur (Glare, 2000). *Bti* suşunda bulunan 72 kDa 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 yapıları kristallerde toplanırlar (Chang, 2003). Laboratuvar çalışmalarında *Bti*'nin Cry toksinlerine karşı direnç gelişebildiği gösterilse de uygulandığı alanda *Bti*'nin kendisine direnç gelişmesi beklenmemekte, buna sebep olarak *Bti*'nin etki mekanizmaları farklı olduğu varsayılan dört adet Cry toksininin ve bir adet Cyt toksininin olması gösterilmektedir (Glare ve O'Callaghan, 2000; Charles ve Nielsen-Leroux, 2001; Regis ve ark., 2001). *Bti*'nin insektisidal etkiden sorumlu Cry 4A, Cry4B, Cry 11A ve Cyt 1A'ya karşı rezistans oluşumunu ölçmek amacıyla *Culex quinquefasciatus* kullanarak laboratuvarında yapılan 28 jenerasyonluk bir çalışmada, Cry 4A'ya karşı 16. jenerasyonda,

Cry4A+Cry4B'ye karşı 19. jenerasyonda, Cry4A+Cry4B+Cry11A'ya karşı 25. jenerasyonda önemli oranda direnç gelişmiş ancak Cry4A+Cry4B+Cry11A+Cyt1A'ya karşı 28. jenerasyonun sonunda dahi resistans gelişimi gözlemlenmemiştir. Bu sonuç ile Cyt1A'nın direnç gelişimine engel olduğu tezi ortayakonmuştur (Georghiou ve Wirth 1997). Bu çalışmanın sonucunu destekleyecek şekilde Wirth ve ark. (1997)'nin yaptıkları benzer bir çalışmada Cyt 1A'nın insektisidal etkisinin az olduğu, ancak Cry toksinlerinin birine ya da çoğuna karşı gelişen direnci baskı altına alındığı gösterilmiştir.

2.4. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*'in Gelişmesini Etkileyen Faktörler

Son zamanlarda Bti'ye karşı gelişen tolerans ve direnç gelişimi ile ilgili çalışmalar yayınlanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yayınlanan bir çalışmada sahadan toplanan *Culex pipiens* larvalarının phenotrin, *Bacillus sphaericus*, Bti ve metoprene karşı duyarlılıkları araştırılmış ve sahadan toplanan larvaların, duyarlı larvalara oranla Bti'ye 33 kat daha dirençli oldukları bildirilmiştir (Paul ve ark., 2005). Wirth ve ark., 2001 ise *Culex pipiens* larvalarının Bti'ye karşı direnç geliştirdiğini tespit etmişlerdir. Mısır'da yapılan bir çalışmada, *Culex pipiens* larvaları 20 jenerasyon boyunca Bti'ye maruz bırakıldığında son jenerasyonda, 1. jenerasyona göre sadece 2.8 kat tolerans geliştiği gözlemlenmiştir. Sonraki 3 jenerasyonda seleksiyon uygulaması ortadan kaldırılmış ve Bti'ye karşı gelişen tolerans % 58 oranında düşmüştür (Saleh ve ark.,2003). Cry toksinlerine karşı direnç gelişim mekanizmalarına dair iki farklı hipotez bulunmaktadır. İlk hipotez, direnç gelişiminden Cry toksinlerinin proteaz aktivasyonundaki farklılığını sorumlu tutarken, ikinci hipotez toksinlerin bağlanma yerlerinde modifikasyonların şekillendiğini ileri sürmektedir (Griffitts ve Aroian, 2005).

Bti, ısı, nem, oksijen ve pH'nın ayarlı olduğu özel fermentasyon fiçilerinde ticari olarak yetiştirilir. Bakterinin gıda olarak tüketmesi için balık yemi ya da soya unu gibi yüksek proteinli gıdalar kullanılır. Kültürde, 3-3.5 µm uzunluğundaki hücreler, zincir şeklinde ürerler (Mittal 2003). Bakteri, sporulasyon esnasında sporun yanı sıra entomopatojenik proteinlerin toplandığı bir kristal üretir ve parçalanır. Geriye spor, kristal, parçalanmış hücrelerin enkazı ve sindirilmemiş kültür kalır. Spor ve kristaller, santrifüj ile çöktürüldükten sonra, mikrofiltrasyon ile toplanır. Filtre edildikleri ısılarda daha çok beslendikleri ve kısa sürede daha fazla toksin sindirdikleri varsayılmaktadır (WHO, 1982; Lacey ve Oldacre, 1983; Wilson ve ark., 2005). Etkinlik üzerinde pH'nın etkisi konusunda da farklı görüşler bulunmaktadır. Floore ve ark. (1987), pH'nın herhangi bir etkisi olmadığını bildirmişler, buna karşı olarak Lacoursiere ve Charpenter (1988), artan pH ile Bti patojenitesi arasında pozitif korrelasyon olduğunu ileri

sürmüşlerdir. Gnoffo ve ark. (1981) ve Wilson ve ark. (2005) pH'yı, Bti'nin insektisidal etkinliği üzerinde etkisiz bulmuşlardır. Organik maddelerin artışı, Bti'nin etkinliğini azaltmaktadır. Uygulama yapılan suyun çamurlu olması, çürümekte olan organik maddeler Bti'nin etkinliğini azaltmaktadır (Beck, 1982; Margalith ve Bobroglo, 1984; Ohana ve ark.,1987; Mulla ve ark., 1990; Becker ve ark.,1992). Sedimentasyon ve Bti'nin katı taneciklere bağlanması, inaktif hale gelmesinin ana nedeni kabul edilmektedir. Bti'nin parasporları, suda asılı bulunan taneciklere ve çökeltilere yapışma eğilimindedir, dolayısıyla *Bacillus sphaericus*'e nazaran kısa sürede suyun dibine çöker. Bu durum Bti'nin sahada *Bacillus sphaericus*'den daha kısa süre etki göstermesinin sebebi kabul edilmektedir (Lüthy ve Studer 1986, Yousteen ve ark. 1992, Poopathi ve Tyagi 2004). Gnoffo ve ark. (1981)'nin su çeşidinin Bti'nin insektisidal etkinliğine etkisini ölçmek amacıyla yaptıkları çalışmada Bti'nin, distile suda, gölet suyuna göre daha etkin olduğu bulunmuştur. Suda bulunan iyonik maddeler de bakterinin etkinliğini etkiler. Metal elementlerinden doğada düşük seviyelerde bulunan perklorat, *Bacillus* içeren mikrobiyal insektisitlerin etkinliğini değiştirmemekte, ancak hegzavalent krom, Bti ve *Bacillus sphaericus*'nin etkinliğini arttırmaktadır (Sorensen ve ark.,2007). Güneş ışınları Bti'nin etkinliğini azaltmaktadır. Larvaların yaşlanması ve larva sayısının fazlaşması, Bti'ye duyarlılığı azaltmaktadır (Beck, 1982; Becker ve ark.,1992). Doğal sucul mikrocanlıların varlığı Bti'nin etkinliğini düşürmektedir. Ortamda *Daphnia* gibi suyu filtre ederek beslenen sucul canlıların olması larvaların beslenirken daha az bakteri almasına ve sonuçta ölüm yüzdelerinin düşmesine sebep olmaktadır (Becker ve ark.,1992). Sivrisineklerin üreme alanlarında yoğun vegetasyon bulunması, Bti'nin etkinliğini azaltmaktadır (Mulla ve ark. 1982). Yeşil alg *Scenedesmus quadricauda*'nın Bti'nin etkinliğini düşürdüğü laboratuvar denemelerinde gösterilmiştir (Overmyer ve ark., 2006). Bti formülasyonlarının tutulduğu ortamlardaki sıcaklıkta etkinlikleri üzerinde rol oynamaktadır. 25 °C ve üzeri derecelerde saklanan formülasyonlarda ciddi insektisidal etki kayıpları gözlenmiştir (Gnoffo ve ark., 1982; Farghal ve Darwish, 1988).

Kullanılan Bti formülasyonu da etkinlik ve kalıcılık üzerinde rol oynamaktadır. Lüthy ve Studer (1986), Poopathi ve Tyagi (2004)'e göre Bti'nin toksik etkisi 24-48 saat sonra kaybolmaya başlar. Federici (2002) ise uygulanan yerde iki hafta kadar kalıcılık olduğunu bildirmektedir. Bu farklılık, kullanılan formülasyon ile açıklanmaktadır. Granül formülasyonları toksinleri yavaş yavaş yaydıkları için Bti'nin uygulandığı yerde daha kalıcı olmasını sağlamaktadır. Laboratuvar koşullarında Bti ile beslenerek ölen larva ve pupalarda bakterinin kendini yenilediği, sporlandığı ve parasporal kristal ürettiği Aly ve ark. (1985), Khawaled ve ark. (1989) tarafından bildirilse de bu durum doğal koşullarda

gözlemlenmemiştir (Lacey, 2007). Buna sebep olarak da bakterinin kavrada kendini yenilemesine fırsat bulmadan habitattaki diğer böcek ve larvalar tarafından yenilmesi, bu duruma ilaveten diğer bakteri, mantar ya da protozoon türlerinin kavrada kolonize olmaları gösterilmektedir (Aly ve ark., 1985; Mulla ve ark., 1990). Bti'nin etkinliğini dolaylı olarak attıran bir diğer unsurda Bti'nin uygulandığı yerlere yumurta bırakmaları için dişileri etkilemiş olmasıdır. *Aedes albopictus*'larla yapılan bir çalışmada Bti uygulanan su kaynakları, Bti uygulaması yapılmayan kaynaklara kıyasla dişiler tarafından ovipozisyon için daha çoktercih edilmiştir (Stoops, 2005). Bti arazi çalışmalarında bitki örtüsü de larvasitlerin etkisini de engelleyici yönde bir etki göstermektedir(Lacey, 1998).

2.5. Ağır Metallerin Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri

Ekosistemde organik kirleticiler ve ağır metallerden birincil olarak etkilenen canlılar bakteri ve funguslardır. Çünkü bu organizmalar biyotransformasyon ve biyobirikimde anahtar role sahiptirler. Bugüne kadar 200'den fazla bakterinin ve yaklaşık olarak 50 fungusun genomu tanımlanmıştır. Bu genomlar küçük boyutları ve basit olmaları nedeniyle protein seviyesindeki değişikliklerin belirlenmesinde önemli modellerdir. Son yıllarda yapılan protein çalışmaları, ağır metal kirliliğine karşı mikroorganizmaların proteinlerin oluşturduğu hücrenel yanıtın bulunmasına odaklanmıştır (Dowling, 2006; Lestan ve Suhadolc, 2003).

Topraklardaki ağır metallere ve kimyasalların miktarları topraktaki normal başlangıç değerlerinden fazla ise mikro kirleticiler olarak bilinirler. Topraktaki mikrokirleticiler serbest iyon haline geçtiklerinde taban suyuna karışıp suyun niteliğini bozarlar. Bitkilerinde yapısına giren bu kirleticiler besin zinciri ile ekosistemdeki tüm canlılar için tehdit oluştururlar. Ağır metallere özellikle belirli dozlardan itibaren canlılardaki fizyolojik fonksiyonları ve biyokimyasal olayları direkt veya dolaylı olarak etkilediği bilinmektedir. Bu durumda kimyasallara karşı mikroorganizmalar sporlaşma vb. gibi direnç mekanizmaları oluştururlar (Çevre mevzuatı, 2006; Rosen, 2002). Metal ihtiva eden çevrelerdeki seçici baskılar, tüm toksik metallere karşı belli direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasını sağlamıştır (Choudry, 2007). Bu direnç mekanizmalarının büyük bir kısmı plazmid kökenlidir. Bu konuda çalışılan mikroorganizmalar daha çok *Staphylococcus*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus* türlerini kapsamaktadır (Rouch, 1995; Panak ve ark., 1999). Bti ürettiği toksin proteininden dolayı stres faktörlerinin yoğun olduğu ortamlarda yapılan çalışmalarda tercih edilen mikroorganizmalardan biridir (Nies, 1999).

Ağır metallere çoğu, d orbitallerinin dolu olması sebebiyle geçiş elementleri olarak bilinirler. D orbitalleri ağır metal katyonlarının redoks tepkimelerine girebilen veya

giremeyen herhangi bir bileşik ile karmaşık yapı oluşturmasını sağlamaktadır. Bundan dolayı, ağır metaller, iz element olarak karmaşık pek çok biyokimyasal reaksiyonda önemli görev üstlenir. K(I), Mg(II), Mn(II), Ca(II), Cu(II), Zn(II), Na(I), Ni(II), Co(II), Cr(VI) ve Fe(II) gibi metaller esansiyeldir ve besiyerlerine eklenmeleri gerekmektedir. Bu metaller, redoks tepkimelerini katalizlemeye yardımcı olan mikrobese görevindedir. Böylece moleküllerin elektrostatik etkileşimlerinin kararlılığını ve ozmotik basıncın kontrolünü sağlamak için enzimlerin bileşenleri olarak kullanılırlar. Fakat Ag(I), Cd(I), Pb(II), Al(I), Hg(II) ve Au(II) gibi ağır metaller biyolojik önem taşımadıklarından esansiyel değildirler. Bununla birlikte, besinsel değerleri olmayan bu metallerin mikroorganizmalara toksik etkisinin fazla olduğu bilinmektedir. Bu toksik metaller önemli hücresel bileşenlerle kovalent ve iyonik bağlarla etkileşime girmektedirler. Esansiyel olan ve olmayan bütün metaller yüksek konsantrasyonlarda hücre zarında hasara neden olup, enzim özgünlüğünü değiştirebilirler. Aynı zamanda hücresel fonksiyonları bozabilir ve DNA'nın yapısına zarar verebilir. Bu nedenle metallerin bütün canlı hücrelerin metabolizmalarının dengede tutulmasında çok önemli bir yer oluşturduğu kabul edilmektedir (Hughes, 1989; Ji, 1990; Nies, 1999; Bruins, 2000). *Bacteroides* ve *Clostridium* türlerinde de civa ve organocivalar için dirençlilik bildirilmiştir. Metallerle karşı direnç mekanizmaları prokaryotik hayat başladıktan hemen sonra gelişmiştir. Çünkü bakterilerin geliştiği ortamlarda metaller her zaman var olmuşlardır (Harnet, 1995; Ji, 1984). Metal dirençlilik mekanizmaları, genellikle antibiyotik direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmektedir (Karagöz, 2004). Çünkü her iki tip dirençde organizmalar arasında konjugasyon veya transdüksiyon ile transfer gerçekleşmektedir. Bazı durumlarda, metal dirençliliği ile antibiyotik dirençliliği aynı plazmid kökenli olabilmektedir. Metal dirençliliği ise antibiyotik kullanımından önce rapor edilmiştir (Harnet, 1984; Gassman, 2009). Hücre için besin olarak alınan bazı metaller yüksek derişimlerde olduğunda ise hücre için toksik etkiler yapmaktadır. Kobalt, nikel, bakır ve çinko böyledir (Ji ve ark., 1995). Hücre için gerekli olan bu metaller, pek çok enzimin yapısındaki kofaktörleri oluştururlar. Bazı metaller hücrenin oksidasyon redüksiyon sistemlerinde kullanılır. Bazı metaller gen ekspresyonunda ve biyomoleküllerin aktivitesi için önemli görevler üstlenmişlerdir (Castro-Silva, 2003).

Ağır metal içeriği yüksek olan atık sular tekstil, deri, boya, metal ve kâğıt endüstrilerinden kaynaklanmaktadır. Arıtımı yapılmaksızın kontrolsüz bir biçimde çevreye bırakılan bu atık sular, o habitattaki tüm canlılar için toksik ve mutajenik etkiye sahiptir. Bazı organizmalarda canlılığın devam etmesi için iz miktarda kullanılan bazı metallerin yüksek yoğunlukları hücrelere zarar verebilmektedir. Pb(II), Au(II), Cd(I), Ag(I), Al(I) ve Hg(II) gibi

toksik metaller biyolojik öneme sahip değildirler ve çok düşük konsantrasyonda dahi bulunmaları hücreler için tehlike arz etmektedir (Bruins ve ark., 2000; Nies, 2003). Bu sebepten ağır metal ihtiva eden ortamlardan ağır metalin uzaklaştırılması ile ilgili çalışmalar artmaktadır. Bazı çalışmalarda, ağır metallerin çeşitli mikroorganizmalar kullanılarak endüstriyel atık sularından uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Mikroorganizmalar ağır metallere karşı direnç geliştirerek toksik, karsinojen ve mutajen olabilen ağır metal iyonlarına tolerans gösterir ve bu kirleticileri ortamdaki uzaklaştırabilirler. Geliştirilen bu direnç mekanizmaları ağır metallerin mikroorganizmalar tarafından hücre içine alınmaması, hücre içinde veya dışında tutulması, kirleticinin daha az toksik forma çevrilmesi, metalin hücre dışına aktif taşınması ve mikroorganizmanın metale karşı daha duyarsız hale gelmesi şeklindedir (Bruins ve ark., 2000; Malik, 2004; Sultan ve Hasnain, 2006). Ağır metallere karşı direnç geliştiren mikroorganizmalar, yukarıda bahsedilen sistemlerinden birini veya birkaçını kullanabilir. Bu yolla ağır metalin toksik etkilerinden korunmaya ve canlılığını sürdürmeye çalışmaktadır. Bu süreçte stres faktörüne cevap olarak sentezlenen bazı proteinler anahtar role sahiptir. Ağır metal stresindeki bir mikroorganizma bu stresle baş edebilmek ve dayanıklılık sağlamak için bazı proteinlerin sentezini arttırır (Tosunhowong, 2005; Kılıç, 2008). Bu proteinler hem hücre içinde sentezlenen sitozol proteinlerini ve zar proteinleriyle birlikte hücre dışı bileşenlerini de içerebilmektedir. Bu tip proteinlerin tanımlanmasıyla stres faktörlerine mikrobiyal cevabın belirlenmesi ancak protein çalışmaları ile mümkün olmaktadır (Sharma ve ark.,2006; Schmidt ve ark., 2005).

1995 yılında bir genomun proteomun tanımlanması ile ilk kez proteom terimi kullanılmaya başlamıştır. Genom proteoma kıyasla değişmezken, yüksek dinamizme sahip proteom değişiklik gösterebilir. Bu değişiklik çevresel koşullardan, çeşitli stres faktörlerinden ve aynı zamanda hücrenin fizyolojik durumundanda kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte, farklı ortam koşullarında genom sabit kalırken farklı organizmalar farklı proteomlar bulundurabilir. Proteom çalışmaları belli koşullarda organizmanın, özel bir dokusunun veya herhangi bir hücresel kısmının proteinlerindeki değişiklikleri belirleyebilmektedir. Bu tip çalışmaların iki önemli hedefi vardır. İlki, hücrelerden elde edilen proteinlerin tanımlanması, ikincisi ise tanımlanan proteinlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesidir. Bu iki amaca ulaşmada kütle spektrofotometri (MS) önemli bir araç olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmalarda proteinler öncelikle izoelektrik noktalarına (birinci boyut) ve daha sonra molekül ağırlıklarına (ikinci boyut) göre ayrılırlar. Bu şekildeki ayırma yöntemine iki boyutlu jel elektroforezi (2D jel elektroforezi) adı verilmektedir. MS analizinden önce proteinler denatüre edilir ve enzimlerle sindirilir. Proteinlerin sindirilmesinde tripsin enzimi yaygın olarak

kullanılmaktadır. Peptid örnekleri de kütle spektrofotometrisinde ölçülmektedir. Bütün bu basamaklar sonucunda, bir mikroorganizmanın bütününe, özel bir dokusunun veya herhangi hücrel bir kısmının proteinlerindeki değişiklikler belirlenebilmektedir (Rabilloud, 2000; Kolker, 2006).

