



GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Topraktan İzole Edilen *Bacillus thuringiensis* Suşlarının
Karakterizasyonu ve İnsektisidal Aktivitelerinin Araştırılması**

Türkmen AYAKSIZ

EYLÜL 2014

GİRESUN

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Topraktan İzole Edilen *Bacillus thuringiensis* Suşlarının
Karakterizasyonu ve İnsektisidal Aktivitelerinin Araştırılması**

Türkmen AYAKSIZ

EYLÜL 2014

GİRESUN

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü'nün onayı.

..../..../....

Doç. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

..../..../....

Prof. Dr. İhsan AKYURT

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Hatice KATI

Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Hatice KATI

Doç. Dr. Emine YALÇIN

Yrd. Doç. Dr. Kadriye ÖZCAN

ÖZET

Topraktan İzole Edilen *Bacillus thuringiensis* Suşlarının Karakterizasyonu ve İnsektisidal Aktivitelerinin Araştırılması

AYAKSIZ, Türkmen

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Hatice KATI

Eylül 2014, 81 sayfa

Kimyasal mücadelenin çevreye verdiği zararlı etkilerden ve böceklerin kimyasallara karşı direnç kazanmasından dolayı son yıllarda biyolojik mücadele çalışmaları daha da önemli yer tutmaktadır. Biyolojik mücadelede insektisidal kristal protein üreten *Bacillus thuringiensis* suşlarının mikrobiyal insektisit olarak kullanılmasına olan ilgi iyice artırmıştır. Bu nedenle zararlılara karşı yeni *Bacillus thuringiensis* suşlarının bulunması üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmada, Giresun Adası toprak örneklerinden izole edilen dört *B. thuringiensis* suşu; kristal morfolojisi, SDS-PAGE analizi, plazmit profilleri, *cry* gen içerikleri, yağ asit analizi ve biyokimyasal testleri yapılarak tanımlanmıştır. İzolatların kristal boyama sonucunda bipiramidal ve şekli belirlenemeyen kristaller içerdiği görülmüştür. İzolatlar *cry1*, *cry2*, *cry3* ve *cry4* genel primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutulmuş ve izolatların bu *cry* genlerini taşımadığı belirlenmiştir. İzolatların plazmit profilleri incelendiğinde T3 izolatının 3, T1 izolatının 4, T4 izolatının 5, T2 izolatının ise 6 plazmit taşıdığı görülmüştür. *Agelastica alni* ve *Ephestia kuehniella* larvaları üzerinde izolatların insektisidal aktiviteleri araştırılmış ve *Agelastica alni* larvaları ile yapılan bioassaylerde en fazla insektisidal etki %84,6 ölüm oranı ile T2 bakterisinde görülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Bacillus thuringiensis*, *cry* gen, kristal protein

ABSTRACT

Investigation of Insecticidal Activities and Characterization of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Soil Samples

AYAKSIZ, Türkmen

Giresun University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hatice KATI

September 2014, 81 pages

Recently, biological control studies have become more important due to harmful effects of chemicals on environment and resistances of the insects to these chemicals. The interest of *Bacillus thuringiensis* strains producing insecticidal proteins as microbial insecticide has increased. Therefore, studies on the isolation of new *Bacillus thuringiensis* strains for using against the insect pests have become popular. In this study, four *B. thuringiensis* strains isolated from the soil samples in Giresun Island have been identified as crystal morphology, SDS-PAGE analysis, plasmid profile, *cry* gene content, fatty acid analysis and biochemical tests. The result of crystal painting of isolates shows that isolates contain bipyramidal and undefined crystals. Polymerase chain reaction (PCR) was performed on isolates by using general primers (*cry1*, *cry2*, *cry3* and *cry4*). It is determined that isolates don't contain these kind of *cry* genes. While examining plasmid profiles of isolates, T1, T2, T3 and T4 have 4, 6, 3, 5 plasmid profiles, respectively. Insecticidal activities of Isolates on *Agelastica alni* and *Ephestia kuehniella* larvae researched and the most insecticidal effect by %84,6 death rate in T2 bacteria have seen in the bioassays with *Agelastica alni* larvae.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *cry* gene, crystal protein

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin seçiminde, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında her türlü desteği sağlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hatice KATI'ya; teknik ve idari bakımdan her türlü desteği sağlayan Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. İhsan AKYURT'a teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarımda bilgi ve desteklerini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Hüseyin YILMAZ ve Arş. Gör. Serpil UĞRAŞ'a; Vitek 2 cihazı ile ilgili çalışmaların yürütülmesinde gerekli kolaylığı sağlayan Giresun İl Kontrol Laboratuar'ı idari personeline ve Mikrobiyoloji Birim Sorumlusu Sayın Canan TÜRKER'e, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) temin eden Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Kazım SEZEN'e, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde yağ asiti çalışmalarının yürütülmesinde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Fikretin ŞAHİN'e ve Ahmet KATI'ya ve bilgi birikimleri ile bana destek sağlayan tüm hocalarıma ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bu tezin hazırlaması sırasında maddi-manevi desteğini esirgemeyen vefakâr aileme, sevgili Mak. Müh. Aziz Cihat DUTKUN'a içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 113Z010 nolu projesi kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>B. thuringiensis</i> 'in Genel Özellikleri	3
1.1.1. <i>B. thuringiensis</i> Tarihçesi	4
1.1.2. <i>B. thuringiensis</i> 'in Habitatları	5
1.1.3. <i>B. thuringiensis</i> 'in Genomu.....	6
1.1.4. <i>B. thuringiensis</i> Suşlarında Endospor ve İnsektisidal Kristal Protein (ICP) Oluşumu	7
1.1.5. <i>B. thuringiensis</i> Cry Gen ile İnsektisidal Kristal Proteinlerin (ICP) İsmlendirilmesi ve Sınıflandırılması.....	9
1.1.6. <i>B. thuringiensis</i> 'in İnsektisidal Kristal Proteinlerinin Yapısı ve Fonksiyonu	11
1.1.7. İnsektisidal Kristal Proteinlerinin Etki Spektrumu	15
1.1.8. Cry Toksinlerinin Etki Mekanizması.....	16
1.1.8.1. Protoksin Aktivasyonu	17
1.1.8.2. Toksin Aktivasyonu	18

1.1.8.3.	Reseptör Bağlanması.....	19
1.1.8.4.	Zarda Por Oluşumu	21
1.1.9.	<i>B. thuringiensis</i> Tarafından Üretilen Diğer Bileşikler	22
1.1.10.	<i>B. thuringiensis</i> Toksinlerine Karşı Böcek Direnci	24
1.2.	<i>B. thuringiensis</i> Suşlarının Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler.....	25
1.3.	Tezin Amacı	27
2.	MATERYAL VE METOT	28
2.1.	Örneklerin Alınması	28
2.2.	Topraktan <i>B. thuringiensis</i> İzolasyonu	28
2.3.	İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	28
2.3.1.	Gram Boyama	28
2.3.2.	Spor-Kristal Boyama.....	29
2.4.	İzolatların Stoklanması.....	29
2.5.	Spor ve Kristal Süspansiyonlarının Hazırlanması.....	29
2.6.	İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi	29
2.6.1.	Çalışmada Kullanılan Standart <i>B. thuringiensis</i> Suşları	29
2.6.2.	İzolatların Genomik DNA İzolasyonu	30
2.6.3.	<i>B. thuringiensis</i> İzolatlarının <i>cry</i> Gen İçeriklerinin Belirlenmesi.....	30
2.6.4.	İzolatların 16S rRNA Gen Bölgelerinin Araştırılması.....	32
2.6.4.1.	İzolatların 16S rRNA Primerlerinin Dizaynı ve Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması	32
2.6.4.2.	İzolatların 16S rRNA Gen Bölgelerinin pGEM-T Easy Vektöre Klonlanması	33
2.6.4.3.	<i>Escherichia coli</i> JM101 Hücrelerinin Hazırlanması	34

2.6.4.4. İzolatların 16S rRNA Gen Bölgelerinin <i>Escherichia coli</i> JM101'e Transformasyonu.....	34
2.6.4.5. Transfer Edilen Rekombinant Plazmitlerin <i>Escherichia coli</i> JM101'den İzole Edilmesi ve Kontrolü	35
2.6.4.6. İzole Edilen Plazmitlerin 16S rRNA Gen Bölgelerinin Dizi Analizi ve İncelenmesi	35
2.7. İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin VITEK-2 Sistemiyle Belirlenmesi.....	36
2.8. Bakteriyel İzolatların Yağ Asidi Profillerinin Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS) Kullanılarak Belirlenmesi.....	36
2.9. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	37
2.10. <i>B. thuringiensis</i> İzolatlarından Plazmit İzolasyonu	39
2.11. İzolatların İnsektisidal ve Antibakteriyel Etkilerinin Araştırılması.....	40
2.11.1. İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	40
2.11.2. İzolatların Bazı Bitki Patojeni Bakteriler Üzerinde Antibakteriyel Etkilerinin Araştırılması.....	41
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	42
3.1. İzolatların Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	42
3.1.1. İzolatların Morfolojik Özellikleri.....	42
3.1.2. İzolatların Toplam Hücresel Yağ Asiti Profilleri.....	43
3.1.3. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri	46
3.1.4. İzolatların 16S rRNA Analizleri	48
3.1.5. İzolatların Plazmit İçerikleri	49
3.1.6. İzolatların Kristal Protein Profilleri	50
3.2. İzolatların İnsektisidal ve Antibakteriyel Etkileri	51
3.2.1. İzolatların İnsektisidal Aktiviteleri	51

3.2.2. İzolatların Bitki Patojeni Bakteriler Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri	52
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
KAYNAKLAR	57
EKLER.....	76
ÖZGEÇMİŞ	81