Proteom çalışmaları, bir hücrenin, dokunun veya organizmanın genomundan yazılan proteinlerin araştırılması olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmalar toksisite ile ilgili protein veya protein gruplarının tespit edilmesine de yardımcı olmaktadır. Ayrıca bu proteinler, toksik kirleticilerin ortaya çıkarılmasında biyolojik işaretleyici olarak da kullanılabilir. Farklı stres koşullarında bir mikroorganizma tarafından üretilen proteinlerin karşılaştırılması, o mikroorganizmaya ait proteom farklılıklarını ortaya koymaktadır. Bu koşullarda sentezi artan veya azalan proteinlerin tanımlanması organizmaların stres ortamına verdiği yanıtın moleküler mekanizmasının açıklanmasına yardımcı olmaktadır. Farklı çevresel koşulların organizmalara etkisinin araştırıldığı proteom çalışmaları, bütün proteinleri veya tek bir hedef proteini kapsayabilmektedir. Bu kapsamda bütün protein analizlerinde araştırmacılar maksimum sayıda protein elde edip tanımlamayı amaçlarlar. Fakat tek bir hedef proteini kapsayan bir çalışmada ise, bu protein bir organel, hücre çekirdeği veya bir sinyal yolu elemanı gibi hücrel bileşenlerden bir tanesi olabilmektedir (Nesaty ve Suter, 2007).

Proteom analiziyle mikroorganizmaların ağır metal stresine karşı oluşturdukları cevabın belirlenmesiyle ilgili çalışmalar henüz çok yenidir. Bununla birlikte ağır metal stresine maruz kalan mikroorganizmaların verdiği yanıtın ve savunma mekanizmalarında kullandıkları proteinlerin araştırıldığı bazı proteom çalışmaları da bulunmaktadır.

Vido ve ark., 2001'de *Saccharomyces cerevisiae* mayasını, Cd(II) stresine maruz bırakarak maya hücrelerinin ağır metale stresine karşı hücrel yanıtını proteom analizi ile belirlemişlerdir. Çalışma sonunda, maya hücrelerinin ağır metal stresine cevaben 54 proteinin sentezini arttırdığını ve 43 proteinin sentezini azalttığını belirlemişlerdir. Özellikle sülfür içeren aminoasitlerin biyosentezi ile ilgili enzimlerin yapımının arttığı görülmüştür. Aynı zamanda araştırmacılar, antioksidant özelliğe sahip bazı proteinlerin Cd(II) iyonlarına maruz bırakılan maya hücreleri tarafından daha fazla sentezlendiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda tiyoredoksin ve tiyoredoksin redüktaz gibi proteinlerin sentezinde de artış görülmüştür. Araştırmacılar sentezi artan bu proteinlerin *Saccharomyces cerevisiae*'nin Cd(II) iyonlarına karşı hücrel savunma mekanizmasında esansiyel olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada Cu(II) iyonlarının ortamda demirin varlığında *Acidithiobacillus ferrooxidans*'ın protein sentezi üzerine etkisinin araştırıldığı denemelerde organizmanın zar ve periplazma protein sentezine 200 mM Cu(II)'nin ne şekilde etki edeceği araştırılmıştır. *A. ferrooxidans* Cu(II)

içeren ve içermeyen iki farklı ortamda geliştirilerek bakterinin proteinleri izole edilmiş ve protein profillerindeki farklılıklar 2D jel elektroforezi ile tespit edilmiştir. Sonuç olarak Cu (II) içeren ortamda bakterinin bazı proteinlerinin sentezi azalırken bazılarının arttığı görülmüştür. Düşük molekül ağırlıklı proteinlerin Cu(II) iyonları içeren ortamda, düşük molekül ağırlıklı proteinlerin sentezi belirgin bir şekilde düşüş göstermiştir. Bu proteinlerin asidik proteinler ve dış zara ait elemanlar olabileceği ileri sürülmüştür. Bunun yanı sıra aynı stres ortamında rustiksiyanin proteinin daha fazla sentezlendiğini tespit etmişlerdir. Rustiksiyanin, periplazmik bir proteindir ve demir oksidasyon yolunun elektron taşıma zincirinde görev almaktadır. Bu nedenle araştırmacılar bakterinin Cu(II) iyonlarına karşı iki yolla cevap verdiğini belirlemişlerdir. Birincisinde Cu(II) iyonlarına karşı geçirgenlik azalırken, ikincisinde ise Cu(II) periplazmada sentezi artan protein tarafından tutulmaktadır (Felicio ve ark., 2003).

Çeşitli *Bacillus* türlerinin sporlarıyla enzimatik Mn(II) oksidasyonu çalışılmış, Mn(II) oksitleyen enzimler belirlenmiştir. Ağır metal içeren ortamlardan *Bacillus* spp. izole edilmiş, SDS-PAGE ile protein profilleri ortaya çıkarılmıştır. Mn(II)'ı oksitleyen spor proteinleri belirlenmiştir (Chris ve Bradley, 2002). *Bacillus sphaericus* bakterisinin ise bazı kimyasallara olan yönelimi, kemotaksis proteini (metil bağlayan 53 kDa) baz alınarak incelenmiştir (Andrew ve ark., 1993, 1994). Başka bir çalışmada *Bacillus sphaericus* JG-A12'nin yüzey tabakasında uranyum ve diğer metalleri tutma yeteneği olduğundan faydalanılarak, exafs spektroskopisiyle yüzey proteinlerine tutunan uranyum ve karboksil, fosfat grupları incelenmiştir (Merroun ve ark., 2004).

Ni(II) iyonlarının *Streptomyces acidiscabies* bakterisinin hücre içi protein sentezine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada mikroorganizma Ni(II) içeren ve içermeyen iki farklı besiyerinde geliştirilmiştir. 2D jel elektroforezi kullanılarak protein sentezindeki farklılıklar belirlenmiştir. Ni(II) varlığında glikoliz ile ilgili bazı enzimlerin sentezinde artış, demir ihtiva eden süperoksit dismutazın sentezinin inhibe edildiği tespit edilmiştir (Schmidt ve ark., 2005). *Streptomyces coelicolor* bakterisi ile yapılan çalışmada ağır metal içeren ve içermeyen ortamlarda bakterinin yanıt mekanizması çalışılmıştır (Ahn ve ark., 2006). *Pseudomonas fluorescens*'in ağır metal stresine karşı geliştirdiği direnç mekanizmasının proteinlerin proteom analizi ile ortaya çıkarmışlardır. Çalışmada çeşitli ağır metallere maruz bırakılan bakteri, farklı olarak sentezlenen proteinleri 2D jel elektroforezi ile belirlenerek, MS ile ise tanımlanmıştır. Bakteriye Pb(II) ve Cu(II)'nin etkisi spo VG ile enolaz proteinlerinin enzimi sentezinin arttığı, buna rağmen bakteri canlılığının azaldığı görülmüştür. Co(II) ağır metale maruz kalan bakteride ise varolan proteinin sentezinin azaldığı, ksilotransferaz, ORF 18 faj,

OMP H1 ve translasyonel uzama faktör (EF-Tu) gibi proteinlerin ise sadece Co(II) metaline maruz kalındığında sentezinin olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, ortamda ağır metal etkisine maruz bırakılan bakterinin tanımlanan proteinleriyle ağır metal stresine karşı bir savunma mekanizması geliştirdiği gözlemlenmiştir (Sharma ve ark., 2006; Rossbach, 2000). Başka bir çalışmada ise Bar ve ark., 2007 yılında, ağır metallerle kirletilen ortamlardan izole ettikleri ve *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımladıkları mikroorganizmayı, Co(II) ve Pb(II) içeren ortamlarda geliştirmişler. Bunun sonucunda bakterinin sentezlediği farklı proteinlerin olduğu görülmüştür (Özcan ve ark., 2007). *Phanerochaete chrysosporium* fungusunun Cd(II) ve Cu(II) muamelesine bırakılmasına verdiği yanıtı proteom analiziyle açıklamışlardır. ATP-az, ribozomal protein S7, 3 adet ribozomal protein ile flavonol/sinnamolil-CoAredüktaz, ribozomal protein S21'e ve uzama faktör EF-1 alfa alt ünitesi gibi proteinlerinin sentezinin daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Hg(II)'ye dirençli olduğu bilinen *Pseudomonas putida* suşları incelenerek yüksek yoğunlukta Hg(II)'ye maruz kalan bakterinin toplam hücresel proteinlerinde çok az bir değişim belirlenmiş, hatta zara ait taşıyıcı proteinlerinde değişiklik var olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu çalışmaya göre, yüksek konsantrasyonda ağır metalin var olduğu ortamda kation akışını sağlayan taşıyıcı proteinlerin yapımı neredeyse 45 kat fazla olurken, buna rağmen zar proteini olan porinin yapımı 106 kat azaldığı görülmüştür. Stres şartlarında enerji metabolizması ile ilgili herhangi bir proteinin diğerlerinden daha fazla sentezlendiğiyle ilgili bir sonuca ulaşmamışlardır (Leonhäuser ve ark., 2007). Shilev ve ark., 2007 yılında yaptığı çalışmada arsenata dirençli *Pseudomonas fluorescens* bakterisinin arsenat varlığında ve yokluğunda proteom analizi ile toplam proteinlerini belirlemişlerdir. 1000 ppm arsenat varlığında, dirençli olan bakteri 9 adet proteinini farklı ve 4 adet proteinini yeni sentezlediği, bunun yanı sıra 4 adet proteinin sentezini de arttırdığı, 1 proteinin sentezinde azalttığını tespit etmişlerdir.

Bazı bitkiler ve bakteriler kullanılarak disiplinler arası çalışmalar da yapılmıştır. *Brassica juncea* bitkisinin yetiştirildiği ortama farklı Cr konsantrasyonları uygulanan çalışmada, bitkilerin topraktaki ağır metalleri bünyesine kökleri yardımıyla Cr'a dirençli *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. bakteri türlerini kullanarak yapılan ilgili çalışmalar mevcuttur (Rajkumar ve Lee, 2004; Srinath, 2002). *Bacillus sphaericus* hücreleri ve sporları kullanılarak ağır metallerin biyosorpsiyonu çalışılmış, uranyum ve bakırın ortamdaki tamamen emiliminin sağlandığı görülmüştür (Soltmann, 2003).

Ağır metallerle ilgili toprak ve su ortamlarından izole edilen ağır metale dirençli mikroorganizmaların belirlenmesi ve metal tolerans mekanizması ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar endüstriyel alanlarda kirliliği önlemek amaçlı mikroorganizmaların

kullanabileceği konusunda aydınlatıcı olmuştur (Seget, 2005; Chovanova, 2004; Nourbakhsh, 2002; Zouboulis, 2004; Kannan, 2005; Lee, 1998; Alm, 2003).

2.6. Ağır Metallerin *Bacillus thuringiensis var. israelensis* Üzerine Etkisi

Değişen ve gelişen dünyanın vazgeçilmez bir parçası olan sanayi ve madencilik çalışmaları, ağır metal kirliliğinin en büyük sebeplerinden biridir. Ağır metaller; yoğunluğu 5 g/cm³'den büyük olan, canlılara toksik etkileri olan metallerdir (LarsJärup, 2003). Periyodik tablodaki 90 elementin; 21 metal olmayan, 16 hafif metal ve 53 ağır metal olarak tanımlanmaktadır.

Kobalt, civa, bakır, arsenik, çinko, kadmiyum, kurşun, krom gibi metallerinde dahil olduğu 60'a yakın ağır metal var olduğu düşünülmektedir (Kahvecioğlu ve ark., 2003). Tahminen 5000 yıldan bu yana insanlar tarafından farklı amaçlarla kullanılan ağır metallerin bilinen ilk endüstriyel kullanımları olarak taşıma boruları, yapı materyali, seramik ve cam yapımı ve olarak başlamıştır. Sanayi devrimiyle bu metallerin kullanımında eskiye oranla ciddi bir artış olmuş, yüksek miktarda yoğun konsantrasyonlu ağır metallerin doğal kaynaklara karışmasına sebep olmuştur. Sanayi devriminden günümüze bakıldığında ise katlanarak devam etmekte olan maden sanayi faaliyetleri ve şehirsal atıklar çevreye ağır metal yayılımına yoğun bir şekilde neden olmaktadır. Çevreye zarar veren ağır metaller yüzeysel olan yeraltı su kaynakları, su akıntıları, ve asit yağmurlarıyla deniz ve göller gibi sucul ortamlara taşınarak buralarda diplerinde birikime sebep olurlar. Doğaya zarar veren bu metaller ilk olarak sedimentte birikir ve sedimentin adsorbsiyon kapasitesinin aşılmasıyla sulara birikime artarak devam ederler. Gelişmiş ülkelerde artmaya devam etmekte olan bu ağır metallerin ekosistemde birikimi ve yayılımı, daha gelişmiş ülkelerde son zamanlarda azalma olduğu kaydedilmiştir. Bu metaller içerisinde en fazla olumsuz etki gösterenleri civa, kurşun, arsenik ve kadmiyumdur (LarsJärup, 2003). Mikroorganizmaların yapısına zarar veren bu kirlilik hücre duvarı, protein yapısı, nükleik asit ve yaşamsal sistemleri üzerinde olumsuz sonuçlara neden olarak yaşam süreçlerini ve döngülerini olumsuz yönde etkilemektedirler. Ağır metal kirliliğine maruz bırakılan mikroorganizmalar ölüm, biyoçeşitliliğin bozulması ve türün tamamen ortadan yok olması gibi tehditlerle karşı karşıya kalmaktadır. Fakat bazı mikroorganizmalar, geliştirdikleri farklı sistemler ile ağır metallerin olumsuz etkilerinden korunmaya çalışmışlardır. Ağır metale direnç gösteren genler kromozom ya da plazmidler üzerinde bulunabilir. Mikroorganizmalar, hücre bileşenlerinde gösterdikleri yapısal değişiklikler ve sentezledikleri yeni bileşenler ile ağır metallere karşı direnç gösterirler. Yapılmış bazı çalışmalarda ağır metal kirliliğine maruz kalınan ortamlarda

dirençli farklı, hatta yeni türlerin varlığı rapor edilmiştir (Filali ve ark., 2000; Li ve Ramakrishna, 2011; Roosa ve ark., 2014). Mikroorganizmaların ağır metal stresine geliştirdikleri direnc tespit edilirken kültürel yöntemler, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), genom sekansı, DNA probları, Western blotlama ve protein elektroforezi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Kültürel yöntemler daha çok ağır metal tuzlarını ihtiva eden ortamlarla mikroorganizma izolesi ve farklı metallerle büyüme şartlarının gözlemlenmesi amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu çalışmalarda her bir ağır metal için ayrı ayrı ortamlarla karıştırılarak test edilebildiği gibi birden fazla metali aynı anda ortama ilave ederek farklı, çoklu direnç denemeleri çalışmaları da yapılabilir. Katı veya sıvı besi ortamları çalışmaları belirlerken kullanılabilir. Ağır metal direncini belirlediğimiz bakterinin, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu (MİK) belirlenmesi de gerekir. MİK tayini farklı oranlarda ağır metal içeren katı veya sıvı besiyerilerinde yapılarak belirlenebilir (Hassen ve ark., 1998).

Ağır metal direnç tespitinde moleküler yöntemler de kullanılan diğer farklı yöntemdir. Moleküler yöntemlerde ağır metal direnç genlerinin varlığının taranmasında yaygın olarak PCR kullanılır. Bunun yanında genom sekansı poliakrilamid jel elektroforezi, DNA probları ve Western blotlama gibi yöntemleride kullanılmaktadır. PCR metodu incelenirse ağır metal direnci sağlayan genlere spesifik primerler seçilir, PCR ile çoğaltılıp görüntülenerek ilerler. Kültürel ve moleküler yöntemlerin direnç varlığında aynı anda çözümlenmesi, derecesini ve bu dirençten sorumlu genin ifadesinin sonuçlarına ulaşılabilmektedir. Ağır metal kirliliğine maruz kalan sucul ortamlar, sedimentleri ve atık sularından izole edilen mikroorganizmalarla ilgili çalışmalarda kurşun, krom, kadmiyum, kobalt, arsenik, çinko, civa, bakır, mangan, magnezyum, selenyum gibi metallerle karşı dirençlilik tespiti elde edilmiştir. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus arsenicus*, *Streptococcus sp.*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Providen ciarettgeri*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus pasteurii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *B. pumilis*, *B. indicus*, *B. clausii*, *Planococcus maritimus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, ve *Staphylococcus sp.* gibi Gram negatif ve pozitif birçok türde ağır metal direnci var olduğu görülmüştür (Hassen ve ark.,1998, Filali ve ark., 2000, Nithya ve ark., 2011). Minimum inhibisyon konsantrasyonu yani MİK ise 0,02 – 400 mM/L arasında olduğu bulunmuştur (Hassen ve ark., 1998, Li ve Ramakrishna, 2011). Çalışılan bazı mikroorganizmalarda aynı anda birden fazla ağır metale karşı direnç varlığına rastlanmıştır

(Filali ve ark., 2000). Ağır metal direncinin belirlenmesinde çeşitli gen bölgelerinden yararlanılarak yapılır. Kurşun direnci *pbrT*, civa *merA*, *merB*, *merC*, *merD*, *merR*, *merP*, *merT*, Arsenik *arsA*, *arsB*, *arsC*, *arsD*, *arsR*, bakır *copA*, *copB*, *copY*, *copZ*, kadmiyum *cadA*, *cadB*, *cadC* krom *chrA*, *chrB* nikel-kobalt-kadmiyum *nccA*, *chrA*, *chrB*, kobalt-çinko-kadmiyum *czcA*, *czcB*, *czcC*, *czcD* gen kısımları uygun primerlerle çoğaltılarak görüntülenmiştir (Roosa ve ark., 2014; Abou-Shanab ve ark., 2007; Rouch ve ark., 1995; Bruins ve ark., 2000).

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* (Bti) ile ilgili yaptığımız literatür çalışmalarında stres çalışmaları mevcut olmasına rağmen ağır metalin etkisi ile ilgili çalışmalar yetersiz kalmaktadır.