TABLULAR DİZİNİ

1.1. Aktivitelerine göre <i>B. thuringiensis</i> ICP'leri	6
2.1. Genel primerler ile tespit edilen <i>cry</i> genleri ve ürün büyüklükleri	31
2.2. Antibakteriyel Etkinin Araştırılması için Kullanılan Bitki Patojeni Bakteriler	41
3.1. İzolatların Toplam Yağ Asit Oranları (%)	44
3.2. İzolatların Yağ Asit İçeriklerine Göre Benzediği Bakteriler ve Oranları	45
3.3. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri	46
3.4. İzolatların 16S rRNA Dizilerine Göre Tür Tayinleri	48
3.5. İzolatların plazmit DNA sayıları ve büyüklükleri	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. <i>B. thuringiensis</i> 'in elektron mikroskop görüntüsü.....	3
1.2. Endospor oluşumu.....	8
1.3. Spor ve kristal proteinlerin Taramalı Elektron Mikroskop görüntüsü.....	9
1.4. ICP gen ve kristal protein isimlendirilmesi.....	10
1.5. <i>B. thuringiensis</i> 'in Cry proteinlerinin filogenetik ağacının kısmi şematik görünüşü.....	11
1.6. Cry1Aa, Cry3A ve Cyt2A toksinlerinin üç boyutlu yapıları	12
1.7. İnsektisidal kristal proteinlerin üç boyutlu kristal yapısı	13
1.8. <i>B. thuringiensis</i> kristal proteinlerinin amino asit dizi karşılaştırması.....	14
1.9. Por oluşum modeli ve sinyal iletim modeli.....	16
1.10. Spesifik ve nonspesifik toksin-reseptör bağlanma modeli.....	20
1.11. Cry 1A'nın aktivasyonu	22
2.1. pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesini, replikasyon orijinini, <i>LacZ</i> genini ve ampisilin direnç genini gösteren harita	33
2.2. Protein standart grafiği	38
2.3. Biyoassay Uygulaması	40
3.1. T1 izolatına ait kristal boyama ve T4 izolatına ait Gram boyama	42
3.2. İzolatların 16S rRNA PCR ürünleri	48
3.3. İzolatların plazmit içerikleri.....	49
3.4. <i>B. thuringiensis</i> izolatlarının spor-kristal karışımlarının protein profilleri.....	50
3.5. İzolatlardan elde edilen 10^9 spor-kristal/ml karışımının <i>Agelastica alni</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi.....	51

3.6. İzolatlardan elde edilen 10^9 spor-kristal/ml karışımının <i>E. kuehniella</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi.....	52
3.7. T3 bakterisinin <i>Micrococcus luteus</i> üzerindeki antimikrobiyal etkisi	52

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
ALP	Alkalin Fosfataz
APN	Aminopeptidaz-N
ATP	Adenozin trifosfat
BBMV	Brush border membrane vesicle (firça kenarlı zar vezikülleri)
bp	Baz çifti
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>
Btk	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>
BT-R	Cadherin reseptörleri
Btt	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>
CaCl_2	Kalsiyum Klorür
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CBB	Coomassie Brilliant Blue
Cry	Kristal Protein
<i>cry</i>	Kristal Protein Geni
cyt	Sitolitik
dH_2O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
<i>E.coli</i> JM101	Escherichia coli JM101
EDTA	Etilen Diamintetraasetik Asit
EtBr	Etidyum bromür
FAME	Yağ Asit Metil Ester (Fatty acid methyl esters)
HCl	Hidroklorik asit

ICP	İnsektisidal Kristal Protein
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranoside
ITS	Internal transcribed sequences
kb	Kilo baz
kDa	Kilo Dalton
LB	Lurian Bertani besiyeri
M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligram
MIS	Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum Klorür
nm	Nanometre
O.D	Optik dansite
PAGE	Poli akrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pGEM-T	Klonlama Vektörü
RAPD	Rasgele Çoğaltılan Polimorfik DNA
rDNA	Rekombinant Deoksiribonükleik Asit
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Revolutions per minute
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
S	Sverback Sabiti
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	Tetra Etilen Diamit

U	Unit
UV	Ultra Viole
V	Volt
VIP	Vejetatif Insektisidal Potein
X-gal	Bromo-Chloro-Indolyl-Galactopyranoside
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
μm	Mikrometre

1. GİRİŞ

Zararluların sebep olduğu ürün kaybını azaltma çabaları tarımsal üretimin geçmişi kadar eski olmakla birlikte zararlı böcek popülasyonlarının kontrol altında tutulması hususunda birçok yöntem geliştirilmiştir. Günümüzde böceklere karşı en etkili mücadele yöntemi, kimyasal mücadeledir ve zararlı popülasyonların %95'i bu yöntemle yok edilebilmektedir. Bu sentetik ilaçların üretimi kolay ve maliyetleri düşüktür. Kimyasal mücadelenin bu özellikleri, yöntemin çok fazla kullanılmasına neden olmuştur. Tüm bu olumlu yönlerine karşılık beraberinde bir takım sorunları da getirmiştir (Öztürk, 2000). Aşırı kimyasal insektisit kullanımı ile zararlının ekolojik kökeni ihmal edilerek besin zinciri yoluyla bir çok organizmanın ortadan kalktığı ve sekonder zararlı patlaması olarak bilinen ve daha önce zararlı olmayan bir çok zararlının ortaya çıktığı görülmüştür. Zararlı popülasyonunu geçici olarak baskı altında tutması gibi birçok avantajı olmasına rağmen, kimyasal insektisitler toprağa, su sistemlerine ve besin zincirine karışarak bu ortamların kirlenmesine ve çevredeki faydalı böcekleri, bal arılarını, kuşları, balıkları ve insanları olumsuz yönde etkileyerek çevre üzerinde dönüşü mümkün olmayan birçok olumsuzluklara neden olmaktadır (Ayvaz, 2001). Ayrıca böceklerin kimyasal insektisitlere karşı direnç kazanmaları da ayrı bir problem alanıdır.

Kimyasal mücadelenin olumsuz etkilerinden dolayı bu konuya kamuoyunun ilgisi artmış ve alternatif mücadele yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında biyolojik mücadele veya biyopestisitlerin kullanımı önemli yer tutmaktadır. Biyolojik mücadele istenmeyen zararlı bir organizmanın faydalı başka bir organizma tarafından popülasyonunun zarar seviyesinin altında tutulması olarak tanımlanabilir. Biyolojik mücadele yöntemlerinden birisi de çok daha yaygın olarak tercih edilen, entomopatojen organizma olan *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bacillales: Bacillaceae) ürünlerinin kullanımınıdır.

B. thuringiensis, sporulasyon süresi boyunca yüksek miktarda insektisidal kristal proteinler (ICP) üretme yeteneği ile entomopatojenik özellik gösterir (Schnepf ve ark., 1998). Zararlı popülasyonlarını önemli ölçüde azaltarak doğal dengenin bozulmasını engellemektedir (Walker ve ark., 2003). Kristal (Cry) proteinler, farklı takımlarda yer alan zararlılara karşı yüksek oranda seçici bir insektisidal aktivite

gösterirler (Höfte ve Whiteley, 1989; Feitelson ve ark., 1992). *B. thuringiensis* içerikli böcek ilaçları predatör böcekler, diğer hayvanlar ve insanlar için zararlı değildir.

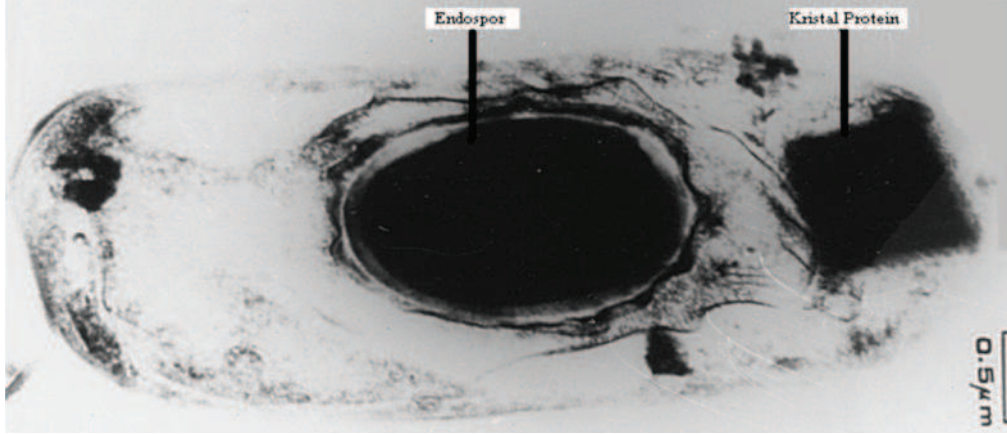
Cry protein genlerinin (*cry* genler) genetik çeşitliliği ve dağılımı, *cry* genlerin izole edildikleri bölgelere göre farklılık gösterebilmektedir (Bravo ve ark., 1998; Uribe ve ark., 2003). Dolayısıyla, yeni Cry protein genlerini ve farklı zararlı grupları için yüksek oranda toksik etkili yeni Cry proteinlerini (Cry toksinleri) tanımlamak için tüm dünyada *B. thuringiensis* suşları izole edilmektedir (Martin ve Travers, 1989; Ben-Dov ve ark., 1997; Bravo ve ark., 1998; Uribe ve ark., 2003; Wang ve ark., 2003; Apaydın ve ark., 2005; Gao ve ark., 2008; Seifinejad ve ark., 2008; Thammasittirong ve Attathom, 2008; Patel ve ark., 2011).

Tarımdaki diğer bir problem de bitkilerde ve bitkisel ürünlerde hastalık etmeni olan bakterilerdir. Bitki patojeni bakterilere karşı bakır ve bakırlı bileşikler ve bunların dithiocarbamatlı (maneb, mancozeb) bileşikler ile karışımları koruyucu amaçlı olarak önerilmektedir. Ancak pek çok bitki patojeni bakteri bakıra karşı dayanıklılık kazanabilmektedir. Benzer şekilde insan ve hayvan hastalıklarına karşı kullanılan streptomisin gibi bazı antibiyotikler de bazı ülkelerde hastalığa karşı kullanılmış ancak çok kısa sürede dayanıklılık sorunu ile karşılaşmıştır. Bakteri hastalıklarıyla mücadelede fazla alternatif olmaması dolayısıyla yeni alternatiflerin bulunması ve uygulamaya verilmesi daha fazla önem kazanmaktadır.

Kimyasal mücadelenin olumsuz yönleri göz önünde bulundurulduğunda *B. thuringiensis* ürünlerinin zararlılarla mücadelede kullanılması, yaygınlaştırılması, farklı zararlılara karşı yeni *B. thuringiensis* izolatlarının taranması, laboratuvar ortamında toksik etkilerinin belirlenmesi, farklı formülasyonlar ve uygulama yöntemleri geliştirilerek ticari kullanımının sağlanması faydalı olacaktır.

1.1. *B. thuringiensis*'in Genel Özellikleri

B. thuringiensis; Gram ve katalaz pozitif, çubuk şekilli, fermentatif, mikroaerofilik ve anaerobik koşullarda üreme yeteneğine sahip ve spor formu oluşturabilen bir toprak bakterisidir. *B. thuringiensis*'in vejetatif hücrelerinin eni 1µm, boyu 5µm uzunluğunda olup hücre yüzeyi kısa flagellalara sahiptir (Waheed ve Kogan, 2006) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *B. thuringiensis*'in elektron mikroskop görüntüsü (Bozlağan, 2006)

B. thuringiensis, içerisinde *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pseudomycooides* ve *Bacillus weihenstephanensis*'in de bulunduğu *Bacillus cereus* grubunun bir üyesidir (Rasko ve ark., 2005). *B. cereus* vücut direnci zayıf insanlarda, *B. anthracis* memelilerde ve *B. thuringiensis* ise böcekler üzerinde patojendir. *B. cereus* bakterisi, *B. thuringiensis* bulunabilen her yerde görülebilir (Han ve ark., 2006). *B. thuringiensis* yalnızca sporulasyon sırasında özellikle Lepidoptera (kelebekler), Coleptera (kırkanatlılar) ve Diptera (iki kanatlılar, sinekler) takımı böcekler üzerinde toksik etki gösteren bir ya da daha fazla kristal protein üretmesi ile *B. cereus*'dan ayrılır (De Barjac, 1981).

Lereclus ve arkadaşları (1993) *B. thuringiensis*'in binlerce suşu olabileceğini belirtmişlerdir. *B. thuringiensis*'in sistematikteki yeri şu şekilde gösterilebilir;

Üst alem : *Bacteria*

Alem : *Eubacteria*

Şube : *Firmicutes*

Sınıf : *Bacilli*

Takım : *Bacillales*

Familya : *Bacillaceae*

Cins : *Bacillus*

Tür : *Bacillus thuringiensis* (URL-1)

1.1.1. *B. thuringiensis* Tarihçesi

B. thuringiensis ilk olarak Japon bakteriyolog Shigetane Ishiwatari tarafından 1901’de hastalıklı ipekböceği (*Bombyx mori*) larvasından izole edilmiştir. Hastalığa yol açan bu bakteriyi Ishiwatari ‘*Bacillus sotto*’ olarak isimlendirmiştir. Ancak bundan on yıl sonra Berliner Akdeniz Un Güvesi canlısında (*Anagasta kuehniella*) bu bakteriye benzer bir bakteri bulmuştur. Aynı bakteri olduğu anlaşılan bu bakteriyi *Bacillus thuringiensis* olarak isimlendirmiştir (Cannon, 1995). Fransada E. Kurstak ve Amerika’da H. Dulmage Lepidoptera’lara karşı etkili olan *B. thuringiensis* suşlarını izole ederek *kurstaki* alttürü olarak isimlendirmişlerdir (Dulmage ve Aizawa, 1982).

İlk zamanlarda *B. thuringiensis* toksinleri sadece Lepidoptera takımına karşı etkili diye düşünülmüş fakat daha sonra Diptera takımına karşı etkili olduğu da görülmüştür. Bunun üzerine *B. thuringiensis* üzerine araştırmalar artırılmıştır. *Bacillus thuringiensis*’in alt suşu *israelensis*’in, Diptera takımına (Goldberg ve Margalit, 1977) *tenebrionis*’in ise Coleoptera takımına karşı etkili olduğu saptanmıştır (Krieg ve ark., 1983). Bununla birlikte Hymenoptera, nematod, protozoa, akar ve yassısolucan gibi omurgasızlara karşı da öldürücü etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Feitelson, 1993).

B. thuringiensis’in ticari biyopestisit olarak kullanımı ilk olarak 1938’de başlamıştır. Toksinlerin doğada uzun süre etkisini koruyamaması nedeniyle zararlının biyolojik yapısına bağlı olarak, uygulamanın belirli aralıklarla

tekrarlanması gerekir. 1987 yılında genetik alanındaki gelişmelere bağlı olarak *B. thuringiensis* δ -endotoksinlerini kodlayan genler tütün ve domates bitkilerine aktarılmıştır (Van Frankenhuyzen, 1993). *B. thuringiensis* toksinlerini ifade eden mısır bitkisi 1995'te Birleşik Devletler Çevre Koruma Birimi tarafından tescil edilmiştir (URL-2). *B. thuringiensis* toksinlerinin, kimyasal insektisitlerin nüfuz edemediği kısımlarda zarar veren böceklere karşı ifade edilmesi verim bakımından oldukça faydalıdır. Bunlara en iyi örnek mısır koçanına zarar veren *Ostrinia nubilalis*'tir. *O. nubilalis* larvaları koçan ve gövde kısmında faaliyet gösterdiği için kimyasal insektisitlerden zarar görmezler ve bitkinin yapısal bütünlüğünü bozarlar. Fakat toksinlerin bitkide ifade ettirilmesi *O. nubilalis* larvalarının doğrudan toksine maruz kalmasına neden olur (Ely ve ark., 1993). Günümüzde mısır, pamuk, patates ve pirinci de içerisinde alan pek çok bitkinin *B. thuringiensis* tohumları üretilmiştir ve bu tohumlar, Kanada, Japonya, Meksika, Arjantin, Avustralya ve Amerika'da yaygın olarak kullanılmaktadır (Frutos ve ark., 1999). *B. thuringiensis* ürünleri dünya genelinde çeşitli formülasyonlar halinde kullanılmakla birlikte transgenik bitki şeklinde kullanımı da yaygınlaşmaktadır (Liu ve Tabashnik, 1997).

1.1.2. *B. thuringiensis*'in Habitatları

B. thuringiensis suşları başta toprak olmak üzere kozalaklı ağaçların yaprakları, depo ürünleri, böcek ölüleri veya konukçu böcekler ve sucul ortamlar gibi birçok yerden izole edilebilmektedir (Bajwa ve Kogan, 2001). Çok sayıda *B. thuringiensis* suşu, ölü böceklerden izole edilmiş ve çoğu durumda da aynı böceğe karşı toksik aktivite göstermiştir. Bu organizmalar, konak böceklerin vücutları içinde çoğalırlar ve böcek larvası öldüğü zaman vücutları kristal ve spor içerir (Hansen ve ark., 1996).

1.1.3. *B. thuringiensis*'in Genomu

B. thuringiensis suşları 2.4 ile 5.7 milyon baz çifti arasında değişen uzunlukta bir genoma sahiptir. *B. thuringiensis* 2 ile 11 tane plazmit içerir. Bunlar dairesel ve doğrusaldır. Bu plazmitlerin büyüklükleri 2 ile 272 kb arasında değişiklik gösterir (Lereclus ve ark., 1993). İnsektisidal kristal proteinlerin (ICP) genellikle plazmitlerde kodlandığı ve suşlar arasında konjugasyon ile aktarılabildiği belirtilmiştir (Gonzalez ve ark., 1981). Her biri tek bir genin ürünüdür ve bir alttür birden fazla ICP sentezleyebilir. *B. thuringiensis* suşlarının birden fazla *cry* geni taşıyabildiği, bazılarında ise 8 farklı *cry* gen bulunduğu belirtilmiştir (Berliner, 1911). *Cry* genlerinin bazıları kromozomal DNA üzerinde yer almaktadır.

B. thuringiensis cry genlerinin kodladığı ICP'lerin etkili olduğu takımlar Tablo 1.1'de gösterilmiştir. Doğal halde bulunan *B. thuringiensis* suşlarının çoğu sadece bir familyaya karşı etkili ICP taşımaktadır. Buna rağmen suşlar arasında gerçekleşen konjugatif transfer sayesinde farklı plazmit içeriğine sahip yeni suşlar ortaya çıkabilmektedir. *B. thuringiensis* suşlarında görülen *cry* gen hareketliliği ve plazmit aktarımı böcekler karşı kompleks ve geniş aktivite spektrumuna neden olmaktadır (Gonzalez ve ark., 1981; Gonzalez ve Carlton, 1982; Reddy ve ark., 1987).

Tablo 1.1. Aktivitelerine göre *B. thuringiensis* ICP'leri

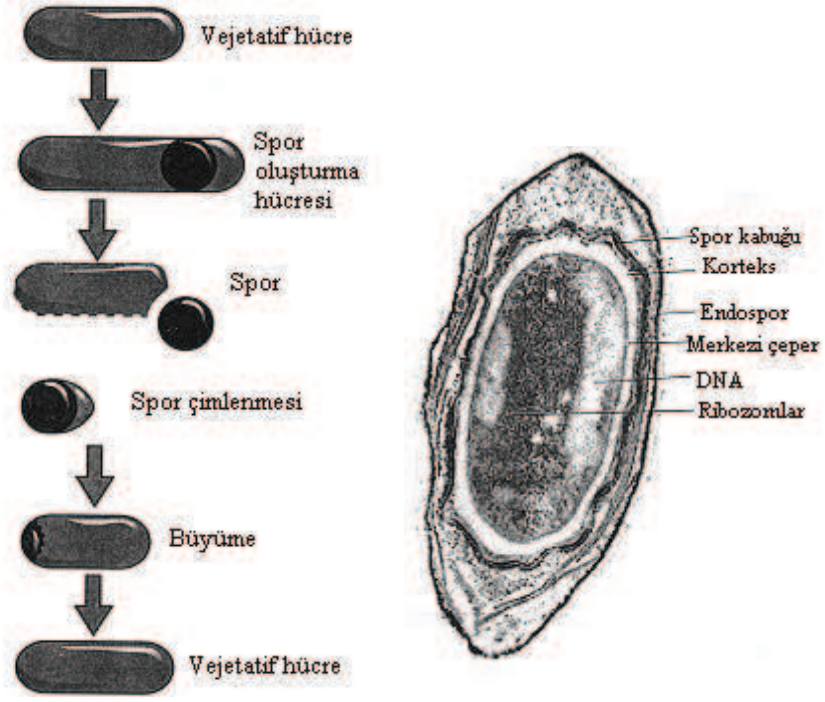
Gen Sınıfı	Etkilediği Böcek Takımı	Referans
<i>Cry1</i>	Lepidoptera takımına özgül	Schnepf ve ark., 1981
<i>Cry2</i>	Lepidoptera ve Diptera takımına özgül	Schnepf ve ark., 1981
<i>Cry3</i>	Coleoptera takımına özgül	Krieg ve ark., 1983
<i>Cry4</i>	Diptera takımına özgül	Widner ve Whiteley, 1989
<i>Cry5</i>	Nematodlara özgül	Narva ve ark., 1991