Bti, Chromosorb 101 yani yeni bir sıvı faz ayırıcısı olan kolon kromatografisi yönteminde çevrede çok miktarda bulunan Cd(II), Mn(II), Ni(II), Co(II) gibi ağır metallere çalışılmış, Bti kolonda 100 kez üst üste kullanılmıştır (Mendil ve ark., 2008). Hassen ve arkadaşları tarafından 1997 yılında *Pseudomonas aeruginosa* ve *B. thuringiensis* üzerine ağır metallere etkisi (tüm sülfat tuzlarının etkisi) çalışılmıştır. Başka bir çalışmada ise Bti, ağır metal iyonlarının ön konsantrasyonu için yeni adsorban olarak Dowexoptipore V-493 üzerine yüklenmiş, Bakır (II), demir (III) ve çinko (II) 'nin pH, adsorban miktarı, numune hacmi vb. de dahil olmak üzere kantitatif geri kazanımlarının analitik şartları araştırılmıştır (Tüzen, 2008). Bakterilerdeki ağır metal stresi konusu, mikrobiyologların dikkatini çekmeyi başarmıştır. Çünkü bakteri direnç mekanizmaları, farklılıkları önemli biyolojik çalışmalardandır. Ağır metallere çevreye verdikleri hasarlar endüstriyel, zirai uygulamalar sonucunda dağılır ve yayılımı sucul ve karasal sistemlerde birikime sebep olmaktadır. Ağır metallere sebep olduğu kirletilmiş çevrelerden izole edilmiş bakteriler ağır metallere toksik etkilerine karşı farklı mekanizmalarıyla direnç kazanmışlardır. Karasal ve sucul çevrelerden ağır metallere birikiminin uzaklaştırılması teknikleri, etkisi yüksek biyolojik metotlardır. Biyomadencilik, biyoremediasyon ve atık su arıtım tesislerinde biyolojik kütle içerisinde karmaşık formda bulunan ağır metallere farklı şekillerde değerlendirilebilir.

Ağır metal dirençliliğini kodlayan genler bunun yanısıra antibiyotik dirençliliğinde de etkilidir. Bu sebeple bu mikroorganizmalar sağlık sektöründe de ciddi bir önem arz eder. Ağır metallere antibiyotiklerin keşif edilmesinden önceki yıllarda ağır hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmış ve bundan dolayı patojen mikroorganizmaların da ağır metal dirençliliği geliştiği görülmüştür. Plasmid transferi ile bu plasmidler üzerinde bulunan direnç

genleri özellikle tür içi ve türler arasında taşınabilir ve patojenitenin artışına sebep olabildiği kaydedilmiştir. Ağır metal dirençlilik mekanizmaları tam olarak önemi anlaşılması için, kirletilmiş çevrelerin temizlenmesinde çevre dostu sistemler kullanılarak düşük kimyasal içerikli madenlerden yüksek kalitede ürün verimli elde edilmesiyle patojen mikroorganizmalara karşı etkinliği yüksek yeni ilaçlar geliştirilebileceği sonucu elde edilmiştir (Yavuz, 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada Sinop Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarından temin edilen, Van ili topraklarından izole edilen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* suşu kullanıldı. Çalışmada kullanılan ağır metaller (Merck) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, MnCl_2 , LiCl_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ Sinop Üniversitesi Araştırma Laboratuvarlarından temin edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteri Stok Spor Süspansiyonlarının Hazırlanışı

Bti suşu 6 adet steril petride NYSM agar (ek 1) besiyerine çizgi ekim yapıldı ve 7 gün etüvde bekletildi. Sporulasyon faz kontrasyon mikroskobu ile değişik zamanlarda örnekler alınmak suretiyle incelenerek canlılığı kontrol edildi. Bakteri sporları petri yüzeyinden steril serum fizyolojik su ile toplanarak sonuç spor konsantrasyonu 2.73×10^8 spor/mL olacak şekilde stok spor solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan spor stok solüsyonu denemeler yapılincaya kadar $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

3.2.2. Örneklerin Yapılışı

İçerisinde 100 mL NYSM broth (ek 2) besiyeri bulunan erlenmayerlerden her ağır metal için 5'er adet hazırlandı. Konsantrasyonları 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.5 M ve Kontrol grubu şeklinde oluşturuldu. Bu şekilde her kimyasaldan hesaplamalar sonucunda gerekli miktarlarda kontrol olarak kimyasal içermeyen ve *Bti* aşılınmış kültürler kullanıldı. Hazırlanan erlenmayerlere stok çözeltiden 100 μL alınarak her birine ekim yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri etüvde 48 saat bekletildi.

Gelişmeye bırakılan bakteri kültürlerinden 12, 24 ve 48 saatlik süre sonunda örnekler alınıp steril ependorf tüplerine transfer edildi. Alınan örnekler bakteri sayımı, protein ekstraksiyonu ve elektroforez işlemi yapılincaya kadar -70°C 'de saklandı.

3.2.3. Faz-Kontrast Mikroskopik Çalışmalar

Uygulanan kimyasalların her bir konsantrasyonu için 24 ve 48 saat sonundaki bakteri gelişimi ve sporulasyonunu incelemek için taze preparatlar hazırlanıp faz-kontrast fotoğrafları çekildi. Bakteriye en etkili ve etkisi en az olan ağır metal örneklerinin fotoğrafları paylaşıldı.

3.2.4. Elektroforez İçin Örneklerin Hazırlanışı

Ağır metal uygulanan bakteri kültürlerinden 24 ve 48 saatte alınıp, -20°C 'de saklanan örneklerden 10 mL alındı, 3000 rpm de 3 dk 3 kez santrifüj edildi. Altta kalan pellet kısım toplam hücre proteinlerin ekstraksiyonu için ependorf tüplerine transfer edildi. Ependorflara alınan pelte kısım, serum fizyolojikle 3 kez yıkandı, 15000 rpm de 3 dk santrifüj (Hanil Science Industrial, HM-150 IV, Japan) edildi ve 1:1 oranında SDS örnek tamponu olan numune tampon ile muamele edildi. Örnekler numune tamponuyla muameleden sonra elektroforez yapılincaya kadar -20°C 'de saklandı. Her bir bakteri kültüründen ekstrakte edilen toplam hücre protein ekstraktları çözümlenür proteinler elde edilmek amacıyla 80°C 'de 5 dk kaynatıldı. Örneklerden ve standart proteinden (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermantas, SM0661) 10 μL jele yüklenerek 1 mm kalınlığında dikey elektroforez tankında (Hoefler SE400, USA) %4'lük toplayıcı jel boyunca 20 mA ile %10'luk ayırıcı jelde 30 mA'lik sabit akım uygulanmış ve comassie brilliant mavi (R-250) boyası ile boyanarak belirlenmiştir. Toplam hücre proteinlerin ekstraksiyonunda ise Laemmli (1970)'nin modifiye yöntemi olan ve Berber ve ark. (2003) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. SDS PAGE uygulamasındaki solüsyonlar Ek 2'de verildi.

3.2.5. Proteinlerin Molekül Ağırlığının Hesaplanması

Elektroforez işlemi bittikten sonra elde edilen proteinlerin molekül ağırlıkları Totallab 1d Manual R11.1, UK yazılım programı kullanılarak hesaplandı.

3.2.6. Sayımların Yapılışı

3.2.6.1. Toplam Bakteri Sayımı

12, 24 ve 48 saat sonundaki toplam bakteri sayısının tespiti için -70°C 'de bekletilen bakteri örnekleri, içerisinde 900 μL steril serum fizyolojik su bulunan steril ependorflara 100 μL alınarak, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} oranında seri seyreltmeler

yapıldı. Her bir seyreltmeden steril petrilere 100 µL bakteri süspansiyonundan ilave edilip sterilize edilmiş NYSM agardan yeteri miktarda dökülerek petrideki bakteri süspansiyonunun besiyeriyle homojen şekilde karışması sağlandı. Daha sonra bu petrilere 37°C'lik etüvde 24 saat bekletilerek spor kolonilerinin gelişmesi beklendi. Bu süre sonunda 30-300 arası koloni içeren petrilere dikkate alınarak sayımlar yapıldı ve mL'deki vejetatif, spor, toplam bakteri sayısı belirlendi. Yapılan sayımlar üç paralelli olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.2.6.2. Spor Sayımı

12, 24 ve 48 saat sonundaki toplam bakteri sayısının tespiti için -70°C'de bekletilen bakteri örnekleri, içerisinde 900 µL steril serum fizyolojik su bulunan steril ependorflara 100 µL alınarak, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} oranında seri seyreltmeler 80°C de 10 dakika su banyosunda bekletilerek bütün vejetatif hücreler öldürüldü. Her bir seyreltmeden steril petrilere 100 µL bakteri süspansiyonu ilave edildikten sonra sterilize edilmiş NYSM agardan yeteri miktarda dökülerek petrideki bakteri süspansiyonunun besiyeriyle homojen şekilde karışması sağlandı. Daha sonra bu petrilere 37°C'lik etüvde 24 saat bekletilerek spor kolonilerinin gelişmesi gözlemlendi. Bu süre sonunda 30-300 arası koloni içeren petrilere dikkate alınarak sayımlar yapıldı ve mL'deki toplam bakteri sayısı belirlendi. Yapılan sayımlar üç paralelli olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.2.7. İstatistik Analiz

Her bir kimyasal için kimyasal konsantrasyonlarının spor sayısında fark olup olmadığını test etmek üzere ANOVA varyans analizi kullanıldı. Bütün analizler STATISTICA (2007, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

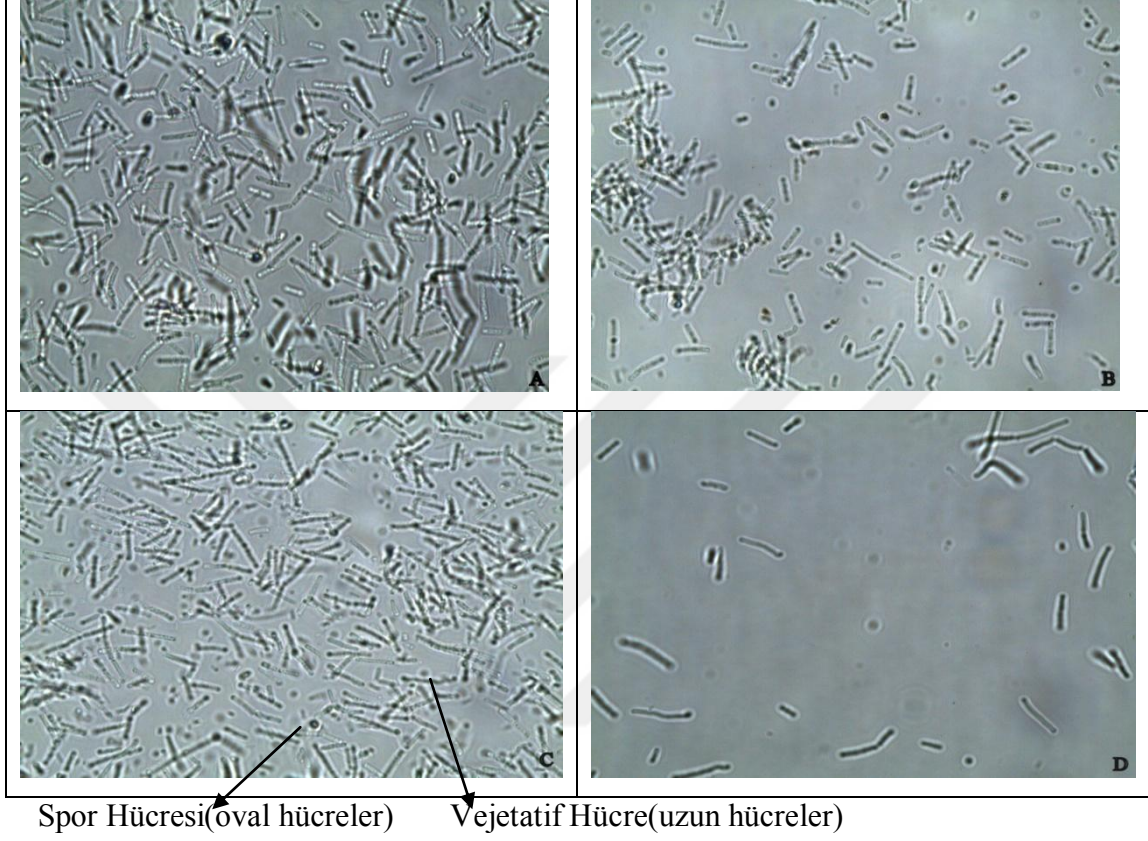
4.1. Faz Kontrast Mikroskopik Bulgular

Bu çalışmada 5 farklı kimyasalın *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*'in toplam hücre canlılığı üzerine etkileri incelendi. Yapılan faz kontrast incelemeleri sonunda *Bti*'nin vejetatif hücreden spor haline geçmesinde diğer 4 kimyasala göre daha az etkili olan LiCl_3 ve en fazla etkili olan ise ZnSO_4 olduğu görüldü. Uzun hücreler vejetatif hücreler, yuvarlak hücreler ise spor hücreleri olduğu tespit edildi.

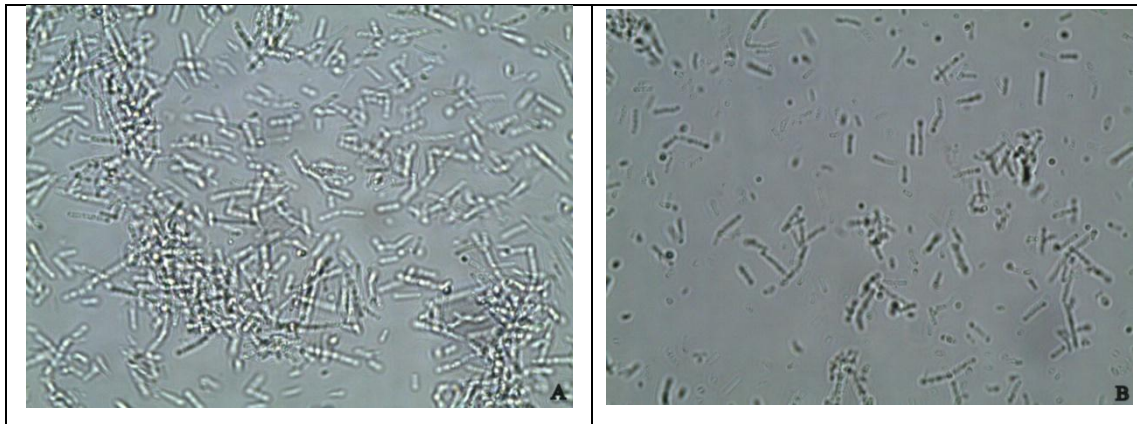
4.1.1. LiCl_3 'e ait Faz Kontrast Mikroskopik Bulgular

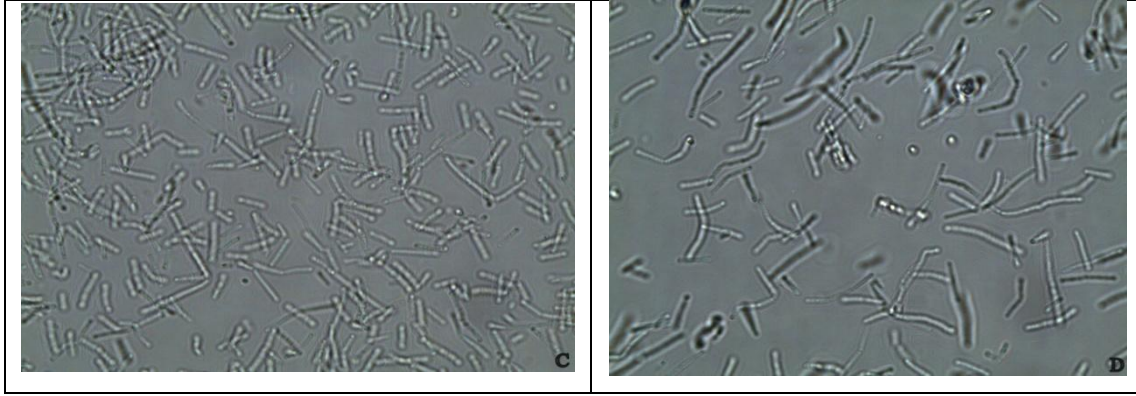
Yapılan LiCl_3 uygulamalarında 24. saatte vejetatif haldeki bakteri hücreleri 0.01M, 0.05 M mikroskop görüntülerinde sporlanma göstermediği, 0.1M'den itibaren çok az

sporlanma oluşumu görüldü. 48. saatte ise vejetatif hücrelerin boyutlarında değişimler görülmeye başlamasına rağmen sporlanma 0.1 M konsantrasyondan sonra olduğu görüldü (Şekil.4.1 ve Şekil 4.2.)



Şekil 4.1. 24. saatte LiCl_3 'ün Bti'ye olan etkisine ait A) Kontrol B) 0.01 M C) 0.1M D) 0.5 M faz kontrast mikroskop toplam hücre görünümü