1.1.4. *B. thuringiensis* Suşlarında Endospor ve İnsektisidal Kristal Protein (ICP) Oluşumu

Endosporlar, vejetatif bakterilerde genellikle besin sıkıntısı olduğu durumlarda oluşturulur. Endosporlar sıcaklık, kuraklık, basınç ve birçok kimyasal dezenfektana karşı son derece dayanıklı yapılar olup, 121°C’de 15-20 dakika tutulduklarında ölürlür. Sporların dayanıklı olmasının en önemli nedenlerinden biri, içlerindeki sıvı miktarının az olmasıdır. Endosporları oval veya silindirik olup merkezde, merkeze yakın bölgelerde veya uç kısımlarda bulunabilir (Koneman ve ark., 2006).

Çevresel stres koşullarında nükleer materyal ikiye bölünür ve birbirinden zarsı bir bölme ile ayrılır. Bölmenin büyümesi ile birlikte spor özü çift tabakalı bir zar içerisinde kalır. İki zar arasında bir korteks tabakası oluşur. Bu korteks esas olarak peptidoglikan yapısındadır. Korteks tabakası kalınlaşır ve dipikolinik asitin şelatlama özelliği ile Ca^{+2} iyonlarını tutar. Böylece spordaki tüm su molekülleri dışarı atılır.

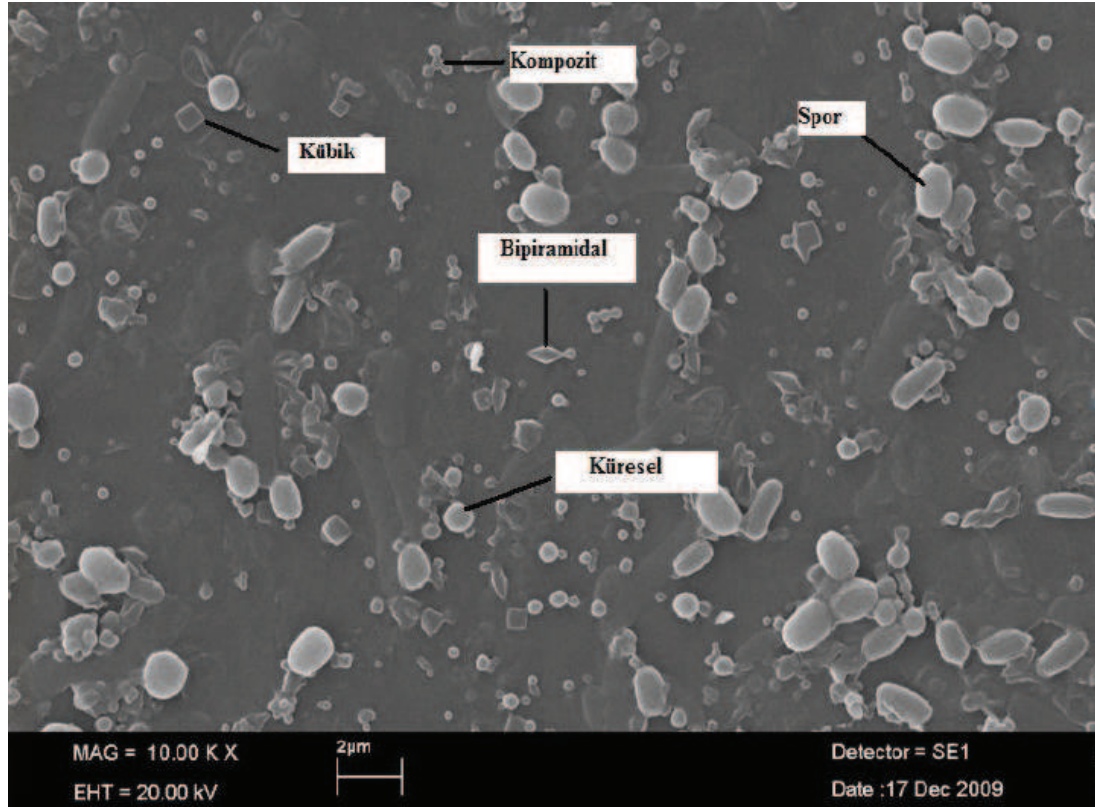
Endosporlar amino asit, karbonhidrat ve su gibi özel uyarıcıların olduğu bir ortama bırakıldığında çimlenme başlar. Enzimler aktifleştirildikten sonra spor korteksi sindirilerek peptidoglikan, Ca^{+2} iyonları ve dipikolinik asit serbest bırakılır. Daha sonra RNA sentezi başlar. Protein sentezinin ardından da DNA sentezi başlar ve yeni vejetatif hücre oluşur (Şekil 1.2) (Koneman ve ark., 2006). *B. thuringiensis* endosporlarının bazı böcek türlerine karşı toksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Bajwa ve Kogan, 2001).



Şekil 1.2. Endospor oluşumu (Koneman ve ark., 2006; URL-3).

B. thuringiensis, sporulasyon sürecine eş zamanlı olarak, büyük miktarda, bir ya da daha fazla kristal (Cry) ya da sitotoksik (Cyt) tip proteinden meydana gelen parasporal kristaller üretir (Crickmore ve ark., 1998; Maagd ve ark., 2003). δ -endotoksin olarak ta adlandırılan bu proteinler birçok böcek türüne karşı seçici toksik etki gösterir (Bajwa ve Kogan, 2001; Schnepf ve ark., 1998). δ -endotoksin, diğer hücre materyalleri gibi boyanmakta, ekzosporium oluştuğunda serbest halde görülmekte, sporelerden kolaylıkla ayrılmaktadır (Schnepf ve ark., 1998). Cry ve Cyt proteinlerinin aminoasit dizileri homolog değildir. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'in 27 kDa ağırlığındaki Cyt1A toksini in vivo da diptere, in vitro da ise memelilerin eritrositlerine karşı toksiktir (Höfte ve Whiteley, 1989).

Kristal proteinler; bipiramidal (baklava dilimi şeklinde), kübik, düzensiz şekilli, düz romboid ve birden fazla kristalin bir arada bulunduğu karmaşık şekilli olabilmektedir (WHO, 1999) (Şekil 1.3). Cry1 bipiramidal kristali, Cry2 kübik kristali, Cry3A düz dikdörtgen kristali, Cry4A ve Cry4B küre kristali şeklindeyken Cry11A paralelkenar şeklinde kristal inklüzyonları oluşturur (Schnepf ve ark., 1998).



Şekil 1.3. Spor ve kristal proteinlerin Taramalı Elektron Mikroskop görüntüsü (Yılmaz, 2010)

1.1.5. *B. thuringiensis* Cry Gen ile İnsektisidal Kristal Proteinlerin (ICP) İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması

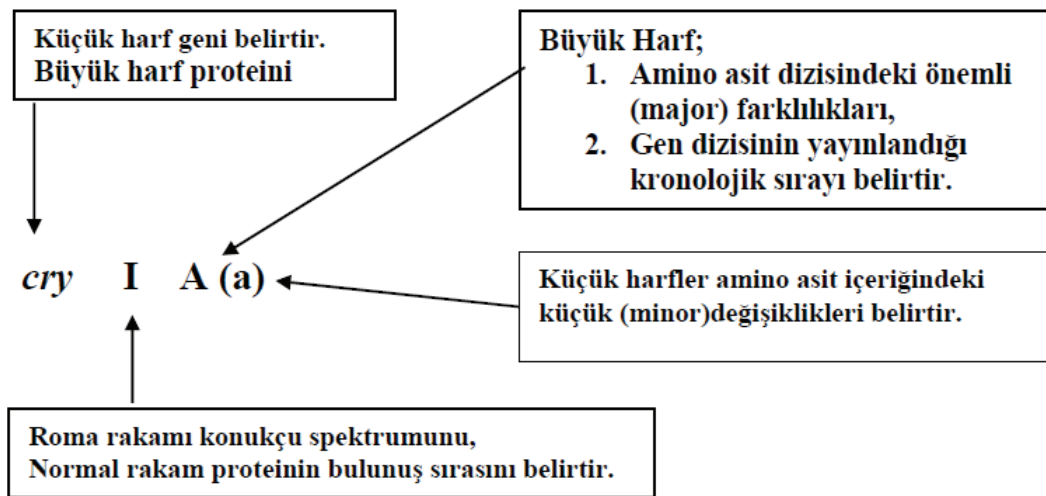
B. thuringiensis toksinleri Cry ve Cyt olmak üzere iki grupta incelenir. Toksinlerin sınıflandırılması amino asit dizilerindeki benzerliğe bakılarak yapılır. Sınıflandırmadaki her bir grubu tanımlamada, terim kargaşasını önlemek için iki ifade kullanılır (Sankaranarayanan ve ark., 1996). Bunlar şu şekilde belirtilmektedir;

1. Alt familya: Cry ve Cyt ailesinin bulunduğu birinci gen grubunun tüm üyelerini içerir (*cry1* alt familyası, *cry2* alt familyası, *cyt1* alt familyası gibi).

2. Grup: İkinci sınıflandırma grubundaki tüm genleri içerir (*cry1C* grubu, *cyt2B* grubu gibi) (Goldberg ve Margalit, 1977).