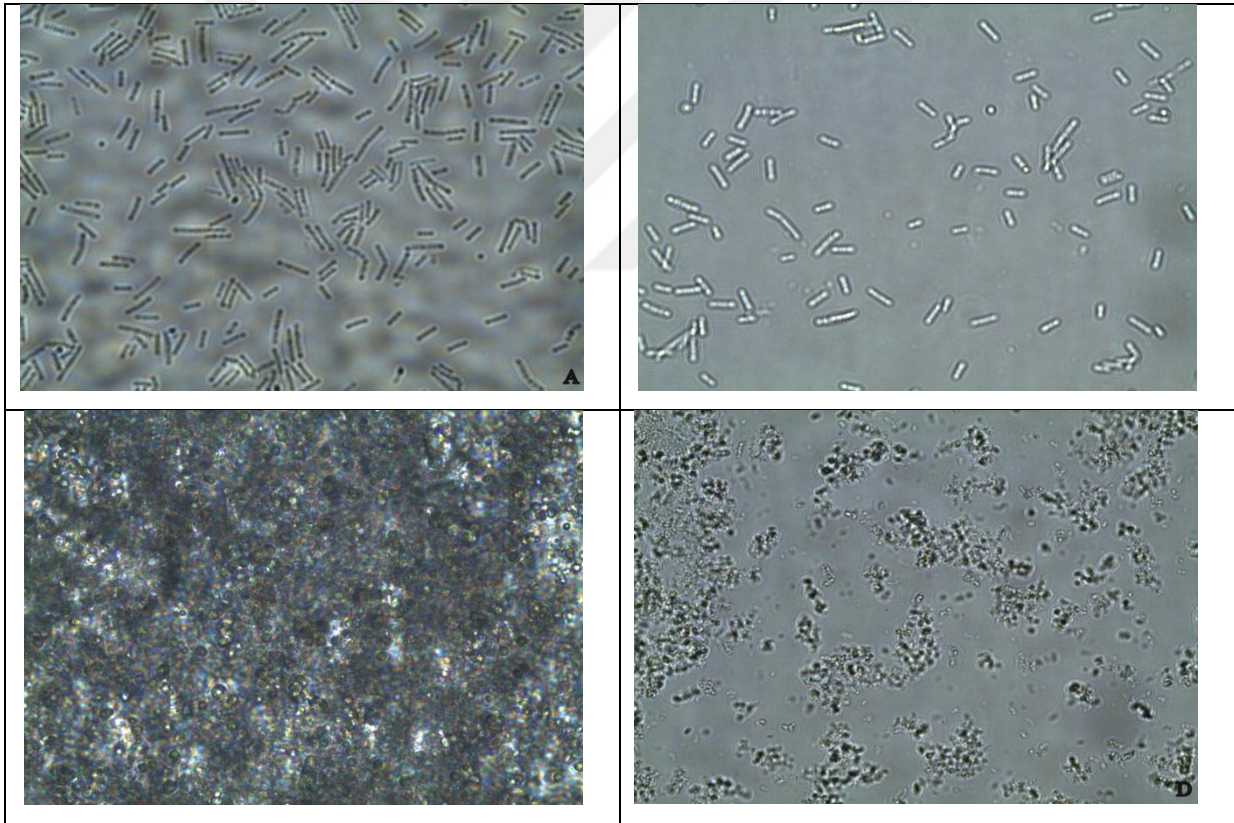




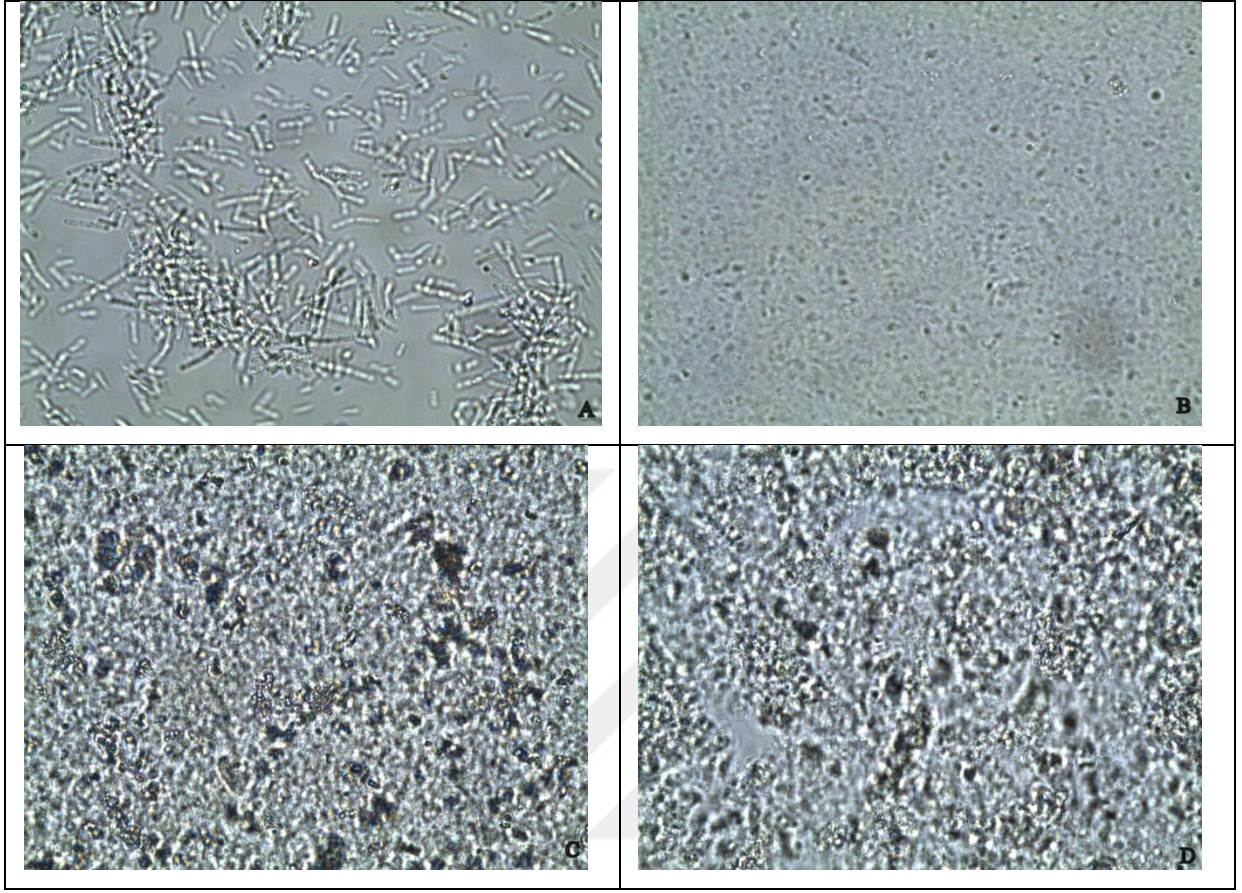
Şekil 4.2. 48. saatte LiCl_3 'ün Bti'ye olan etkisine ait A) Kontrol B) 0.01 M C) 0.1 M D) 0.5 M faz kontrast mikroskop toplam hücre görünümü

4.1.2. ZnSO_4 'e ait Faz Kontrast Mikroskopik Bulgular

Yapılan ZnSO_4 uygulamalarında 24. saatte ve 48. saatte 0.01 M'den itibaren genelde vejetatif hücrelerin sporlandığı görüldü (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.).



Şekil 4.3. 24. saatte ZnSO_4 'ün Bti'ye olan etkisine ait A) Kontrol B) 0.01 M C) 0.05 M D) 0.5 M faz kontrast mikroskop toplam hücre görünümü

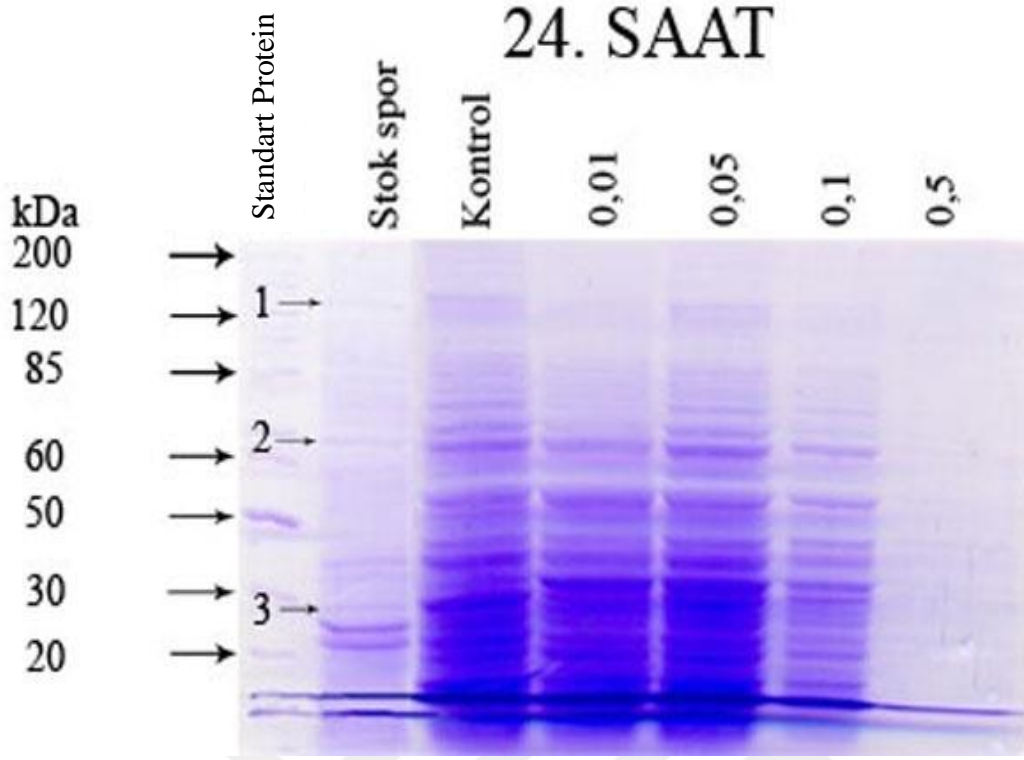


Şekil 4.4. 48. saatte $ZnSO_4$ 'ün Bti'ye olan etkisine ait A) Kontrol B) 0.01 M C) 0.05 M D) 0.5 M faz kontrast mikroskop toplam hücre görünümü

4. 2. SDS – PAGE Bulgular

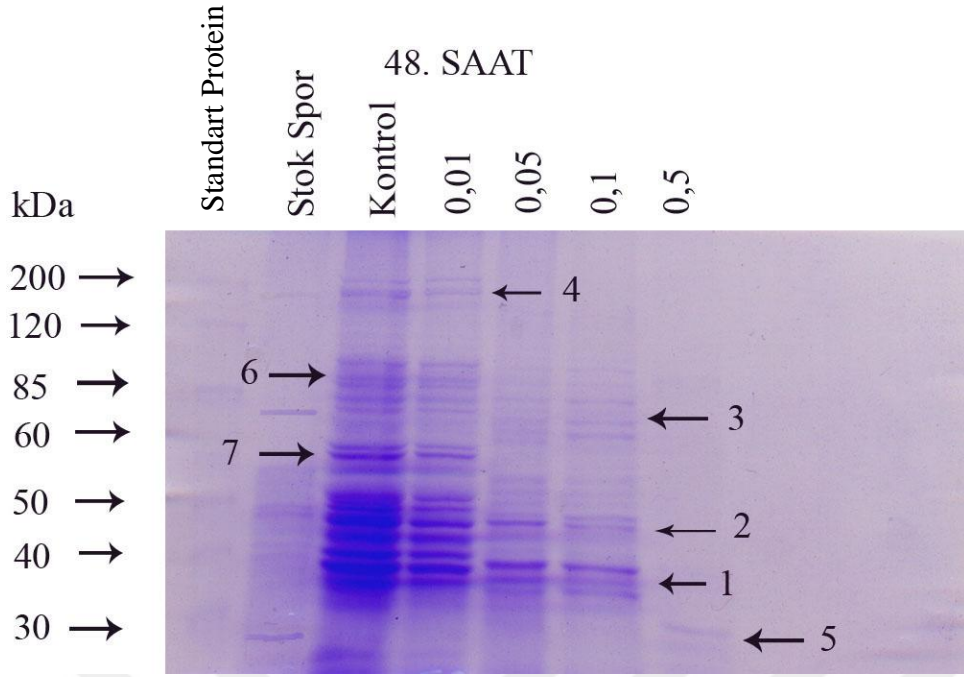
4.2.1. $LiCl_3$ 'e ait SDS Bulguları

Bti stok spor profilinde mevcut olan bandlaşmada önemli olan 3 protein bandı vardır. Bu bandlar 27 kDa, 65 kDa ve 135 kDa bandlarıdır. Bti kontrol ve stok spor protein profiline göre yapılan karşılaştırmada 0.01 M, 0.05 M ve 0.1 M $LiCl_3$ uygulanan protein profillerinde farklılık görülmediği, 0.5 M'da ise protein profillerinin zayıf olduğu görüldü. 1 numara olarak işaretlenen bandın molekül ağırlığı 124.8 kDa olarak 2 numaralı bandın ise 65.6 kDa ve 3 numaralı band ise 27.2 kDa olduğu bulundu. Bu bandlaşmalardan 0.5 M hariç bütün profillerde var olduğu görüldü (Şekil.4.5).



Şekil 4.5. LiCl₃ uygulanan Bti'ye ait 24. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri

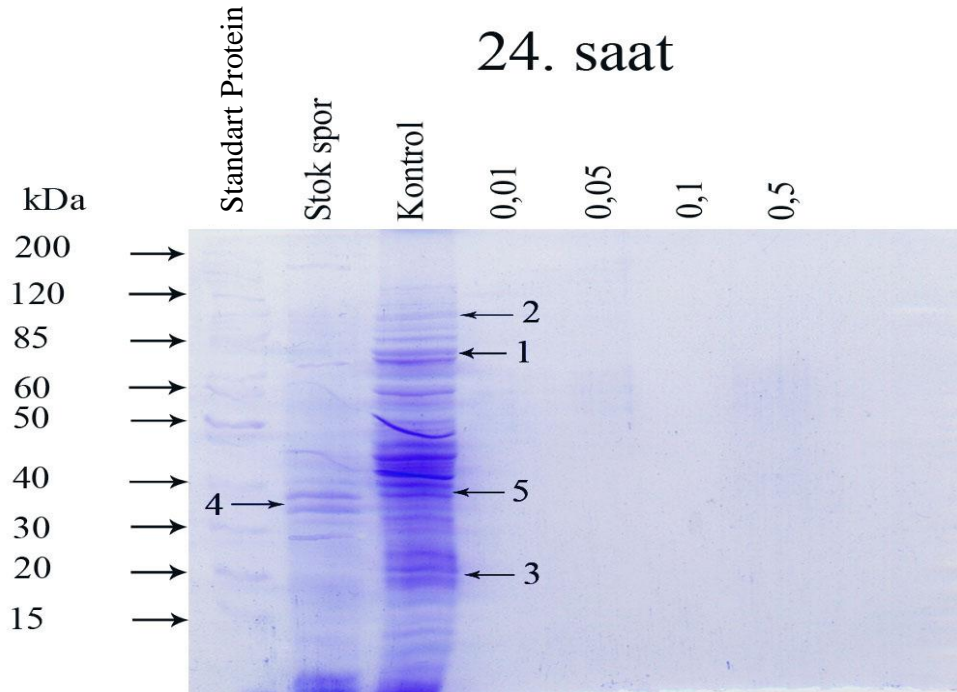
Bti kontrol ve stok spor protein profiline göre yapılan karşılaştırmada 0.01 M, 0.05 M ve 0.1 M LiCl₃ uygulanan protein profillerinde farklılık görülmedi. Stok Spordaki 27 kDa, 65 kDa ve 135 kDa'lık bandlardan 0.5 M konsantrasyon hariç hepsinde görüldü. Diğer band profillerindeki 4, 6, 7, 1 ve 2 numaralı bandların molekül ağırlıkları diğerleriyle eşit olduğu bulundu. Fakat 5 numaralı molekül ağırlığı 33.01 kDa olan 0.5 M konsantrasyonda Bti'nin farklı bir protein ürettiği bulundu (Şekil. 4.6).



Şekil 4.6. LiCl₃ uygulanan Bti'ye ait 48. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri

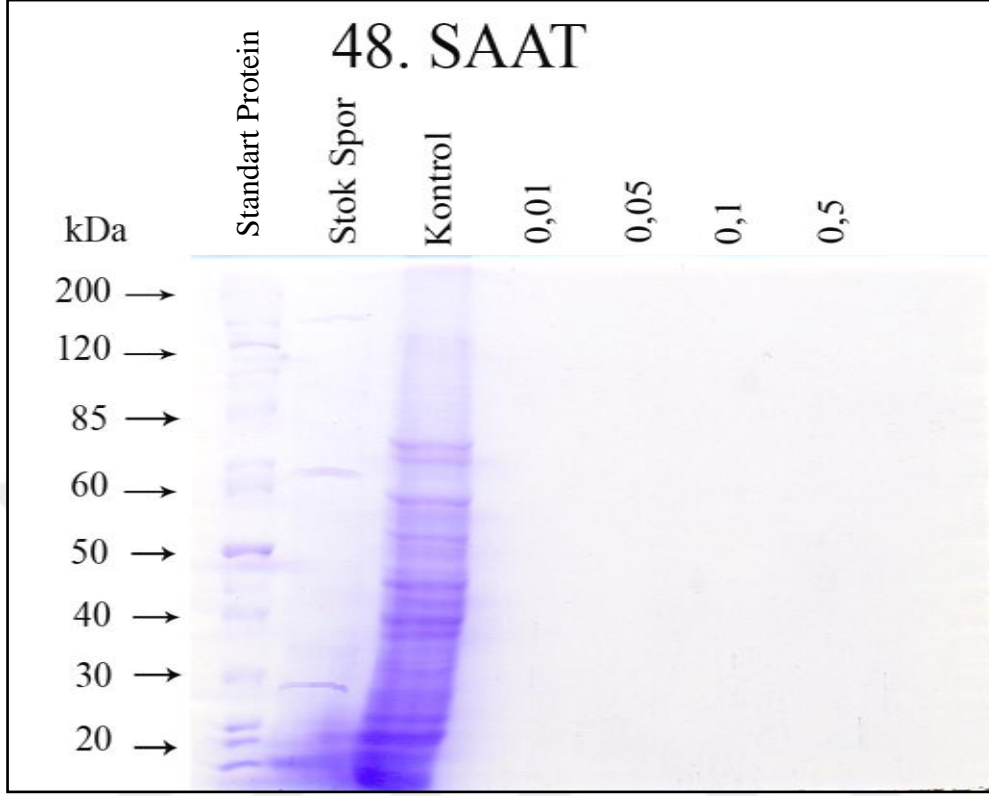
4.2.2. ZnSO₄'e ait SDS Bulguları

ZnSO₄ uygulanan Bti'nin band profilleri incelendiğinde; 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.5 M'de bandlaşma oluşmadığı görüldü (Şekil. 4.7).



Şekil 4.7. ZnSO₄ uygulanan Bti'ye ait 24. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri

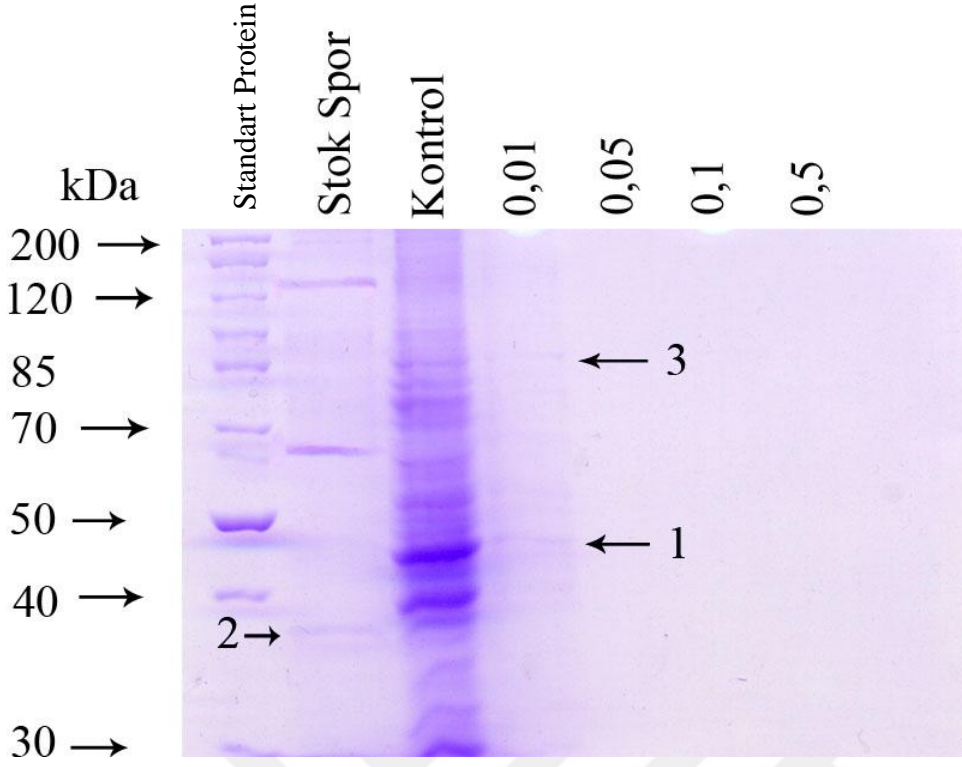
24. Saatte olduğu gibi 48. saatte de $ZnSO_4$ uygulanan 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M ve 0.5 M'deki protein profillerinde de bandlaşma oluşmadığı görüldü (şekil 4. 8).



şekil 4.8. $ZnSO_4$ uygulanan Bti'ye ait 48. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri

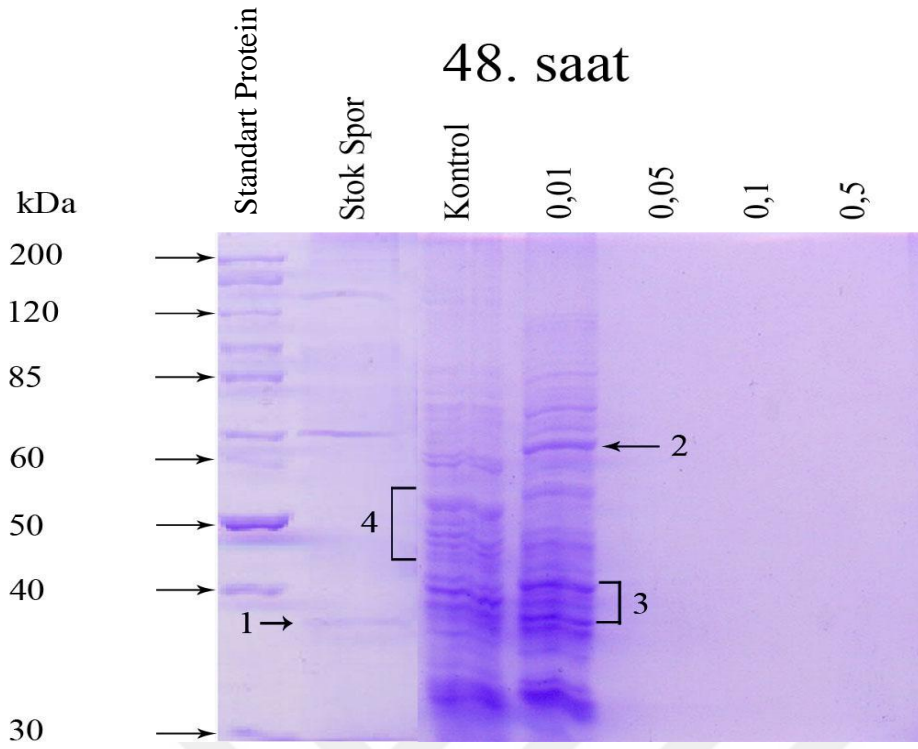
4.2.3. $MnCl_2$ 'e ait SDS Bulguları

şekil 4.9'da görüldüğü gibi $MnCl_2$ uygulanan Bti profillerinden 0.05 M, 0.1 M, 0.5 M'da bandlaşma görülmediği, 0.01 M'da ise bandlaşmanın çok zayıf olduğu görüldü (şekil 4.9).



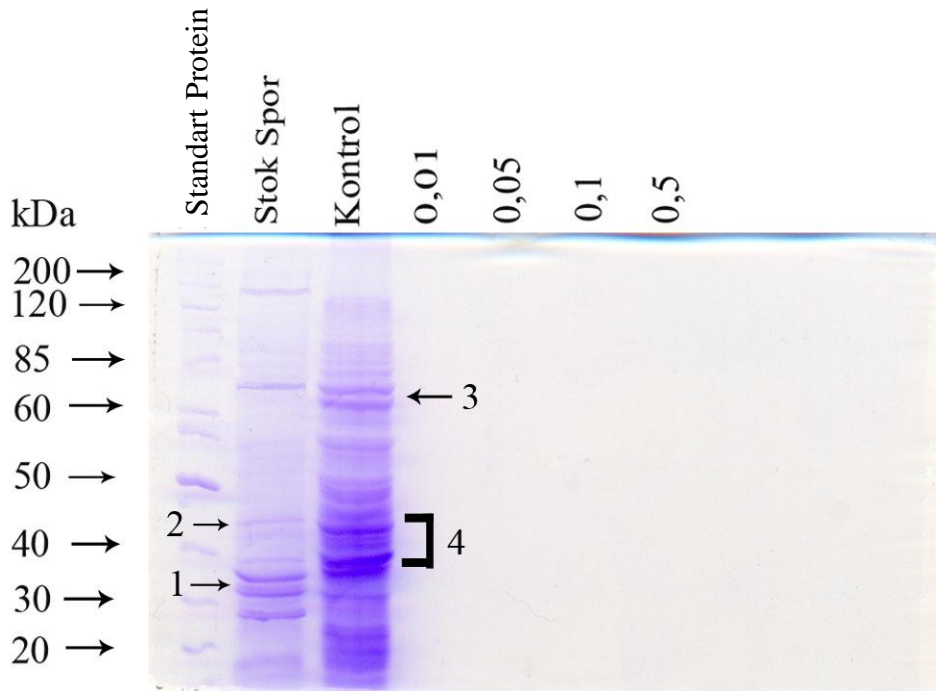
Şekil 4.9. $MnCl_2$ uygulanan Bti'ye ait 24. Saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri

Şekil 4. 10'da görüldüğü gibi $MnCl_2$ uygulanan Bti profillerinden 0.05 M, 0.1 M, 0.5 M'da bandlaşma olmadığı, 0.01 M'da ise bandlaşmanın kontrolün bandlaşmasıyla benzer olduğu ve farklı bir protein üretmediği görüldü.

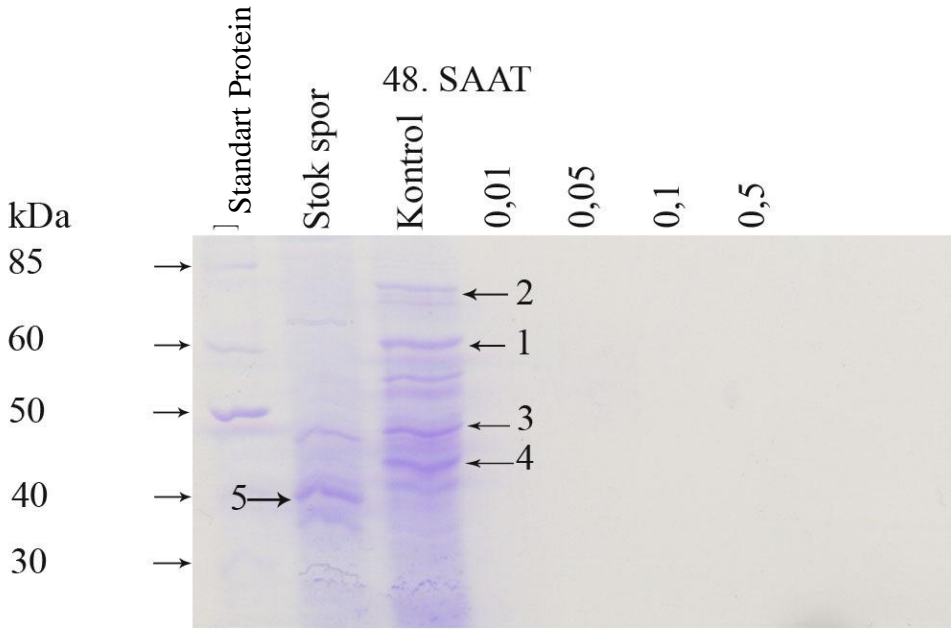


Şekil 4.10. $MnCl_2$ uygulanan Bti'ye ait 48. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri

4.2.4. $CuSO_4$ 'e ait SDS Bulguları

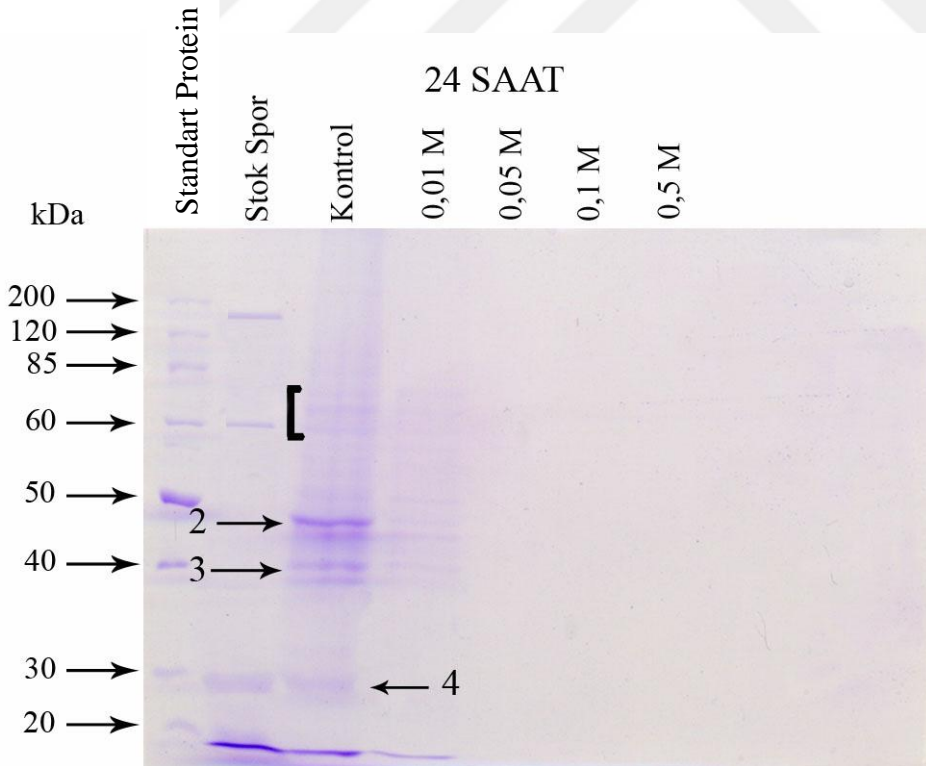


Şekil 4.11. $CuSO_4$ uygulanan Bti'ye ait 24. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri



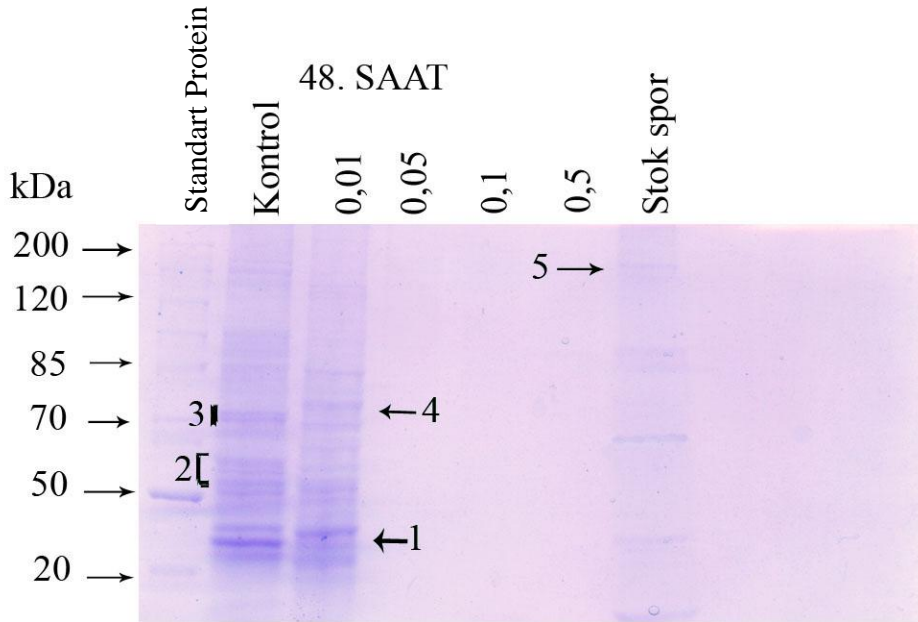
Şekil 4.12. CuSO₄ uygulanan Bti'ye ait 48. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri. Şekil 4. 11 ve şekil 4. 12'de görüldüğü gibi CuSO₄ uygulanan Bti profillerinde bandlaşma olmadığı tespit edildi.

4.2.5. Al (SO₄)₂'e ait SDS Bulguları



Şekil 4.12. Al (SO₄)₂ uygulanan Bti'ye ait 24. saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri

Şekil 4.13’de görüldüğü gibi, 0.05 M, 0.1 M ve 0.5 M konsantrasyonlarda Al uygulanan Bti protein profillerinde bandlaşma görülmedi. 0.01 M’da oldukça zayıf bandlaşma oldu. 4 numaralı bandın molekül ağırlığı 27.6 kDa olarak bulundu fakat 0.01 M’de bu bandın sentezlenmediği bulundu. 3 numaralı bandın molekül ağırlığı 39.6 kDa, 2 numaralı bandın molekül ağırlığı 46.2 kDa olarak bulundu ve bu bandlar 0.01 M’de de sentezlendiği görüldü. 0.05 M, 0.1 M VE 0.5 M konsantrasyonlarda Al uygulanan Bti protein profillerinde bandlaşma görülmedi. 0.01M da bandlaşma, 24. saatekine göre biraz daha belirgin olduğu incelendi (Şekil 4. 13).



Şekil 4.13. Al (SO₄)₂ uygulanan Bti’ye ait 48. Saatteki SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri

4.3. Bakteri Gelişimine ait Bulgular

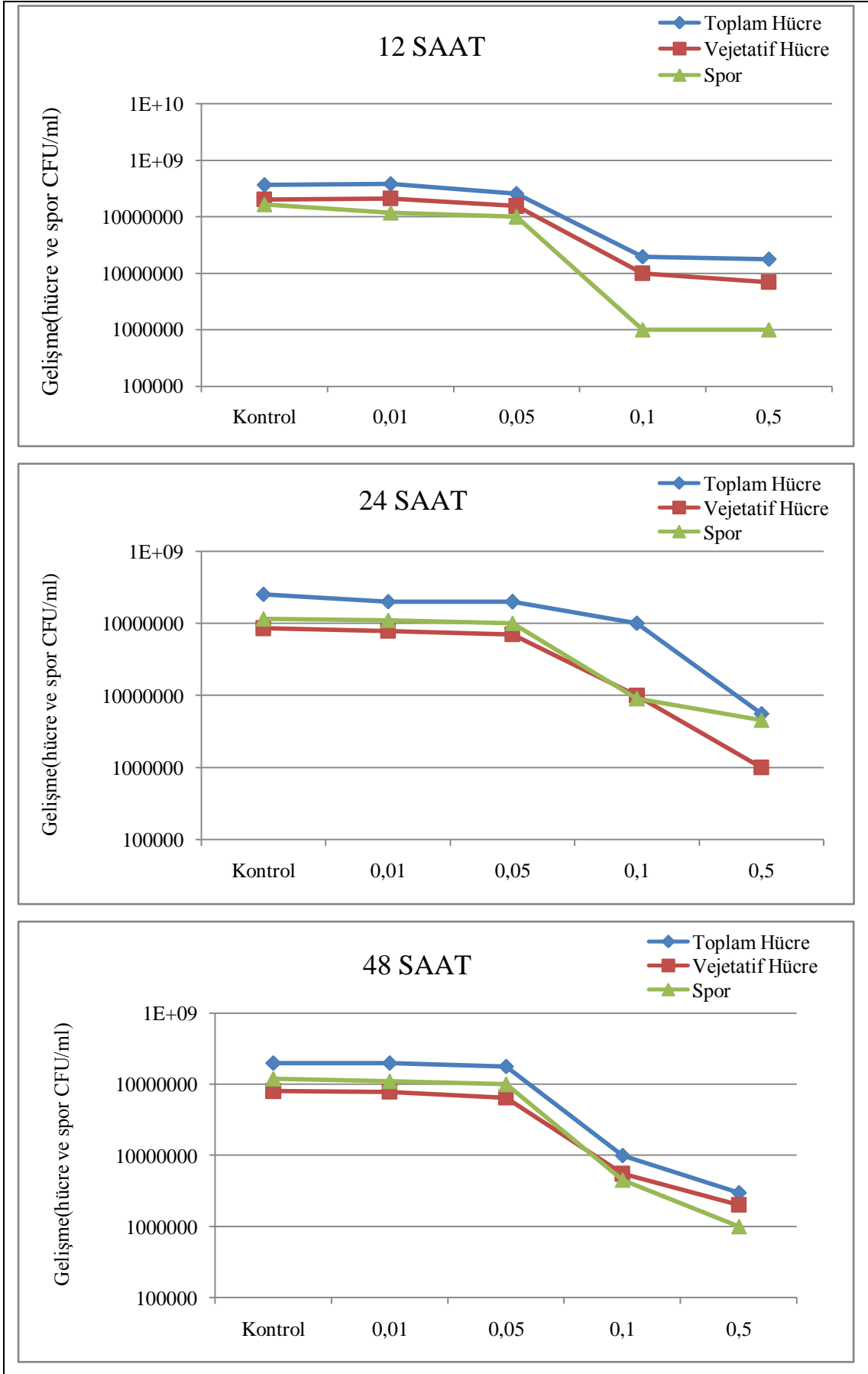
Çalışmada kullanılan 5 farklı kimyasalın Bti üzerine uygulanmasıyla zamana bağlı olarak vejetatif hücrelerde sporlaşma incelendi. Bti’nin kimyasal uygulanması sonucunda zamana bağlı olarak elde edilen sayım sonuçları belirlendi.

4.3.1. MnCl₂’nin Bti’in Gelişmesi ve Spor Canlılığı Üzerine Etkisi

MnCl₂ uygulanan 12, 24 ve 48 süre ile geliştirilen *Bti*’nin toplam, vejetatif hücre, spor sayımlarındaki değişimler şekil 4. 14’de verildi. *Bti*’nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 12 saat 1.67×10^8 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 2.04×10^8

CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. MnCl₂ uygulanan *Bti* yoğunluklarındaki artışa doğrusal olarak 10² kat spor değerinde ve vejetatif hücrede azalma hesaplandı. En yüksek konsantrasyonda spor değeri 1×10⁶ spor mL⁻¹, vejetatif hücre değeri 7×10⁶ CFU mL⁻¹ hesaplandı. *Bti*'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 24 saat sonra 1.16×10⁸ spor mL⁻¹, vejetatif hücresi ise 8.5×10⁷ CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. MnCl₂ uygulanan en yüksek *Bti* konsantrasyonunda spor değeri 4.55×10⁶ spor mL⁻¹, vejetatif hücre ise 1×10⁶ CFU mL⁻¹ olduğu tespit edildi. *Bti*'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 48 saat sonra 1.2×10⁸ spor mL⁻¹, vejetatif hücresi ise 8×10⁷ CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. MnCl₂ uygulanan en yüksek *Bti* konsantrasyonundaspor değeri 1×10⁶ spor mL⁻¹, vejetatif hücre ise 2 × 10⁶ CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı.

Bti'ye uygulanan MnCl₂ konsantrasyonlarıyla sayım sonuçları arasındaki ilişki incelendiğinde, zamanla canlı kalan spor sayısı üzerinde MnCl₂'nin etkili olduğu gözlemlendi ($p \leq 0.05$).