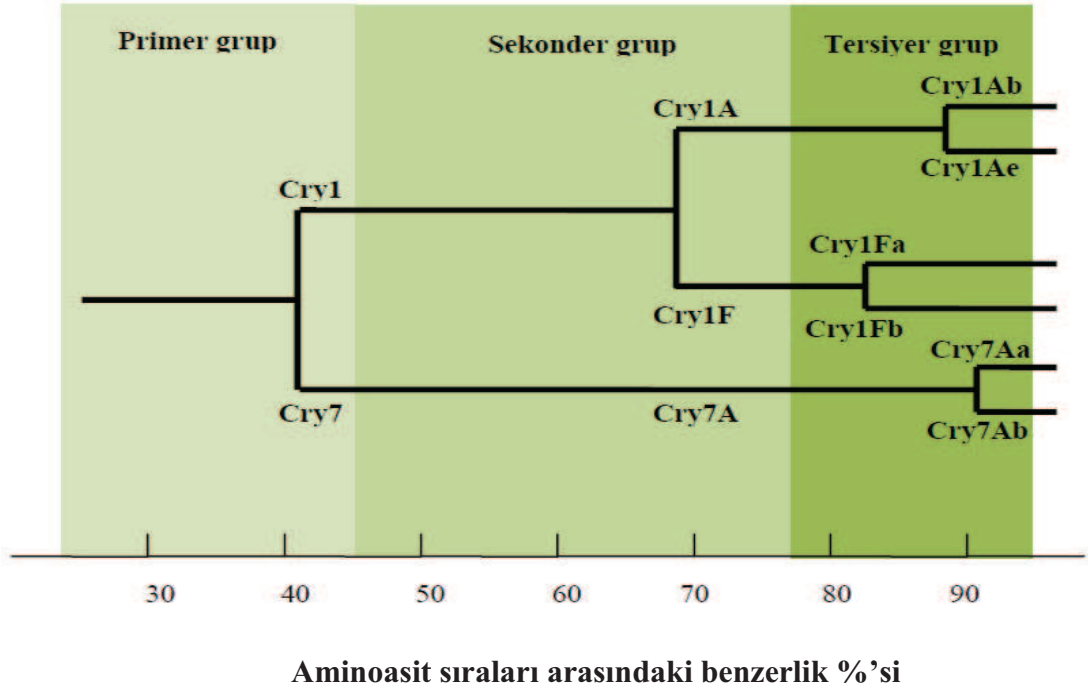
Crickmore ve arkadaşları (1998) Cry proteinlerinin bulunuş sırasını belirtmek için geliştirdikleri yeni isimlendirme sisteminde ilk sıradaki Romen rakamlarını Arabik rakamlarla değiştirmişlerdir (Örneğin CryIAa yerine Cry1Aa, *cryIAa* yerine *cry1Aa* gibi). Cry proteinler, *B. thuringiensis*'in ürettiği ve deneysel olarak hedef organizmalarda toksik etki gösteren ya da bilinen bir Cry protein ile dizi benzerliği bulunan parasporal kristal olarak tarif edilmiştir. *B. thuringiensis* var. *israelensis* ve diğer bazı *B. thuringiensis* alttürlerinde bulunan sitolitik genlerin (*cyt*) kodladığı Cyt proteinlerin isimlendirilmesinde herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. Cyt proteinler de yine *B. thuringiensis*'in ürettiği ve hemolitik etki gösteren veya bilinen bir Cyt protein ile bariz dizi benzerliği gösteren parasporal kristal olarak ifade edilmiştir (Crickmore ve ark., 1998). Bu ölçütler göz önünde bulundurularak toksik etki göstermeyen proteinler listeden çıkarılmıştır. Örneğin *B. thuringiensis* var. *thompsoni*'nin ürettiği 40 kDa boyutundaki protein toksik olmadığı için listeden çıkarılmıştır (Brown ve Whiteley, 1992).

***cryIA(a)*- ICP geni** **CryIA(a)- Kristal Protein**



Şekil 1.4. ICP gen ve kristal protein isimlendirilmesi (Yılmaz, 2010)

Yeni sınıflandırma planını anlatan Şekil 1.5, Cry proteinlerinin aminoasit sırasına dayandırılarak filogenetik bir ağacın oluşturulmasıyla gösterilmiştir. Bu filogenetik ağacın dallanma noktaları proteinlerin benzerlik olarak birbirinden uzaklaştığı noktaları temsil eder. %95, %78 ve %45 oranındaki benzerlikler farklı sınıfları tanımlayan sınırları gösterir (Crickmore ve ark., 1998).



Şekil 1.5. *B. thuringiensis*'in Cry proteinlerinin filogenetik ağacının kısmi şematik görünüşü (Mert Tatar, 2008). Farklı arka plan renkleri farklı sınıflandırma kısımlarını belirtir. Cry1 ve Cry7 %45'den daha az benzerlik içerir, Cry1A ve Cry1F arasındaki benzerlik %45 ile %78 arasındadır ve Cry1Ab ve Cry1Ae arasındaki benzerlik %78 ile %95 arasındadır.

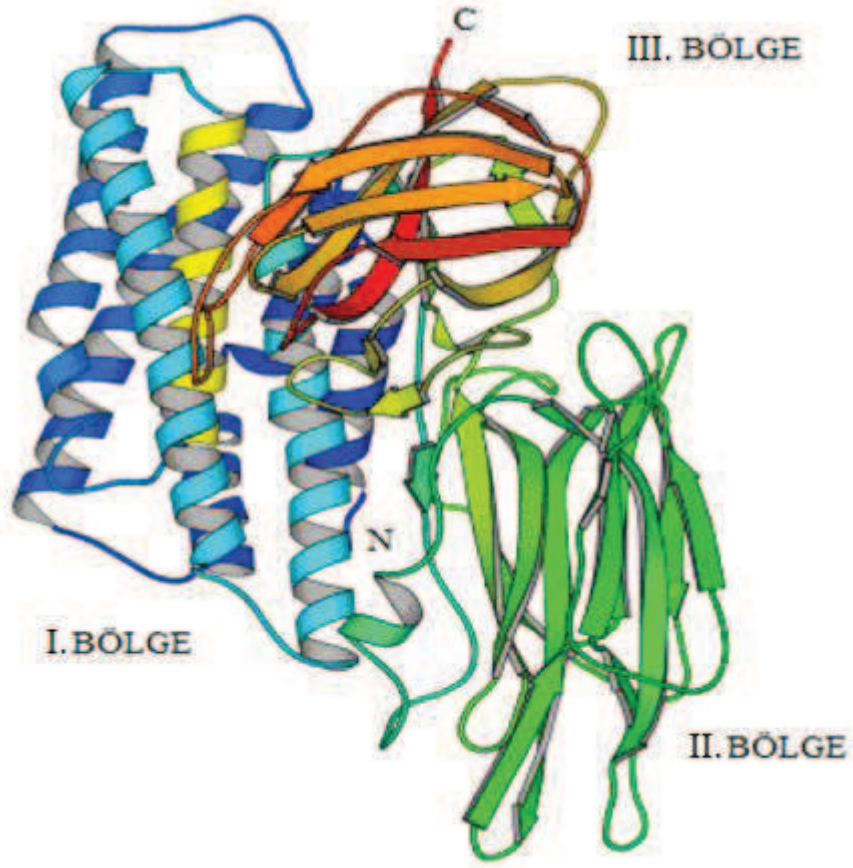
1.1.6. *B. thuringiensis*'in İnsektisidal Kristal Proteinlerinin Yapısı ve Fonksiyonu

Cry proteinlerinin üç boyutlu yapıları belirlenirken X-ışını kristalografisinden yararlanılmaktadır. Dizisi belirlenen Cry3Aa ve Cry1Aa proteinlerinin %36 oranında amino asit benzerliği gösterdiği ortaya koyulmuştur (Crickmore ve ark., 1998). Fakat Cyt2A'nın Cry1Aa ve Cry3Aa ile %20 den daha az oranda amino asit benzerliği gösterdiği belirtilmiştir (Sankaranarayanan ve ark., 1996). Cry1Aa, Cry3A ve Cyt2A toksinlerinin üç boyutlu yapıları Şekil 1.6' de gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Cry1Aa, Cry3A ve Cyt2A toksinlerinin üç boyutlu yapıları (Schnepf ve ark., 1998)

Cry toksinlerinde üç önemli bölge (domain) bulunmaktadır. Bu üç bölgeden ilki olan N-terminal domaini (I. bölge), merkezinde hidrofobik heliks- $\alpha 5$ ve etrafı 6 amfipatik heliks tarafından sarılmış olan 7 α -helikslik bir demet şeklinde yapıya sahiptir. I. bölge bağırsak zarına tutunma ve iyonların serbestçe geçmesini sağlayan porlar oluşturmadan sorumludur (Vachon ve ark., 2004). II. bölge, üç katlı simetrik üç β -levhadan (sheet) oluşmuştur. Bu konformasyona 'Greek Key' denmektedir. C-terminalde bulunan III. bölge, bir 'jelly-roll' içerisindeki β -sandviç yapısı iki adet antiparalel β -levhadan oluşmuştur (Şekil 1.7). II. bölge böceğin bağırsak epitel hücrelerinin reseptörlerine tutunmaktan sorumludur (Bravo ve ark., 2005). III. bölgenin, bakterinin özgün kristal protein oluşturmasında rol oynadığı düşünülmektedir (De Maagd ve ark., 2001).