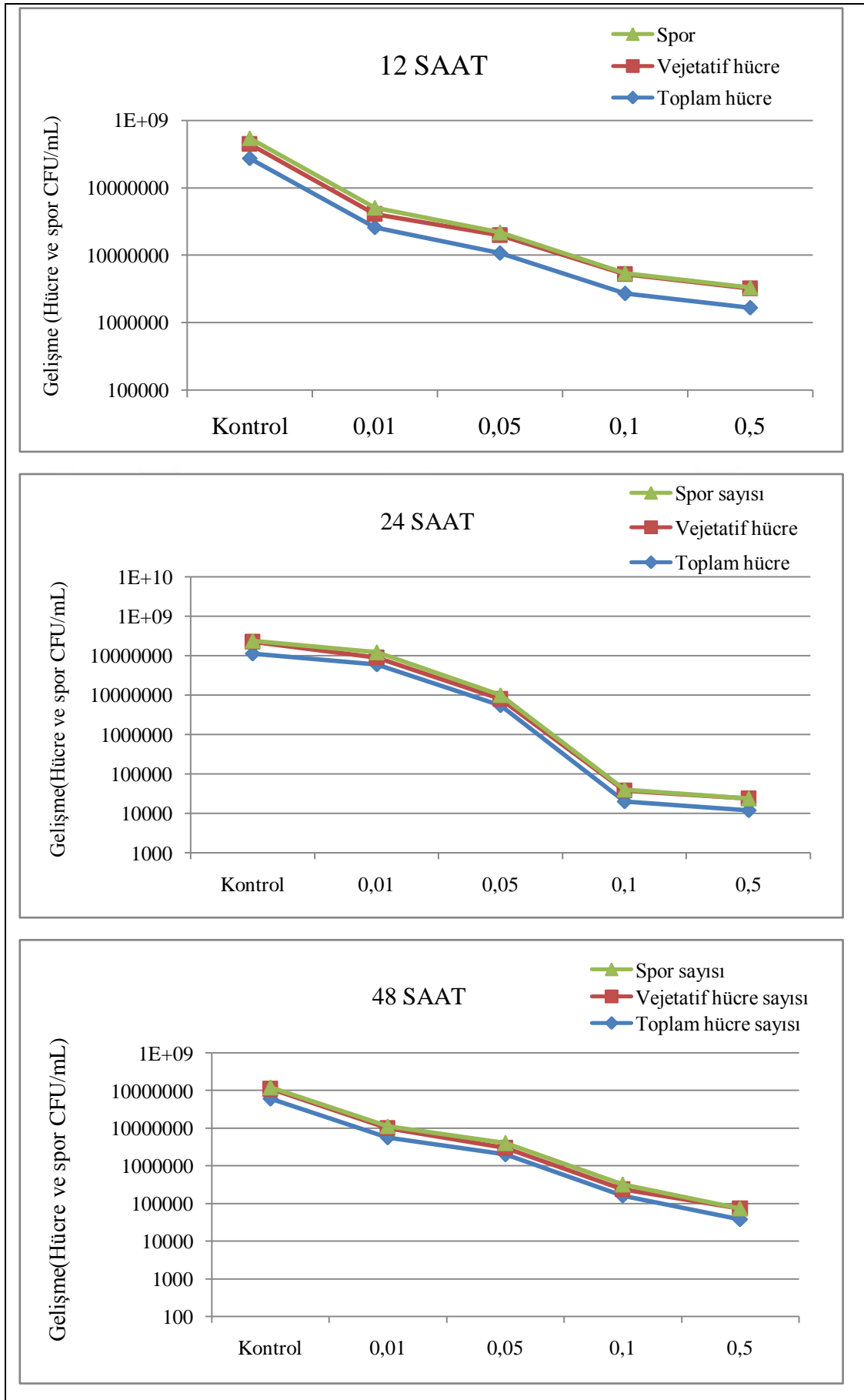


Şekil 4.14. MnCl₂ uygulanan Bti'nin sayım sonuçları

4.3.2. CuSO₄'ın Bti'nin Gelişmesi ve Spor Canlılığı Üzerine Etkisi

Bti'nin CuSO₄ uygulanan 12, 24 ve 48 süre ile geliştirilen toplam, vejetatif hücre, spor sayımlarındaki değişimler şekil 4. 16'da verildi. Bti'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 12 saat sonra 1.12×10^8 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 2.33×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. CuSO₄ uygulanan en yüksek Bti konsantrasyonunda spor değeri 1.49×10^6 spor mL⁻¹, vejetatif hücre sayısı ise 9×10^4 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. CuSO₄ uygulandığı andan itibaren ilk konsantrasyonda vejetatif hücre sayısı 10^2 kat azaldığı, spor sayısının ise 10 kat azaldığı bulundu. Bti'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 24 saat sonra 2.33×10^8 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 1.56×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. CuSO₄ uygulanan en yüksek Bti konsantrasyonunda spor değeri 1×10^2 spor mL⁻¹, vejetatif hücre sayısı ise 1.1×10^2 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. CuSO₄ uygulandığı andan itibaren ilk konsantrasyonda vejetatif hücre sayısı ve spor sayısının ise 10^2 kat azaldığı bulundu. Bti'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 48 saat sonra 1.1×10^8 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 2.7×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. CuSO₄ uygulanan en yüksek Bti konsantrasyonunda spor değeri 1.98×10^3 spor mL⁻¹, vejetatif hücre sayısı ise 1×10^2 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı.

Bti'ye uygulanan CuSO₄ konsantrasyonlarıyla sayım sonuçları arasındaki ilişki incelendiğinde, zamanla canlı kalan spor sayısı üzerinde CuSO₄ 'ın çok etkili olduğu tespit edildi ($p \leq 0,05$).

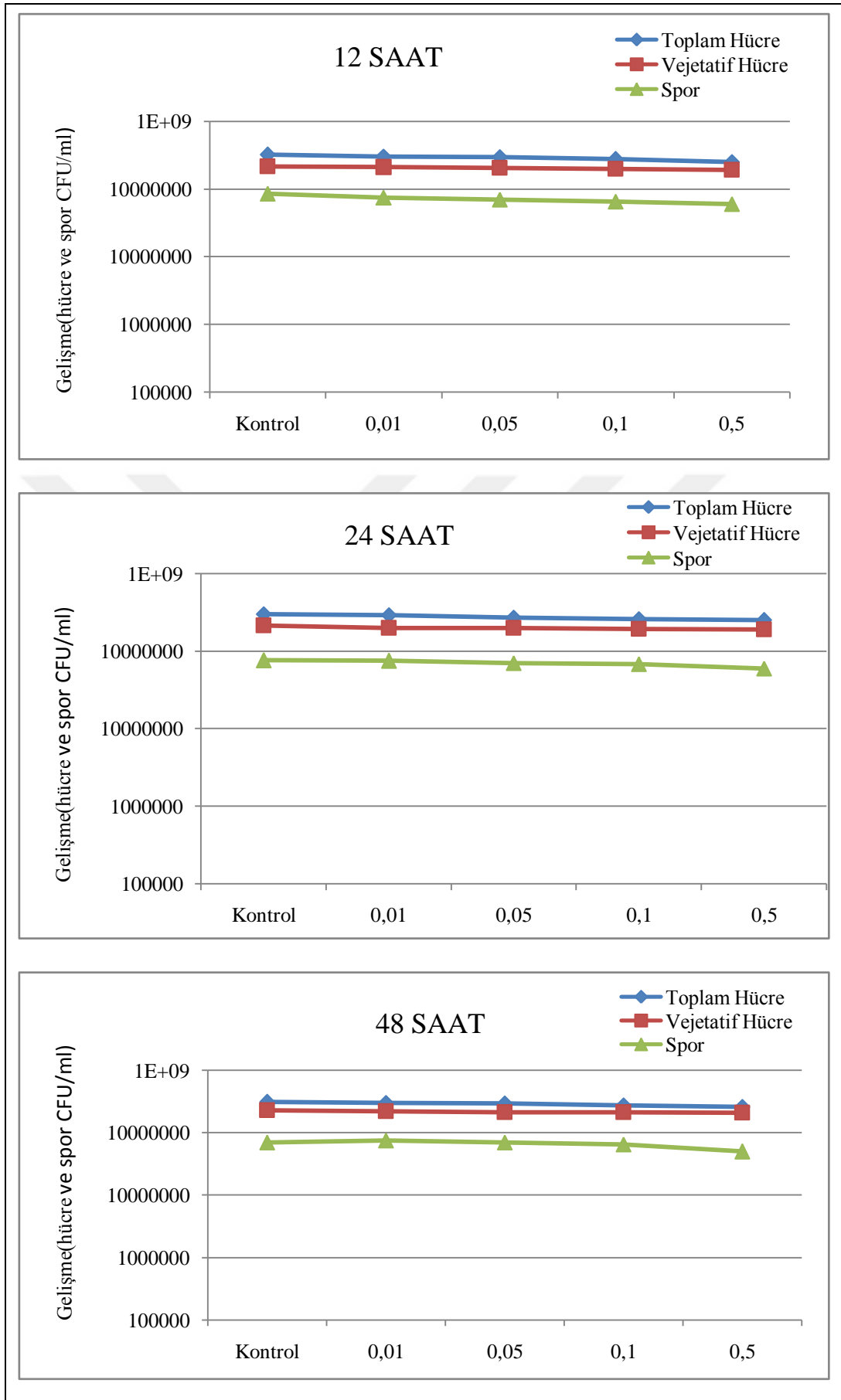


Şekil 4.15. CuSO₄ sayım sonuçları

4.3.3. LiCl₃ Uygulanan Bti'ye ait Bakteri Gelişimi ve Sporulasyona ait Bulgular

LiCl₃ uygulanan 12, 24 ve 48 süre ile geliştirilen Bti'nin toplam, vejetatif hücre, spor sayımlarındaki değişimler şekil 4. 17'de verildi. Bti'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 12 saat sonra 8.5×10^7 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 2.15×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. LiCl₃ uygulanan en yüksek Bti konsantrasyonunda spor değeri 6×10^7 spor mL⁻¹, vejetatif hücre sayısı ise 1.9×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. Bti'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 24 saat sonra 7.6×10^7 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 2.14×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. LiCl₃ uygulanan en yüksek Bti konsantrasyonunda spor değeri 6×10^6 spor mL⁻¹, vejetatif hücre sayısı ise 1.9×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. Bti'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 48 saat sonra 7×10^7 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 2.3×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. LiCl₃ uygulanan en yüksek Bti konsantrasyonunda spor değeri 5×10^7 spor mL⁻¹, vejetatif hücre sayısı ise 2.1×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı.

Bti'ye LiCl₃ uygulanan konsantrasyonlarıyla sayım sonuçları arasındaki ilişki incelendiğinde, zamanla canlı kalan spor sayısı üzerinde LiCl₃' nin etkisinin önemsiz olduğu tespit edildi ($p \geq 0.05$).

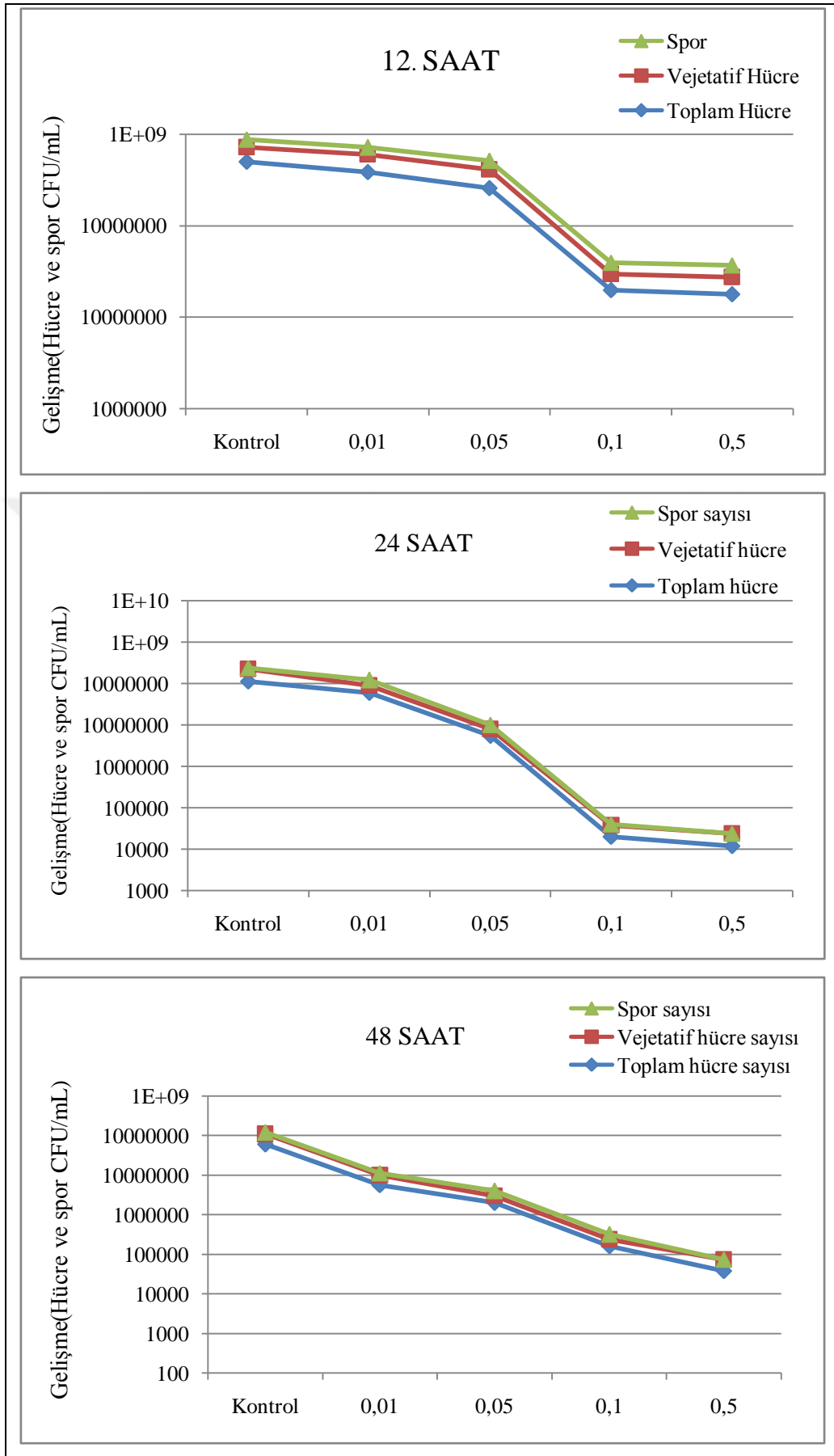


Şekil 4.16. LiCl_3 sayım sonuçları

4.3.4. Al (SO₄)₂ 'ün Bti'nin Gelişmesi ve Spor Canlılığı Üzerine Etkisi

Al (SO₄)₂ uygulanan 12, 24 ve 48 süre ile geliştirilen Bti'nin toplam, vejetatif hücre, spor sayımlarındaki değişimler şekil 4. 18'de verildi. Bti'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 12 saat sonra 1.45×10^8 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 2.45×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. Al uygulanan en yüksek Btikonsantrasyonunda spor değeri 1.1×10^8 spor mL⁻¹, vejetatif hücre sayısı ise 4.8×10^6 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. Bti'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 24 saat sonra 1.85×10^8 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 2.15×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. Al uygulanan en yüksek Bti konsantrasyonunda spor değeri 2×10^5 spor mL⁻¹, vejetatif hücre sayısı ise 9×10^5 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. Bti'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 48 saat sonra 2×10^8 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 1.98×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. Al uygulanan en yüksek Bti konsantrasyonunda spor değeri 3×10^5 spor mL⁻¹, vejetatif hücre sayısı ise 8×10^5 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı.

Bti'ye Al uygulanan konsantrasyonlarıyla sayım sonuçları arasındaki ilişki incelendiğinde, zamanla canlı kalan spor sayısı üzerinde Al'ün etkili olduğu tespit edildi ($p \leq 0.05$).

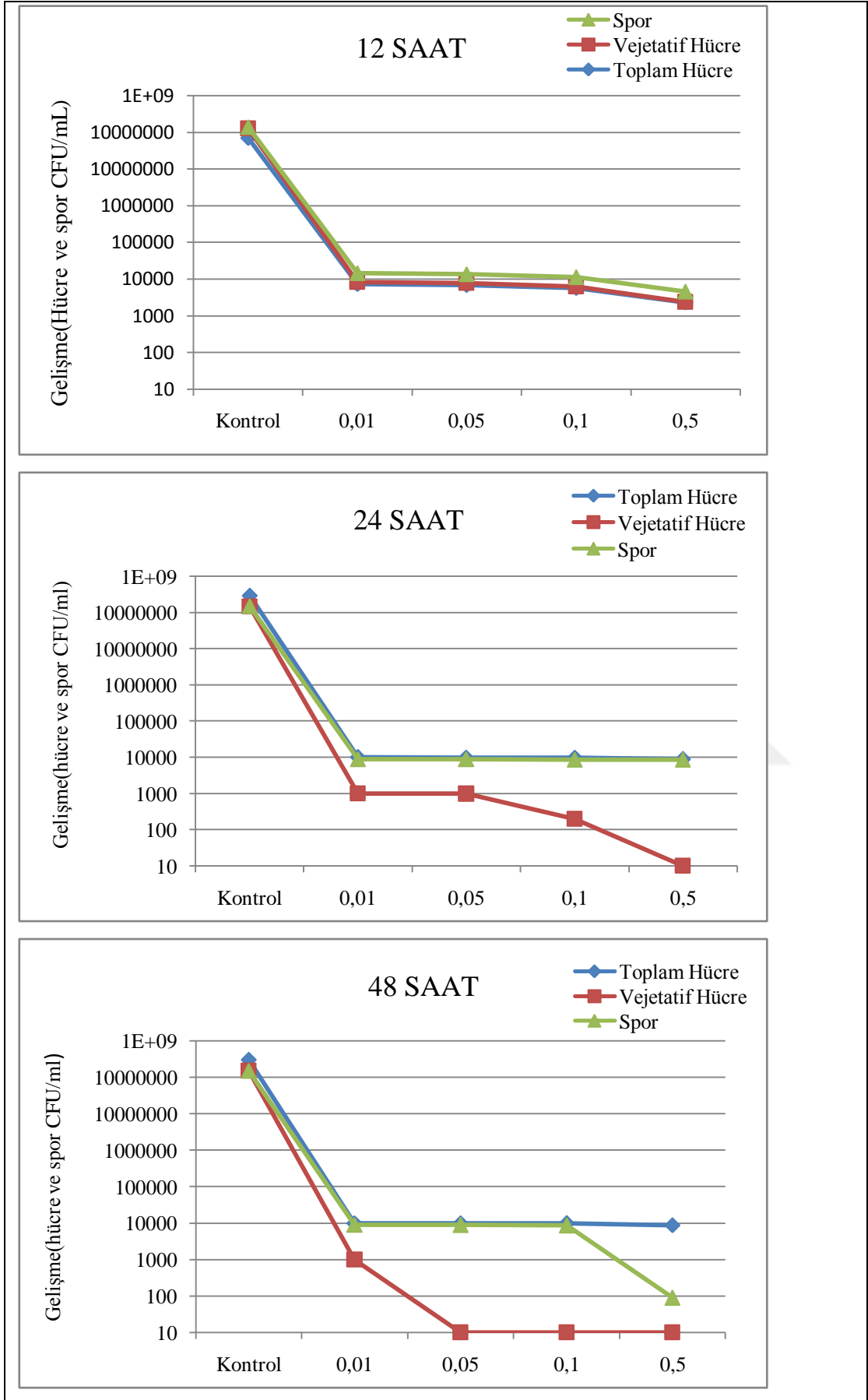


Şekil 4.17. Al (SO₄)₂ sayım sonuçları

4.3.5. ZnSO₄'e ait Bti'nin Gelişmesi ve Spor Canlılığı Üzerine Etkisi

ZnSO₄ uygulanan 12, 24 ve 48 süre ile geliştirilen Bti'nin toplam, vejetatif hücre, spor sayımlarındaki değişimler şekil 4. 19'da verildi. Bti'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 12 saat sonra 1.1×10^8 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 1.9×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. ZnSO₄ uygulanan en yüksek Btikonsantrasyonunda spor değeri 1.1×10^3 spor mL⁻¹, vejetatif hücre sayısı ise 1.1×10^2 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. ZnSO₄ uygulandığı andan itibaren ilk konsantrasyonda vejetatif hücre sayısı ve spor sayısının 10^5 kat azaldığı bulundu. Bti'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 24 saat sonra 1.5×10^8 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 1.45×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. ZnSO₄ uygulanan en yüksek Bti konsantrasyonunda spor değeri 8.7×10^3 spor mL⁻¹, vejetatif hücre sayısı ise 1×10^1 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. ZnSO₄ uygulandığı andan itibaren ilk konsantrasyonda vejetatif hücre sayısı ve spor sayısının ise 10^5 kat azaldığı tespit edildi. Bti'nin gelişmesi için kimyasal uygulanmayan kontrolün spor değeri 48 saat sonra 1.49×10^8 spor mL⁻¹, vejetatif hücresi 1.52×10^8 CFU mL⁻¹ olarak hesaplandı. ZnSO₄ uygulanan en yüksek Bti konsantrasyonunda spor değeri 9×10^1 spor mL⁻¹, vejetatif hücre ise 0 olarak bulundu. ZnSO₄ uygulandığı 0.05 konsantrasyonundan itibaren vejetatif hücreyi tamamen inhibe ettiği sonucuna ulaşıldı.