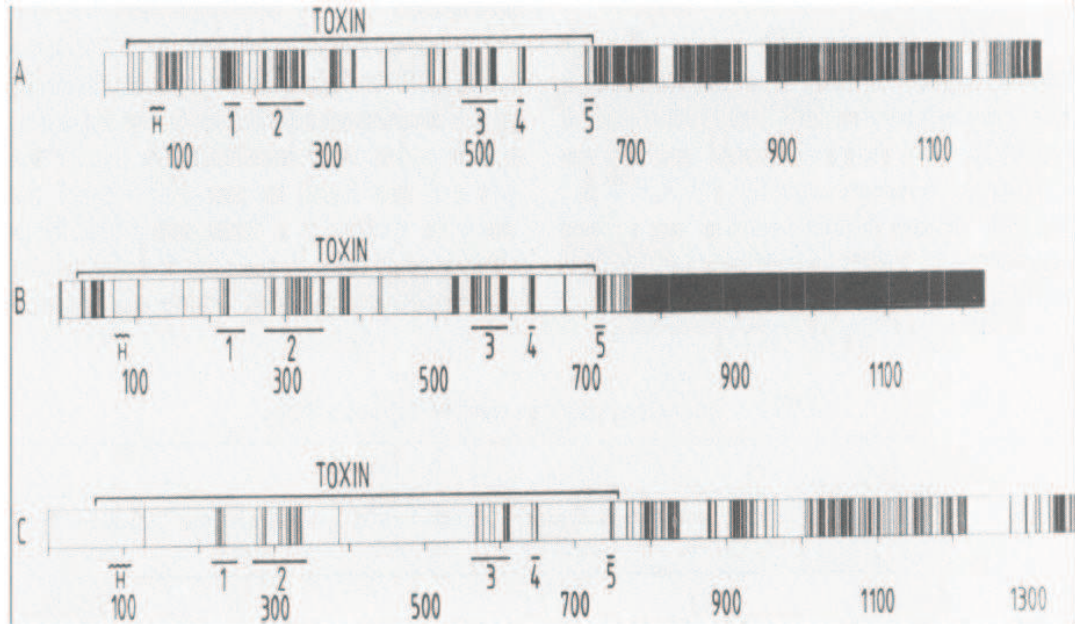
Şekil 1.7. İnsektisidal kristal proteinlerin üç boyutlu kristal yapısı (Eryüzlü, 2010)

Cry1, Cry2, Cry3 toksinlerine karşın, Cyt2A (Şekil 1.6) toksin yapısı oldukça farklıdır (Crickmore ve ark., 1998). Tek bir domain barındırır ve bu domain karışık bir β -levha dış çevresine sarılı bir α -heliksdan oluşmaktadır.

Cry proteinlerin amino asit dizilerinin karşılaştırılması sonucunda 5 tane yüksek derecede korunan blok olduğu görülmüştür (Şekil 1.8). 1. blok, I. bölgenin $\alpha 5$ 'ine karşılık gelmekte, 2. blok ise I. bölgenin $\alpha 7$ ve II. bölgenin birinci β -zincirinden oluşmaktadır. Toksinin orta kısmında herhangi korunmuş bir bölge bulunmayıp yüksek derecede değişken diziler içermektedir. 3. blok, II. bölgenin son β -zincirini içermektedir. Korunmuş dalgalı arjinin dizisi olan 4. blok III. bölgede bulunmaktadır. 5. blok III. bölgenin sonunda yer almaktadır (Sankaranarayanan, 1996; Shimizu ve Morikawa, 1996).

Cry1, Cry3, Cry4, Cry7-Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 ve Cry20'nin içinde bulunduğu grup 5 temel (kor) bloğun hepsini içerir. Cry5, Cry12-Cry14 ve Cry21'inde içinde bulunduğu diğer bir grup Blok1, 2, 4 ve 5'in bilinen homologlarını

içerir. Cry2, Cry11 ve Cry18'in içinde bulunduğu üçüncü bir grup ise blok 2'nin bir bölümü ile blok 1'i içerir, fakat diğer korunmuş bölgelerin bazı homologlarını bulundurmaz. Cyt1, Cyt2, Cry6, Cry15 ve Cry22 proteinleri diğer üç gruptakine benzer korunmuş homolog bölgeler içermez (Lereclus ve ark., 1989). Bu blokların yüksek seviyede korunmuş olması nedeni ile Cry toksinlerinin benzer yapıya sahip olabileceği ileri sürülmüştür. Sonuç olarak, bilinen üç boyutlu yapılarda amino asit dizilerinin kıyaslanması diğer Cry toksinlerinin sekonder yapısı hakkında bilgi verebilir (Li ve ark., 1991). Cry proteinlerinin üç boyutlu yapısı protein veri bankasında (PDB) bulunabilir. PDB üç boyutlu makro moleküllerin yapısal ve işlevsel yönü bakımından dünya çapında bilinen bir veri bankasıdır (URL-4).



Şekil 1.8. *B. thuringiensis* kristal proteinlerinin amino asit dizi karşılaştırması. Dikey çizgiler tüm Lepidoptera kristal proteinleri için korunmuş amino asit dizilerini temsil etmektedir. A) CryI, B) CryIV, C) CryI, CryIII ve CryIV kristal proteinlerinin korunmuş amino asit dizilerini temsil etmektedir. Korunmuş blokların pozisyonu alt çizgilerle belirtilmiştir. H: hidrofobik transmembran dizileri, CryII ve CryIVD dışındaki tüm kristal proteinlerde bulunur. Sayılar sıralama sonrası dizideki (amino asit artı boşluklar) pozisyonları belirtmektedir (Höfte ve Whiteley, 1989).

1.1.7. İnektisidal Kristal Proteinlerinin Etki Spektrumu

ICP'ler, hedef böcek larvalarına karşı pmol düzeyindeki yoğunluklarda bile oldukça etkilidirler. *B. thuringiensis* toksinlerine karşı en duyarlı takımlar Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera takımlarıdır. *B. thuringiensis* toksinleri, Hymenoptera, Homoptera, Mallophaga, Acari, Nematelminthes, Platyhelminthes ve Sarcomastigophora gibi ordolara karşı da etkilidir (Feitelson, 1993).

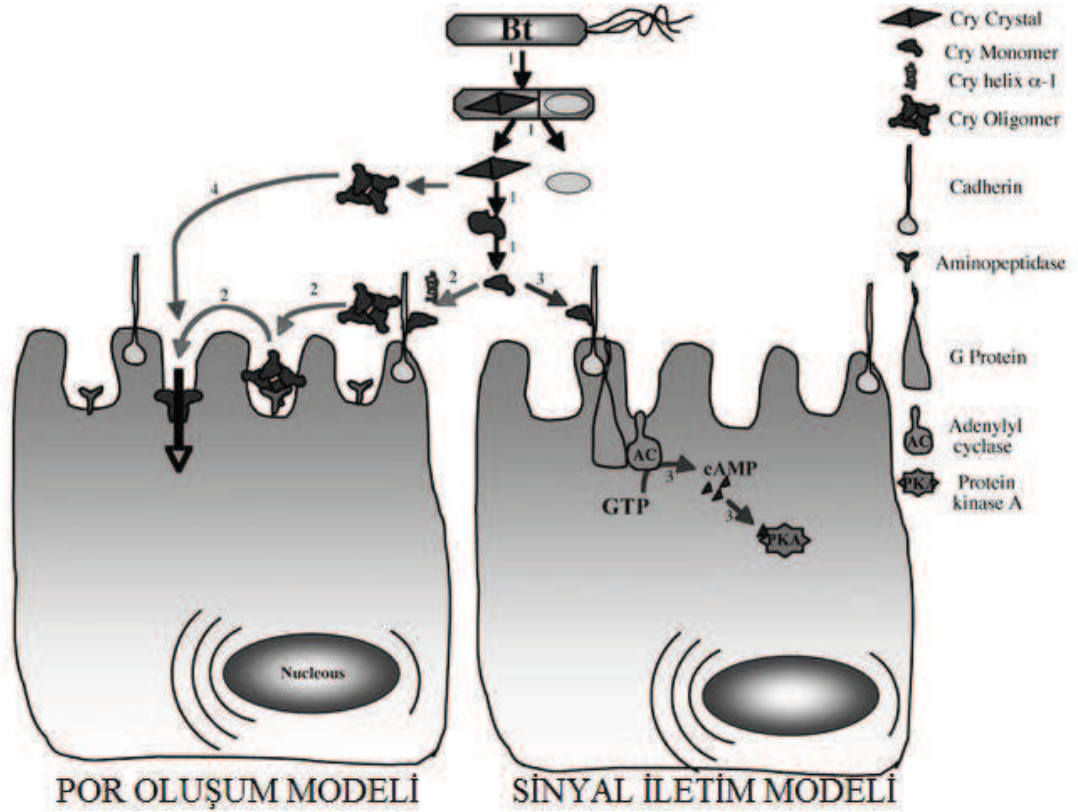
Lepidoptera takımından zararlılar için Cry1, Cry2 ve Cry9 toksin proteinleri, Coleoptera takımındaki zararlı böcekler için Cry3, Cry7 ve Cry8 proteinleri ve ayrıca Cry1B ve Cry1I toksinlerinin çift etkisi öldürücüdür. Cry5, Cry12, Cry13 ve Cry14 δ -endotoksinleri nematodlar, Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 ve Cyt kristal proteinleri ise Diptera takımındaki zararlı böceklere karşı etkilidir (Aly, 2007).

Cry toksinlerinin *B. thuringiensis* sporları ile birlikte uygulanması bazı böcek türleri üzerinde sinerjistik öldürücü etki gösterebilir. Yapılan bir çalışmada *Plutella xylostella* için endotoksine sporların eklenmesiyle toksisitenin 146 kat arttığı gösterilmiştir (Miyasono ve ark., 1994). Bu toksinler normal bir sindirim sisteminde çözünmezler. Bu nedenle insanlara, diğer memelilere ve birçok böcek türüne karşı toksik etki göstermez. ICP'ler yüksek pH (>9.5) değerlerinde kolayca çözünür. Bu nedenle *B. thuringiensis* oldukça spesifik bir entomopatojenik ajandır. Duyarlı böceklerin orta bağırsağındaki yüksek pH ortamı ve taşıdıkları enzimler protoksini aktif toksine dönüştürür. Konukçu duyarlılığı ve toksisite ICP'nin farklı bölgelerince (domain) belirlenir. Bu toksinler güneş ışınlarına duyarlıdır ve etkileri kısa sürede kaybolur. *B. thuringiensis* endosporları UV ışığına maruz kaldığında inaktif hale geçer. ICP'lerin doğal ortamdaki yarı ömrü yaklaşık 10 gündür. Vejetatif hücreler ve sporlar doğal ortamda yıllarca kalabilir (Bajwa ve Kogan, 2001).