Bti'ye ZnSO₄ uygulanan konsantrasyonlarıyla sayım sonuçları arasındaki ilişki incelendiğinde, zamanla canlı kalan spor sayısı üzerinde ZnSO₄'ün çok etkili olduğu tespit edildi ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.18. ZnSO₄ sayım sonuçları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada toprak bakterilerinden olan *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* kullanıldı. Toprak bakterilerinden birinin seçilmesinin nedeni toprak bakterilerinin, çeşitli sanayi atıkları ve çevre kirliliğinden dolayı ağır metal muamelesine çok fazla maruz kalmasındandır. Yapılan literatür taramasında da bu konunun sıklıkla ele alındığı ve *Bacillus* türlerinin kullanıldığı görülmüştür. Çünkü son zamanlarda ağır metallerin hem en önemli, hem de en tehlikeli maddeler olduğu belirtilmektedir. Bazı araştırmacılar, ağır metal kirlenmesini en ciddi çevre problemi olarak değerlendirmektedirler. Endüstri atıklarından kaynaklanan ağır metallerin, su kirliliğinde oynadıkları rol büyüktür. Bu metaller; tüm organizmalar için tehlike arz etmektedir. Besin zinciri ve özellikle su ile insan vücuduna giren bu ağır metaller ciddi hastalıklara, hatta ölüme yol açmaktadırlar (Gülay,2008). Bu çalışmada da ağır metallerin topraktaki Bti türünün gelişimini nasıl etkilediğini araştırmak amaçlandı. Yapılan çalışma sonucunda, kullanılan 5 kimyasalın farklı konsantrasyonlarının 12, 24 ve 48 saatlik muamelelerinden sonraki spor sayımı, 24 ve 48. saatte faz-kontrast mikroskobu görünümüleri ve protein profilleri incelendiğinde, Bti'ye en az etkili olan LiCl_3 ve en fazla etkili olan ise ZnSO_4 'ün olduğu görüldü. Entomopatojen bir bakteri olan Bti bu kimyasallara uzun süreli maruz kaldığında topraktaki zararlıları en aza indirebileme özelliğini yitirerek, toprakta spor oluşturamadığı ve bir süre sonra yok olduğu saptandı. Elde edilen bu sonuçlar literatürde var olan çalışmalarla paralellik göstermiştir.

Toksik, mutajenik ve karsinojen etkileri olabilen mikroorganizmalar ağır metal iyonlarına tolerans gösterirken, bu kirleticileri ortamdaki uzaklaştırabilmeleri ağır metallerle karşıdirenç geliştirmeleriyle mümkün olmaktadır. Ağır metalin hücre içine alınmaması, kirleticinin daha az toksik forma çevrilmesi, hücre içi veya dışında tutulması, metalin hücre dışına aktif taşınımı ve mikroorganizmanın metale karşı duyarsız hale gelmesinin artması gibi direnç mekanizmaları bugüne kadar tanımlanabilmiş olan sistemlerdir (Bruins ve ark., 2000; Malik, 2004; Sultan ve Hasnain, 2006, Yavuz, 2016). Mevcut çalışmada ise, direnç sistemleri iyi olan ve stres durumunda kendini koruyabilen bir bakteri olmasına rağmen konsantrasyon arttıkça bakteri varlığını zamanla sürdürmemeye başlamıştır. Ağır metallerle direnç kazanan mikroorganizmalar, bu direnç sistemlerinden birini ya da birkaçını birlikte veya ayrı kullanarak ağır metalin toksik etkilerini azaltmaya, kendi korumaya ve canlılığının devamlılığını sürdürmeye çalışmaktadır. Bu direnç sistemlerinde de stres koşuluna cevaben sentezi artan bazı proteinler anahtar görevinde bulunmaktadır. Ağır metal stresi altındaki herhangi bir mikroorganizma bu strese adaptasyonunu sağlamak ve dayanıklılığının devamı ve artırımı için bazı proteinlerin sentezini arttırarak kendini koruma yoluna gidebildiği

görülmüştür (Tosunkhowong, 2005; Kılıç, 2008). Farklı konsantrasyonlarında Bti'nin entomopatojen niteliğine özgü protein kaybettiği ve entomopatojen özelliğini yitirdiği ve bakterinin özelliğini yitirmesine ve bakterinin yok olmasına sebep olmuştur literatürde de desteklenmiştir (Barjac ve Sutherland, 2009). Kimyasalların gerek direk muamelesi gerek endüstriyel atık şeklinde doğaya salınması sadece toprak florasındaki bakterileri değil tüm ekosistemi ve canlıları etkilemiştir. Bununla ilgili bitki, hayvan ve mikroorganizmaların doku, genetik ve organ tahribatı konuları çalışılmış ve zararları ortaya konulmuştur (Yılmaz, 2003).

Mevcut çalışmada, Bti'ye Li etkisi faz-kontrast mikroskobunda incelendiğinde 24. saatte 4 konsantrasyon için sporlanmanın henüz görülmediği, 48. saatte ise 0.1 M konsantrasyonda sporlanmaya başlandığı vejetatif hücrelerinde varlığını sürdürdüğü kaydedildiği, Fakat çinkonun etkisi faz-kontrast mikroskobunda incelendiğinde 24 ve 48. saatte 0.01 M'de sporlanma görüldüğü, diğer tüm konsantrasyonlar da ise tamamen bakteri spor canlılığını kaybettiği sonucuna ulaşılmıştır.

Toplam hücre protein profilleri sonucuna ulaşmak için yapılan SDS PAGE bulgularında ise Lityumun Bti üzerindeki etkinliği faz kontrast bulgularımıza paralel sonuçlar verdiği yani 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M'da kendine özgü protein bantlarını koruduğu fakat 0.5 M lityum uygulamasının 48. Saat sonunda bantlaşmanın diğerlerine göre daha az olduğu hatta canlı kalabilmek için ürettiğini düşündüğümüz 33.01 kDa ağırlığında farklı bir bant kaydedilmiştir. Mangan ve Alüminyum'da ise Bti'ye etkisinin yakın bulunduğu, 0.01 M konsanstrasyonda protein bantlarında kontrole göre çok az da olsa bantlaşma var olduğu diğer konsantrasyonlarda ise bantlaşmanın hiç görülmediği kaydedilmiştir. Çinko ve bakır muamelesinin de Bti'ye etkisinin yakın bulunduğu 24 ve 48. Saatte tüm konsantrasyonlarda spor protein bantlarının tamamen yok olduğu görülmüştür.

Spor koloni sayımlarında ise yine benzer sonuçlar elde edilmiş, Lityumun koloni sayımlarında etkinliği çok az olurken, Çinko ve bakır muamelesinde, uygulanan ağır metaller spor oluşumunu tamamen inhibe etmiştir. Alüminyum ve Mangan ise 0.01 M konsantrasyonda spor canlılığını sürdürmüş, diğer konsantrasyonlarda zamana paralel olarak canlılığını kaybetmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda lityum muamelesi ile çinko muamelesi sonuçları ayrı ayrı incelendiğinde bakteri proteinin tüm konsantrasyonlarda sadece lityum varlığında devamlılığı ve ağırlığı sürdürülürken, çinko da ise durum tam tersi olmuştur. Bakır varlığında da bakteri canlılığında çinko ile benzer sonuçlar görülmüştür. Mangan ve Alüminyum ise bakteri etkinliğini 0.01 M konsantrasyona kadar korumuş, sonrasında ise kaybetmeye başladığı görülmüştür. Bakterilerin her bir kimyasal çeşidine göre ortamda varlığını sürdürebilmesinin

sonuçları farklılık gösterdiği tespit edilmiş ve sonuçları paylaşılmıştır. Özellikle endüstriyel çalışmalar sonucu oluşan evre kirliliğinde toprak florasının canlılığının devamlılığı konularında bu çalışmanın araştırıcılara ışık tutacağı düşünülmüştür. Bti bakterisine bazı kimyasalların bakteride oluşturduğu sonuçlar, biyoteknolojik alanda, tarım uygulamalarında, doğada biyolojik mücadelede, endüstriyel uygulamalarda, biyokimya çalışmalarında ve kısacası konusu toprak-su olan tüm mikrobiyolojik çalışmalarda yardımcı olması amaçlanmıştır.



6. KAYNAKLAR

- Abou-Shanab, R.A.I., Van Berkum, P., Angle, J.S. 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in ni rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*, 68(2): 360-367.
- Aksu, Z., Kılıç, N.K., Ertuğrul, S., Dönmez, G. 2007. Inhibitory effects of chromium (VI) and Remazol Black B on chromium (VI) and dyestuff removals by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1167-1174.
- Alm, E., Arkin, A.P. 2003. Current opinion in structural biology, *Biological Networks*, 32:101.
- Andrew, S.R., Ashford, P.J., Baker, D.W., Rice, H. 1991. Crystallization and quaternary structure analysis of the NAD⁺-dependent leucine dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. *Journal of Molecularbiology*, 236(2): 663- 665.
- Arda, M. 2000. Temel mikrobiyoloji. Medisan Yayınları, Ankara, 1: 548.
- Arsene, F., Tomoyasu, T., Bukau, B. 2000. The heat shock response of *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 55: 3-9.
- Aslan, K., Wu, M., Lakowicz, J.R. 2007. Fluorescent coreshell AgSiO₂ nanocomposites for metal-enhanced fluorescence and single nanoparticle sensing platforms, *Journal of the American Chemical Society*, 129:1524-1525.
- Bar, C., Patil, R., Doshi, J., Kulkarni, M.J., Gade, W.N. 2007. Characterization of the proteins of bacterial strain isolated from contaminated site involved in heavy metal resistance- A proteomic approach. *Journal of Biotechnology*, 128: 444-451.
- Barjac, H.De., Bonnefoi, A. 1962. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. *BioControl*, 7(1): 5-31.
- Barjac, H.De. 1978. Un nouveau candidat a la lutte biologique contre les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *BioControl*, 23(4): 309-319.
- Barjac, H.De, Frachon, E. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *BioControl Springer*, 35(2): 233-240
- Barjac, H.De., Sutherland, L. 2012. Bacterial control of mosquitoes and black flies biochemistry. *Genetics and Applications of Bti and B. Sphaericus*, 2: 538-545.
- Başustaoğlu, A., Çökmüş, C. 2000. Protein profiles and prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in gülhane military academy hospital in Turkey. *Turkish Journal of Microbiology*, 24: 809–816.

- Beegle, C.C., Yamamoto, T. 1992. History of *Bacillus thuringiensis* berliner research and development. *Social Entomology*, 124: 587-616.
- Berber, İ., Cökmüş, C., Atalan, E. 2003. Characterization of *Staphylococcus* species by SDS–PAGE of whole-cell and extracellular proteins. *Microbiology*, 72(1): 42-47.
- Borensztein, E., Gregorio, J.D.E., Lee, J.V. 1998. How does foreign direct investment affect economic growth? *Journal of International Economics*, 45(1): 115-135.
- Bozlağan, I., Ayvaz, A., Öztürk, F., Acik, L. 2010. Detection of the cry1 gene in *Bacillus thuringiensis* isolates from agricultural fields and their bioactivity against two stored product moth larvae. *Turkish Journal of Microbiology*, 34 (2010) 145-154.
- Browne, N., Dowds, B.C.A. 2001. Heat and salt stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied microbiology*, 91(6): 1085-1094.
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 45(3): 198-207.
- Burke, Q.F., McDonald, K.O., Davidson, E.W. 1983. Effect of UV light on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593. *Applied and Environmental Microbiology*, 2: 954-956.
- Carlson, C.R., Caugant, D.A., Kolstø A.B. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains, *Environmental and Social Microbiology*, 5; 234
- Carozzi, N.B., Kramer V.C. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Social Microbiology*, 57(11): 3057-3061.
- Castro-Silva, M.A., deSouza Lima, A.O., Gerchenski, A.V., Jaques, D.B., Rodrigues, A.L., de Souza, P.L., Rörig, L.R. 2003. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34 (1):45-47.
- Chang, A., Adler, R.F., Huffman, G.J. 2003. The version-2 global precipitation climatology project (GPCP) monthly precipitation analysis (1979–present). *Journal of Biotechnology*, 2:1525-7541.
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2):113-116.
- Choudhury, R., Srivastava, S. 2001. Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Current Science Association*, 7: 768-775.

- Chovanová, K., Sládeková, C., 2004. Identification and characterization of eight cadmium resistant bacterial isolates from a cadmium-contaminated sewage sludge. *Biologia*, 59(6); 817-827.
- Cronan, J.E. 2002. Phospholipid modifications in bacteria. *Current Microbiology*, 5:202-205.
- Claus, D., Berkeley, R.C.W. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Genus *Bacillus*, 41(1): 45-51.
- Çökmüş, C., Yousten, A. 1994. Characterization of *Bacillus sphaericus* strains by SDS-PAGE. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64:267-268.
- Dedeakayoğulları, H., Önal E., 2009. Çevre-insan sağlığı açısından su ve su analizinin önemi, *İstanbul Tıp Dergisi*, 72:65-70.
- Diffels, J.F., Seret, M.L., Goffeau, A., Baret, P.V. 2006. Heavy metal transporters in hemiascomycete yeasts. *Biochimie*, 88: 1639-1649.
- Dikici, A., 2009. Çevresel stres faktörlerine karşı bakteriyel adaptasyonlar ve mekanizmaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4(3):59-68.
- Doelman, P., Jansen, E., Michels, M. 1994. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter, *Biology and Fertility of Soils*, 17(3): 177-184.
- Dowling, V.A., Sheehan, D. 2006. Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics*, 6: 5597-5604.
- Egler, M., Grosse, C., Grass, G., Nies, D.H. 2005. Role of the extracytoplasmic protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 187: 2297-2307.
- Elçin, Y.M. 1995. *Bacillus sphaericus* 2362-calcium alginate microcapsules for mosquito control. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(7): 587-591.
- Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 2:117-126.
- Farghal, A.L., Darwish, Y.A. 1988. Effect of storage temperature on the insecticidal activity of a wettable powder formulation of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* on *Culex pipiens molestus* larvae. *Journal of Pest Science*, 61(2): 31-33.
- Felicio, A.P., Garcia, J.R.O., Bertolini, M.C, Ottoboni, L.M.M., Novo M.T.M. 2003. The effects of copper ions on the synthesis of periplasmic and membrane proteins in *Acidithiobacillus ferrooxidans* as analyzed by SDS-PAGE and 2D-PAGE. *Hydrometallurg*, 71:165-171.

- Filali, B.K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F. Z., Talbi, M., Blaghen, M. 2000. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metal and antibiotics. *Current Microbiology*, 41(3): 151-156.
- Fitz James, P., Young, E., 1969. Morphology of sporulation, *The bacterial spore*. Academic Press Inc., New York, 66(1):13-19.
- García Icazbalceta, J. 1981. Bibliografía mexicana del siglo XVI, catálogo razonado de libros impresos en México de 1539 a 1600, con biografías de autores y otras ilustraciones. *Repertorio de la poesía Latina del Renacimiento en España*, 5: 15.
- Gheorghiu, M., Gicquel B., Balazuc, A.M. 1997. Oral immunization with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG simian immunodeficiency virus induces local and systemic cytotoxic, T lymphocyte responses in bacteria. *Journal of Immunology & Microbiology*, 71(3): 2303-2309.
- Gülay, Y., Arslan Y. 2008. <http://www.yapex.com/haberdetay.aspx?id=600>.
- Glare, T.R., O'Callaghan, M. 1998. Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Report for the Ministry of Health, 8(1): 22.
- Glare, T.R., O'Callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Wiley Online Library, 3(1): 24.
- Gnoffo, P.A., Miller, C.G. 1981. Pressure Distributions and Shock Shapes for 12.84/7° on-axis and Bentnose Biconics in Air at Mach 6. *National Aeronautics and Space*, 13(1): 506.
- Goldberg, L., Margalith, Y. 1977. Bacterial spore demonstrates rapid larvicidal activity against *Anopheles sergemi*, *Uranulae maumgmrulam*, *Culex univittimus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*, 37:355-358.
- Gonzales, B. 1981. Ecología y paisaje. *sidalcnet*, 58(2): 122-133.
- Hacker, M.P., Hamer, D. 1988. Over expression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science*, 241: 4874.
- Harnett, N.M., and Gyles, C.L. 1984. Resistance to drugs and heavy metals, colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains. *Environmental Microbiology*, 48: 930-945.
- Hassen, C., Copeland, K.G., Grogan, T.M. 1997, 1998. Automated biological reaction apparatus. US Patent, 488(7): 601.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A. 1998. Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology*, 65(2): 73-82.

- Höfte, H., Whiteley, H.R. 1989(1983). Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology*, 53: 242-255.
- Husain, M., Davidson, H.L., Gray, K.A., Knaff, D.A. 1987. Redox properties of the quinoprotein methylamine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry*, 26 (13): 4139–4143.
- İmamzade, Z. 2008. Efficacy studies of Synthetic Pyrethroids against adult mosquitoes in the field and biological larvicides (BTI-*Bacillusthuringiensis var. israelensis*) against *Culex pipiens* larvae in the laboratory in TRNC. PhD thesis, İstanbul university, İstanbul, 200.
- Jayakumar, R., Lee, Y.S., Rajkumar, M. 2004. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of metal containing polyurethanes, *Journal of Applied Biology*, 91(1): 288-295.
- Floore, T.G. 2006. Mosquito larval control practices: past and present. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(3): 527-533.
- Ji, G., Silver, S. 1995. Bacterial resistance mechanism for heavymetals of environmental concern. *Journal Microbiology*, 14: 61-168.
- Johnvesly, B., and Naik, G.R. 2001. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, 37:139-144.
- Hiroki, T., Kurihara, Y., Kodama, T. 1994. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*, 47: 777-780.
- Kannan, V.R., Tan, K.C. 2005. Just in time, total quality management, and supply chain management: understanding their linkages and impact on business performance. *Omega*, 33(2): 153-162.
- Karagöz, S. 2004. Aromatik hidrokarbonları degrede eden *Pseudomonas* spp'lerin izolasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi.
- Keawsompong, S., Kasetsart, J, Pornwirun, W. 1999. Characterizations of two bacterial strains showing high keratinase activities and their synergism in feather degradation. *Journal of Biotechnology*, 33: 191-199.
- Kılıç, A., Akay, M.T. 2008. A three generation study with genetically modified Bt corn in rats: Biochemical and histopathological investigation. *Food and Chemical Toxicology*, 46(3): 1164-1170.
- Klassen, R.D., Whybark, T. 1999. The impact of environmental technologies on manufacturing performance. *Academy of Management journal*, 11(1): 105-149.

- Koçberber, N., Dönmez, G. 2007. Chromium (VI) bioaccumulation capacities of adapted mixed cultures isolated from industrial saline waste waters. *Bioresource Technology*, 98:2178-2183.
- Kolker, E., Higdon, R., Hogan, J.M. 2006. Protein identification and expression analysis using mass spectrometry. *Trends in Microbiology*, 14: 229-235.
- Kourtev, P.S., Nakatsu, C.H., Konopka, A. 2006. Response of the anaerobic bacterial community to addition of organic C in chromium(VI)-and iron(III)-amended microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 628-637.
- Ksheminska, H., Fedorovych, D., Babyak, L., Yanovych, D., Kaszycki, P., Koloczek, H. 2005. Chromium(III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. *Process Biochemistry*, 40: 1565-1572.
- Kumbaşlı, M. 2004. *Bacillus thuringiensis berliner* ve zararlı böceklere karşı kullanımı. *Orman Fakültesi Dergisi*, 54:1.
- Kahvecioglu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S. 2003. Metallerin çevresel etkileri-1. *Metalurji Dergisi*, 136, 47-53
- LarsJärup, J. 2003. Hazards of metal contamination. *British medical bulletin*, 68:167-182.
- Lacoursière, J.O., Charpentier, G. 1985. High-dosage treatment of a Quebec stream with *Bacillus thuringiensis* sero var. *israelensis*: efficacy against black fly larvae (Diptera: Simuliidae) and impact on non. Cambridge University Press, 117(12): 1523-1534.
- Lee, B., Rouch, T., and Morby, A. 1995. Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. *Journal Industrial Microbiology*, 14: 132-141.
- Lee, B., Ahn, B.E., Cha, J., Ha, A.R. 2006. Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Biology*, 59(6): 1848-1858.
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Food Microbiology*, 55:181-186.
- Lereclus, D., Agaisse H. 1994. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the cryIIIa toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular microbiology*, 13(1): 97-107.
- Lewis, S.M., Dacie, J.V. 2002. *Practical Haematology*. Wiley Online Library, 52-53.

- Leonhäuser, J., Wang, W., Deckwer, W., Wagner-Döbler, I. 2007. Functioning of the mercury resistance operon at extremely high Hg(II) loads in a chemostat: A proteome analysis. *Journal of Biotechnology*, 132: 469-480.
- Li, K., Ramakrishna, W. 2011. Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *Journal of Hazardous Materials*, 189: 531–539.
- Lucca, De A.J., Walsh, T.J. 1999. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43: 1-11.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*, Tenth Edition. Pearson Education USA. 10.
- Malik, A. 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environmental International Applications*, 30:261-278.
- Margalit, J., Bobroglo, H. 1984. The effect of organic materials and solids in water on the persistence of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* Serotype H-14. *Journal of Applied Entomology*, 97(1-5): 516-520.
- Margalit, J., Ohana, S., Barak, Z.E. 1987. Fate of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* under simulated field conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(4): 828-831.
- Margalith, Y., Bendov, E. 2000. Biological control by *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. *Insect Pest Management: Techniques*, 8(5): 264.
- Martin, P.A.W., Travers, R.S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10): 2437-2442.
- Martin, J.S., Watson, J.W. 2002. No detection of Cry1Ac protein in soil after multiple years of transgenic Bt cotton (Bollgard) use. *Environmental BioOne*, 31(1): 30-36.
- Mendil, D., Tuzen, M., Usta, C., Soylak, M. 2008. *Bacillus thuringiensis var. israelensis* immobilized on Chromosorb 101, a new solid phase extractant for preconcentration of heavy metal ions in environmental. *Journal of Hazardous Materials*, 150(2): 357-363.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaëys, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., Lelie, D., Wattiea, R. 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 385-41032.
- Merroun, M., Pollmann, K., Raff, J., Fahmy, K. 2006. Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. *Biotechnology*, 24(1): 58-68.

- Mittal, K.L., Pizzi, A. 2003. Handbook of adhesive technology. Revised and Expanded Books, 7(1): 11.
- Moller, J.V., Nissen, P., Sorenson, T- L-M., Marie, M. 2005. Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase pump. Current Opinion in Structural Biology, 15:387-393.
- Msadek, T. 1999. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in Gram positive bacteria. Wiley Online Library, 31(1): 117-131.
- Mulla, M.S., Mian L.S. 1982. Residual activity of insect growth regulators against stored-product beetles in grain commodities. Journal of Economic Entomology, 75(1-4): 599-603.
- Mullen, K.D., Hoofnagle J.H., Peters M., Jones, D.B. 1988. Randomized, controlled trial of recombinant human α -interferon in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterology, 95(5): 1318-1325.
- Mullen, M.D., Wolf, C., Ferris, F.G. 1989. Bacterial Adsorption of metals, 55 (12): 3143-3149
- Neidhardt, F.C. and VanBogelen, R.A. 2000. Proteomic analysis of bacterial stress response, in bacterial stress responses. Society for Microbiology Press, 11: 445-452.
- Nesaty, V.J., Shuter, M.J.F. 2007. Proteomics for the analysis of environmental stress responses in organisms. Environmental Science and Technology, 41: 6891-6900.
- Nicholson, W.L. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. Cellular and Molecular Life Sciences, 59(3): 410-416.
- Nielsen, C., Raymond, B., Johnston, P.R., Leroux, C. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? Trends in Microbiology, 18(5): 184-185.
- Nies, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiology Biotechnology, 51: 730-750.
- Nies, D.H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiology. 27: 313-339.
- Nieto, M.A. 1989. IL-2 protects T lymphocytes from glucocorticoid-induced DNA fragmentation and cell death. Social Immunology, 143(12): 4166-4170.
- Nithya, C., Gnanalakshmi, B., Karutha Pandian, S.K. 2011. Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria. Marine Environmental Research, 71:283-294.

- Özcan, Ö., Yıldırım, V., Kaya, L., Albrecht, D., Becher, D., Hecker, M., and Özcengiz, G. 2007. *Phanerochaete chrysosporium* soluble proteome as a prelude for the analysis of heavy metal stress response. *Proteomics*, 7: 1249, 1260.
- Pan, G., Luetke, K., Juby, C.D., Brouseeau, R. 1993. Ligation of synthetic activated DNA substrates by site specific recombinases and topoisomerase. *The Journal of Biological Molecularbiology*, 268: 3683-3689.
- Pal, A., Dutta, S., Paul, A.K. 2005. Reduction of hexavalent chromium by cell-free extract of *Bacillus sphaericus* and 303 isolated from serpentine soil. *Current Microbiology*, 51(5): 327-330.
- Piotrowska, Z., Seget, M., Cycoń, J. 2005. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Applied Soil Ecology*, 28(3): 237-246.
- Rabilloud, T. 2000. *Proteome Research: two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*. Springer Germany, 248.
- Rayner, P.J., Scholes, R.J., Steffen, W.L., Wirth, C. 2001. Recent patterns and mechanisms of carbon exchange by terrestrial ecosystems. *Nature*, 409(1): 172-185.
- Regis, R.C., Souillard, M. 2001. Energetics, a new field of applications for hydrophobic zeolites. *Journal American Chemical Society Publications*, 123(33): 8129-8130.
- Roosa, S., Wattiez, R., Prygiel, E., Lesven, L., Billon, G., Gillan, D.C. 2014. Bacterial metal resistance genes and metal bioavailability in contaminated sediments. *Environmental Pollution*, 189:143-151.
- Rossbach, J. 2000. First observation of self amplified spontaneous emission in a free-electron laser at 109 nm wavelength. *Physical Review Letters*, 85: 11
- Rosovitz, J., Voskuil, M., Chambliss, G.H. 1998. *Bacillus*, to play and Wilson's microbiology and microbial infections, systematic, bacteriology, by edited L. Collier, A. Balows and M. Susman. Oxford University New York, 2:5-193.
- Saleh, M.S., El-Meniawi, F.A., Kelada, N.L. 2003. Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 127(1): 29-32.
- Sauka, T., Bronner-Fraser, M., Spengler A. 2010. Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. *Annual Reviews of Cell*, 26: 581-603.
- Schmidt, A., Haferburg, G., Sineriz, M., Merten, D., Büchel, G., and Kothe, E. 2005. Heavy Metal mechanisms in actinobacteria for survival in and contaminated soils. *Chemical Der Erda*, 65: 131-144.

- Segal, G., Ron, E.Z. 1998. Regulation of heat shock response in bacteria. *Annals of the New York Academy*, 851:147-157.
- SelenskaPobell, S., Panak, P. 1999. Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. Sphaericus* from drain waters of a uranium waste pile. *Fems Microbiology Ecology*, 29(1): 59-67.
- Setlow, P., Herbig, A. 1998. *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Molecular Biology*, 39(2): 61-63.
- Setlow, P. 1988. Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus* species, structure, synthesis, genetics, function, and degradation. *Annual Reviews in Microbiology*, 42: 319-338.
- Sharma, S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R., and Gade, W.N. 2006. Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. *Journal of Biotechnology*, 126: 374-382.
- Sheela, S., Rohit, M. 1994. Uptake of zinc in *Pseudomonas* spp, Strain UDG26. *Environmental Microbiology*, 6: 44.
- Shilev, S., Lopez, A.F., Prieto, M.S., Puebla, E. 2007. Induced protein profile changes in arsenate tolerant and sensitive *Pseudomonas fluorescens* strains. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 15: 221-226.
- Slepecky, R.A., Hemphill, H.E. 1992. The Genus *bacillus* nonmedical in the prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications, 4(2):87-92.
- Sneath, P. H. A. 1986. Endospore-forming gram positive rods and cocci, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* edited by P. H. A. Sneath, N. S., Mair, M. E., Sharpe, J. G. Holt. Williams and Wilkins. Baltimore, 2:1104-1139.
- Stephens, M.S., Overmyer, J.P., Gray, E.P. 2004. Effects of algae on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against larval black flies. *Journal and Microbiology*, 20(2): 171-175.
- Sultan, S., Hasnain, S. 2006. Characterization of an *Ochrobactrum* intermedium strain STCr-5 manifesting high level Cr (VI) resistance and reduction potential. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 883-888.
- Taubman, S. 1992. Genus *Bacillus*. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, 355-356 .
- Tokcaer, Z. 2003. Response Surface Optimization of *Bacillus thuringiensis israelensis* Fermentation. etd.lib.metu.edu.tr.

- Toparlak, M., Vuruşaner, C. 2016. Molecular Detection and Typing of Anaplasma Species in Small Ruminants in Thrace Region of Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22(1): 133-138.
- Tosukhowong, A., Nakayama, J., Mizunoe, Y., Sugimoto, S., Fukuda, D., Sonomoto, K. 2005. Reconstruction and function of Tetragenococcus halophil achaperonin 60 tetradecamer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99: 30-37.
- Tunail, N., Köşker, Ö. 1986. Süt mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Ankara, 966:138
- Travers, R.S., Martin, P.A.W. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Social Microbiology*, 53(6): 1263-1266.
- Tyrell, D.J., Davidson, L.I., Bulla, L.A. 1979. Toxicity of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquitoes. *Social Microbiology*, 38(4): 656-658.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B. 2001. A proteomeanalysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 8469-8474.
- Wahed, K., Kogan, I., Sadovskaya, P., Chaignon, K. 2006. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS*, 255(1): 11-16.
- Welsh, J., McClelland, M. 1990. Finger printing Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. *Nucleic Acids*,. *FEMS*, 18: 1713-1718.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleicacids*, 18(22): 6531-6535.
- Wirth, M.C., Walton, W.E., Federici, B.A. 2000. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* restores toxicity of *Bacillus sphaericus* against resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 37(3): 401-407.
- Yamamoto, K., Nakanishi, K., Matsuno, R., Torii, K. 1983. Properties of immobilized β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Enzyme and Microbiology*, 5(2): 115-120.
- Yamamoto, K., Yoshimura, Y. 2002. Construction and characterization of a nonpigmented mutant of *Porphyromonas gingivalis*, cell surface polysaccharide as an anchorage forgingipains. *Microbiology*, 148(4): 1183.
- Yavuz, Ö., Altunkaynak, Y., Güzel, F. 2003. Removal of copper, nickel, cobalt and manganese from aqueous solution by kaolinite. *Water Research*, 37: 948-952.

- Yavuz, O. 2016. Toprak ve Sucul Ortamlardaki Ağır Metal Kirliliği ve Ağır Metal Dirençli Mikroorganizmalar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7(1): 44-51.
- Yılmaz, M., Yılmaz, R., Gaffaroğlu, M., Erdoğan, K., Türköz, Y., Yüksel, E. 2003. Tekstil fabrikası atığının *Cyprinion macrostomus*, karaciger, böbrek ve kan dokusuna olan biyokimyasal, histopatolojik ve genotoksik etkisi. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Dergisi, 7(1):230-235.
- Yoshimura, K., Yamamoto, O., Seki, T. And Oshima, Y. 1990. Distrubition of heterogenous and homologous plasmids in *Bacillus* spp. Applied and Environmental Microbiology. 46(6):1268-1275.
- Yousef, A.E., Courtney, P.D. 2003, Basics of stres adaptation and implications in new-generation foods. CRC New York, 1:25.

EKLER

EK 1

NYSM agar

Kullanılan Maddeler	Gerekli Oranlar
Nutrientagar	23 g
Yeastextract	0,5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1036 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0006 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,095 g
Distile Su	1000 mL

Besiyerinin pH'ı 7'ye ayarlanarak, 121°C'de 15 dakika sterilizasyonu yapıldı.

EK 2

NYSM broth

Kullanılan Maddeler	Gerekli Oranlar
Nutrientbroth	8 g
Yeastextract	0,5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1036 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0006 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,095 g
Distile Su	1000 mL

Besiyerinin pH'ı 7'ye ayarlanarak, 121°C'de 15 dakika sterilizasyonu yapıldı.

EK 3

SDS-PAGE İÇİN ÇÖZELTİLER:

Monomer Çözeltisi (%30'luk Akrilamid Çözeltisi)

Acrylamide	28,8 g
Bisacrylamide	1,2 g
Distile Su	100 ml

Maddeler gerekli miktarlarda tartılıp damıtık su içerisinde çözülerek son hacim 100 mL'ye tamamlanır. Whatman filtre kağıdından süzülerek, renkli cam şişede +4°C de saklanır.

Ayırma Jel Çözeltisi(1,5 M Tris-HCl, pH:8,6)

Trisma Base	18,15 g
SDS (% 10 luksolusyon)	0,4 g
Distile Su	100 mL

Gerekli miktar trismabase tartılarak bir miktar damıtık suda çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH 8.6 ya ayarlanır.Hacim 100 mL ye tamamlandıktan sonra Whatman filtre kağıdından süzülür ve +4°C de saklanır.SDS PAGE için % 0,4 oranında SDS ilave edilir.

Stoklama Jel Çözeltisi (0,5 M Tris-HCl, pH:6,8)

Trisma Base	6,05 g
SDS(% 10 luksolusyon)	0,4 g
Distile Su	100 mL

Gerekli miktar trismabase tartılarak bir miktar damıtık suda çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH 6.8 e ayarlanır. Hacim 100 mL tamamlandıktan sonra Whatman filtre kağıdından süzülür ve +4°C de saklanır. SDS PAGE için % 0,4 oranında SDS ilave

edilir.

Numune Tamponu (0,5 M Tris-HCl, pH:6,8)

SDS	2 g
Brom Fenol Blue (%0,05)	0,025 g
Glycerol	8 mL
2-MerkaptoEtanol	4 mL
Distile Su	3 mL
Stoklama jel tamponu (0,5 MTris-HCl pH:6,8)	5,12 mL

Gerekli miktarlar tartılıp deney tüpü içersinde homojen hale getirilir ve gün ışığına maruz bırakılmadan saklanır.

Boyama Çözeltisi

CommassieBrillant Blue (Sigma)	1,5 g
İzopropil Alkol (Merck)	250 mL
Asetik asit (Merck)	100 mL
Damıtık Su	650 mL

Boya çözüldükten sonra Whatman filtre kağıdından süzülür ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanır.

Solusyon:Boya Çıkarma Çözeltisi

İzopropil Alkol	250 mL
Asetik asit	100 mL
Damıtık Su	650 mL

Gerekli miktarlar tartılarak 650 ml damıtık suda çözdürülür. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında renkli cam şişede saklanır.

Jel Saklama Çözeltisi

Jelleri saklamak amacıyla % 7lik glasiyal asetik asit çözeltisi kullanılır.

Solusyon:%10 luk Amonyum Per Sülfat (APS)

APS 1 g

Damıtık Su 10 mL

Gerekli miktarlar tartılarak damıtık suda çözülür ve +4°C de saklanır.Bir haftadan sonra yeniden taze hazırlanarak kullanılır.

Tank Tamponu

Trisma Base 1,65 g

Glisine 8 g

SDS 1,4 g

Distile Su 1100 mL

Gerekli miktarlar tartılarak damıtık suda çözülür, hacim 1100 mL ye tamamlanır.

Ayrırma jeli:

Ayrırma jeli	% 10
Akrilamid / Bisakrilamid	4,39 mL
Tris-HCl (pH : 8.6)	3,29 mL
Distile H ₂ O	5,42 mL
APS	62,500 µL
TEMED	5,00 µL
Toplam Hacim	12,500 mL

Yığma jeli:

Yığma Jeli	% 4
Akrilamid / Bisakrilamid	0,81 mL
Tris-HCl (pH : 6.8)	1,235 mL
Distile H ₂ O	2,95 mL
APS	50,00 µL
TEMED	6,00 µL
Toplam Hacim	5,00 mL



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	:NEVİN GÖRMEZ
Doğum Tarihi ve Yeri	:07/05/1986-KASTAMONU
Yabancı Dili	: İNGİLİZCE
E-posta	:nevinbzkr86@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	BİYOLOJİ	SİNOP ÜNİVERSİTESİ	2017
Lisans	BİYOLOJİ	ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ	2009

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2010	MEB	VEKİL ÖĞRETMENLİK
2012	TİAMO EĞİTMENLİĞİ	MATEMATİK-İNGİLİZCE ÖZEL DERS EĞİTMENLİĞİ
2017	ANADOLU HASTANELERİ	TEHLİKELİ MADDE GÜVENLİK DANIŞMANLIĞI

YAYINLARI

1. BERBER İSMET, AVŞAR CUMHUR, ÇİNE NEVRA,BOZKURT NEVİN, ELMAS EMİRE (2013). Sinop'da Yetişen Bazı Bitkilerin Metanolik Ekstraktlarının Antibakteriyal ve Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi. Karaelmas Science and Engineering Journal, 3(1), 10-16
2. SIVACI AYSEL, ELMAS EMİRE, BOZKURT NEVİN, DUMAN SEVCAN (2012). The effects of the pine sac beetle (*Thaumetopoea pityocampa* SCHIFF.) on total phenolic compounds and photosynthetic pigment contents in Pine species (*Pinus nigra*L. And *Pinus brutia*TEN.). African Journal of Biotechnology, 11, 14297-14304.