1.1.8. Cry Toksinlerinin Etki Mekanizması

Cry toksinlerinin etki mekanizması por oluşum modeli veya sinyal iletim modeli ile açıklanabilir. Şekil 1.9’de gösterildiği gibi her iki modelinde başlangıç basamakları aynıdır.

İlk basamakta protoksin larvanın orta bağırsağında znr, sonra orta bağırsak proteazları tarafından aktifleştirilir. Etkin toksin cadherin reseptörüne tutunur.



Şekil 1.9. Por oluşum modeli ve sinyal iletim modeli (URL-5)

İkinci basamakta modeller arasında farklılıklar vardır. Por oluşum modelinde cadherin reseptörü ile monomerik Cry1A toksininin etkileşimiyle ekstra proteolitik bölünme gerçekleşir. I. bölgenin heliks α 1 kısmı çıkarılıp, toksin oligomerizasyonu indüklenir. Oligomerik yapıya ikincil reseptörlerden aminopeptidaz veya alkalın fosfataz bağlanır ve por oluşur.

Sinyal iletim modelinde ise G proteini cadherin reseptörüne bağlanır. G proteininin de adenil siklaza bağlanmasıyla cAMP’nin miktarı artar. cAMP de

protein kinaz A'yı uyarır. Sinyal iletim modelinde toksine cadherin dışında başka reseptör bağlanmaz. Bu modelde oligomerizasyon oluşmaz, toksin monomeri cadherin reseptörüne spesifik olarak bağlanarak sinyal iletimini tetikler ve nekrotik hücre ölümüne neden olur.

Son basamakta por oluşumu ile hücrelerin iyon geçirgenliği artar. Böceğin orta bağırsak hücrelerinin entegrasyonu kaybolur, mikrovillusların yapısı bozulur, zehirlenme sendromu ortaya çıkar ve hücreler parçalanır (De Maagd ve ark., 2003; Bravo ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2006). Larva beslenemez hale gelir ve sonuçta ölür. Daha düşük dozlarda ya da daha az duyarlı böceklerde, bağırsak hücrelerinin zarar görmesi normal bağırsak salgısının durmasında etkilidir ve bu olay da sporların gelişmesine izin verir. Vejetatif hücreler daha sonra içeri girerek septisemiye neden olur ve ölüm gerçekleşir (Mark ve Byron, 2003).

1.1.8.1. Protoksin Aktivasyonu

B. thuringiensis toksinleri doğal ortamında inaktif protoksin halinde bulunur. Toksinler böcek larvaları tarafından alındıktan sonra orta bağırsaktaki yüksek alkali ortamda çözünür (Aronson ve ark., 1991). Lepidoptera ve Diptera takımlarına karşı etkili olan protoksinler böceğin orta bağırsağındaki yüksek alkali ortamında çözünür (De Maagd ve ark., 2003), fakat Coleoptera takımına karşı etkili olan protoksinler nötre yakın pH ortamında çözünür. Carroll ve arkadaşları (1997) in vitro da Cry3A proteinini nötr pH ortamında kemotripsin enzimiyle muamele ettiklerinde hedef böcek üzerinde insektisidal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Cry toksinlerin çözünürlüğünde görülen herhangi bir azalmanın, böcek direnci ile ilgili bir mekanizma olabileceği belirtilmiştir (Mc Gaughey ve Whalon, 1992).

1.1.8.2. Toksin Aktivasyonu

Birçok protoksin böceğin orta bağırsağındaki proteazlar tarafından aktif toksin haline getirilir (Schnepf ve ark., 1998). Kristal proteinler bir veya daha fazla protoksinde oluşur. Örneğin *B. thuringiensis* var. *israelensis* kristalleri en az 4 ana protoksin içerir (134 kDa Cry4A, 128 kDa Cry4B, 72 kDa Cry11A, 28 kDa Cyt1Aa) (Höfte ve Whiteley, 1989). Bu protoksinler tripsin ve kemotripsin benzeri bağırsak proteazları tarafından sindirilerek aktif toksin haline getirilir (Delecluse ve ark., 1991). Aktifleşen Cry toksinleri reseptöre bağlanarak iyon kanalları oluşturur (Hofmann ve Lu, 1986; Hofmann ve ark., 1988). Cry1A, Cry4A, Cry4B gibi daha büyük (130 kDa) Cry toksinlerinin aktifleştirilmesi, C-uç yarısı ve N-ucundan 7-30 amino asit rezidüsünün çıkarılıp 60-70 kDa N-ucu yarım kısmının aktif molekül haline gelmesiyle gerçekleşir (Aronson ve ark., 1991; Aronson ve ark., 1995). Cry2A, Cry3A, Cry11A gibi daha küçük Cry toksinlerinin (70 kDa) aktifleştirilmesinde N-ucu ve C-ucu kısımlarında çok az proteoliz gerçekleşir (Dai ve Gill, 1993).

Toksin proteolizi toksinin hedef özgülüğünü etkileyebilir. Lightwood ve arkadaşları (2000) Cry1Ac'nin farklı böceklerdeki bağırsak proteazlarına karşı aynı bölünme modeli sergilemediğini göstermişlerdir. Örneğin Cry1Ac'nin proteolitik aktivasyon sırasında N- terminal ucundan kesilmeyen farklı bir formunun in vitro da *Mamestra brassicae*'nin orta bağırsağında por oluşturmadığını göstermişken, *Pieris brassicae* da bu toksinin aktif olduğu tespit edilmiştir.

Proteolitik aktivasyon Cry toksininin etkisini sınırlayabilir. Örneğin *Plodia interpunctella* böceğinde bağırsak proteazlarının bulunmaması bu türün *B. thuringiensis* HD198 suşuna karşı dirençli olmasını sağlar (Oppert ve ark., 1997). Buna karşın serin proteaz inhibitörleri ise Cry toksin aktivitesini 20 kat artırabilmektedir (MacIntosh ve ark., 1990).

1.1.8.3. Reseptör Bağlanması

Aktif toksin larvanın orta bağırsağındaki fırça kenarlı zar veziküllerinin (BBMV) spesifik reseptörlerine bağlanır. Mutageniz çalışmaları II. bölgenin spesifik reseptör bağlamada görev aldığı belirtilmiştir (Schnepf ve ark., 1998). Buna rağmen Cry toksinlerinin iyon kanalları veya por oluşturma mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Cry1Aa, Cry1Ac ve Cry3A toksinleri ile yapılan yönlendirilmiş (site-directed) mutageniz çalışmaları toksinlerin uç kısmında bulunan halkalı yapıların reseptör bağlamada görev aldığı belirtilmiştir (Rajamohan ve ark., 1996a; Rajamohan ve ark., 1996b; Abdul-Rauf ve Ellar, 1999; Wu ve Dean, 1996)

Cry1Aa ve Cry1Ac arasında yapılan rekombinasyon çalışmaları II. bölgedeki 429-447 arası amino asit rezidülerinin *Manduca sexta*'ya karşı gösterilen toksisitede önemli olduğu, fakat *Heliothis virescens*'e karşı etkili olmadığı belirtilmiştir. Yine Cry1Ac'nin 335-450 arası amino asit rezidülerinin *Trichoplusia ni*'ye karşı toksisitede önemli olduğu belirtilmiştir. *H. virescens*'te yapılan toksisite denemelerinde ise 335-655 arası amino asit rezidülerinin toksisitede gerekmediği belirtilmiştir (Ge ve ark., 1991; Ge, 1989; Lee ve ark., 1992).

Cry2A'nın Lepidoptera ve Diptera larvalarına karşı etkili olduğu, fakat Cry2B'nin sivrisinek larvalarına karşı etkisiz olduğu belirtilmiştir. Cry2A'nın II. bölgesindeki 307-380 arası amino asit rezidüleri Cry2B'ye aktarıldığında sivrisinek larvalarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Winder ve Whiteley, 1990).

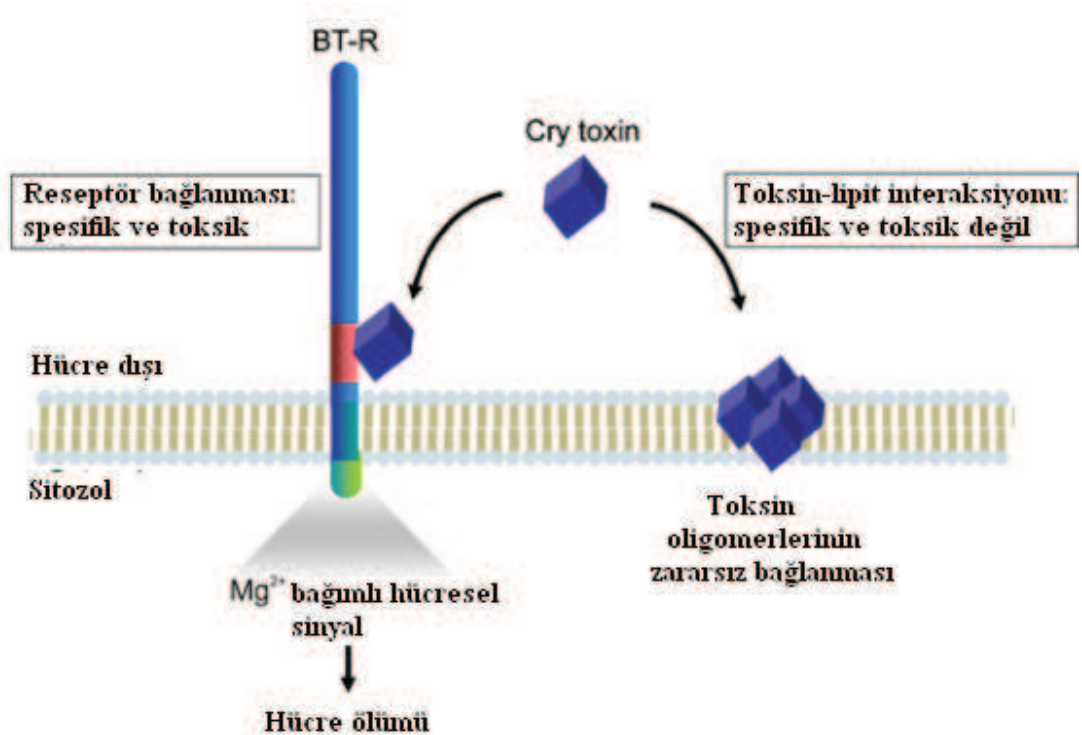
Cry toksinlerinin III. bölgesinin reseptör bağlama ve toksin özgüllüğünü belirleme görevi olduğu belirtilmiştir. Örneğin Cry1Ac'nin III. bölgesinin *H. virescens* özgüllüğünde önemli olduğu saptanmıştır (Ge ve ark., 1991; Ge, 1989). Aronson ve arkadaşları (1995) Cry1Ac'nin III. bölgesinde yaptıkları mutasyon sonucunda toksinin *M. sexta*'daki toksisitesinin azaldığını göstermişlerdir.

Orta bağırsak epiteli üzerindeki reseptörlerin özgüllüğü insektisidal aktiviteyi belirlemede önemlidir. İmmunokimyasal problemler kullanılarak yapılan çalışmalar hem Cry hem de Cyt toksinlerin orta bağırsak epitel hücrelerinin fırçalı kenarlarına bağlandığını göstermektedir (Eschriche ve ark., 1995). Lepidoptera takımında, aminopeptidaz-N (APN), alkalın fosfataz (ALP), 270 glukokonjugat, P252 ve cadherin Cry1 proteininin reseptörüdür (Pigott ve Ellar, 2007). Cry toksinlerinin

aksine Cyt toksinleri reseptörlere bağlanmaz ve doğrudan zar lipidleri ile etkileşime girerek zardan içeri girer ve por oluşturur (Promdonkoy ve Ellar, 2005) veya deterjan benzeri maddeler gibi etkileşim yaparak zar yapısını bozar (Butko, 2003).

Zhang ve arkadaşları (2005) toksin ve reseptör arasında iki tür bağlanma olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bunlardan birisi nonspesifik interaksiyondur ve burada Cry toksinleri oligomer oluşturarak zara girerler. Bu oligomer kompleksi lipide bağımlıdır ve zarda por oluşturmaz. Bu nedenle toksik etki göstermez. İkinci bağlanma şeklinde ise toksin monomeri Cadherin reseptörüne (BT-R) spesifik olarak bağlanarak Mg^{+2} bağımlı sinyal iletimini tetikler ve nekrotik hücre ölümüne neden olur (Şekil 1.10).

Orta bağırsak epitel hücrelerindeki farklı tip reseptörler, Cry toksinlerine karşı farklı bağlanma etkisi gösterir. Örneğin *Lymantria dispar*'dan saflaştırılan 120 kDa'luk aminopeptidaz-N'in Cry1Ac ile oldukça iyi bağlanma gösterdiği oysa Coleopterlere özgü toksin olan Cry3Aa'ya karşı ya hiç bağlanma göstermediği ya da çok az bağlandığı belirtilmiştir (Gurtler ve Stanisich, 1996).



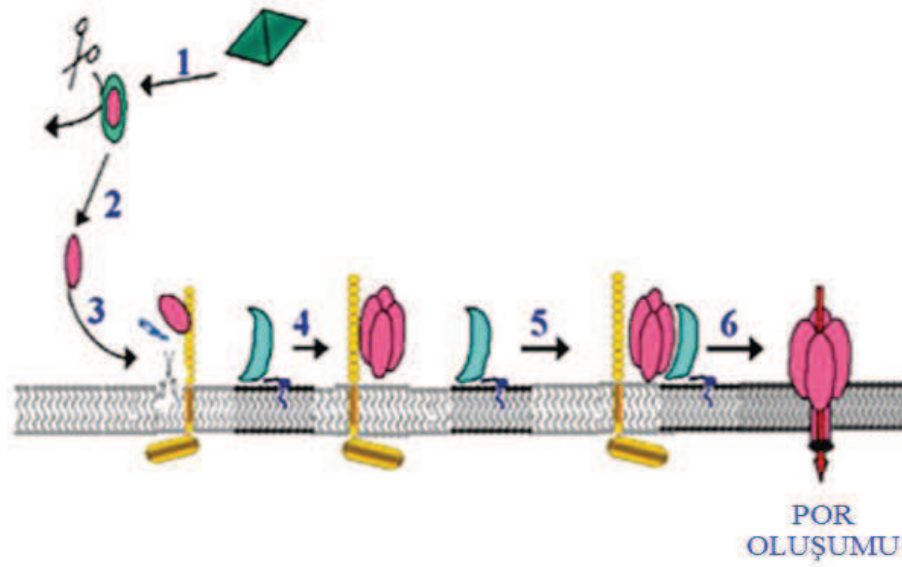
Şekil 1.10. Spesifik ve nonspesifik toksin-reseptör bağlanma modeli (Zhang ve ark., 2005)

1.1.8.4. Zarda Por Oluşumu

Toksinler spesifik reseptörlere bağlandıktan sonra orta bağırsaktaki epitel hücrelerinin zarında delik açar (Wolfersberger ve ark., 1986; Van Rie ve ark., 1989). Çeşitli Cry toksinlerinin I. bölgesi zara tutunarak por oluşturmaktadır. Birçok araştırma I. bölgede gerçekleşen mutasyonların Cry toksinlerinin bağlanma özelliklerini etkilemeksizin toksisitesini azalttığını veya ortadan kaldırdığını göstermiştir. (Uawithya ve ark., 1998). III. bölgenin de iyon kanalı düzenlemesinde görev aldığı gösterilmiştir (Schwartz ve ark., 1997).

δ -endotoksin ailesi içerisinde en iyi korunmuş bölge olan $\alpha 5$ 'in litik porun yapı birimi olduğu ileri sürülmüştür (Li ve ark., 1996). Cry1Ab'nin $\alpha 7$ 'deki mutasyon analizi, bu heliksin zara tutunma, yapısal stabilite ve iyon kanalı aktivitesinde önemli rol oynayabileceğini göstermiştir (Alcantara ve ark., 2001). Yine Cry1Aa'nın $\alpha 3$ 'deki amino asit birimlerinde yapılan yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları, $\alpha 3$ 'ün por oluşum mekanizmasında önemli olduğunu göstermiştir (Vachon ve ark., 2002).

Cry toksinlerinin oluşturduğu porlarda, çeşitli tek değerli katyonların, anyonların ve nötral eriyiklerin difüzyona uğradığı gösterilmiştir. Kirouac ve arkadaşları (2002) Cry1Aa ve Cry1Ac'nin oluşturduğu porların katyon-seçici özellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca iyon seçiciliği ile birlikte zar geçirgenliğini de inceleyerek aspartat ve glutamat dışındaki tüm amino asitlerin porlardan kolayca geçtiğini göstermişlerdir. Amino asit geçirgenliğinin düşük pH'ta daha az olduğu gösterilmiştir (Kirouac ve ark., 2002).



Şekil 1.11. Cry 1A'nın aktivasyonu. 1. Kristal toksin çözünmesi, 2. Bağırsak proteazları tarafından ilk bölünme, 3. Toksin monomerin reseptöre bağlanması ve membran bağımlı proteaz tarafından ikinci bölünme, 4. Zara girme-oligomer oluşumu, 5. Oligomer toksinin reseptöre bağlanması, 6. Litik por oluşumu. (Bravo ve ark., 2004)

1.1.9. *B. thuringiensis* Tarafından Üretilen Diğer Bileşikler

B. thuringiensis suşlarının farklı toksinler ürettikleri bilinmektedir. *B. thuringiensis* suşları Cry ve Cyt proteinlerinin dışında vejetatif büyüme süresince α -ekzotoksin, β -ekzotoksin, fosfolipazlar, proteazlar, kitinazlar, enterotoksin, hemolizin, vejetatif insektisidal proteinler (VIP), antimikrobiyal bileşikler ve böcek bağışıklık inhibitörleri oluştururlar (Porcar ve Juarez-Perez, 2003).

Vejetatif insektisidal proteinler (VIP), vejetatif büyüme döneminde üretilir ve aynı zamanda birçok *B. thuringiensis* izolatlarının sporulasyon aşaması sırasında salgılanır. Belirli *B. thuringiensis* suşlarının vejetatif büyüme evrelerinde kültür süpernatantı içerisinde saklı olduğu belirlenmiş vejetatif insektisidal proteinler, ICP'lerle herhangi bir homoloji göstermeyen insektisidal proteinlerdir (Estruch ve ark., 1996). Bu proteinlerden Vip1 ve Vip 2 sırasıyla 100 kDa ve 52 kDa'dan oluşur. Bu proteinler Coleoptera takımı böceklere karşı yüksek toksik etki gösterir (Espinasse ve ark., 2003). Vip3 Lepidoptera takımı böceklerin büyük bir kısmına karşı insektisidal aktivite gösterir. Vip3Aa orta bağırsaktaki hücre membranı

üzerindeki belirli reseptörlere bağlanarak por oluşturur (Lee ve ark., 2003) ve hücrelerin parçalanmasıyla larvanın ölümüne neden olur (Yu ve ark., 1997). VİP'lerin sınıflandırılması, kristalleri oluşturan proteinlerle ilişkileri olmadığından farklıdır (Schnepf ve ark., 1998).

α -ekzotoksin suda çözünür, sıcaklığa karşı dayanıklılığı değişkendir. *B. thuringiensis* ve *B. cereus* tarafından üretilen α -ekzotoksin lepidoptera takımı böceklere ve farelere karşı toksik etki gösterir (Krieg, 1971).

β -ekzotoksinler *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*, *B. thuringiensis* subsp. *galleriae*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ve *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* gibi bazı *B. thuringiensis* alttürleri ile ilgilidir. β -ekzotoksinler adenin, glukoz ve allarik asitten oluşur. Sıcaklığa karşı dayanıklıdır. RNA polimeraz enzimini inhibe ederek RNA'nın sentezlenmesini engeller. Bu nedenle de Lepidoptera, Coleoptera ve Diptera takımındaki çeşitli böceklere karşı toksik etki gösterir (Glare ve O'Callaghan, 2000; Damgaard ve ark., 1996). β -ekzotoksin iki sınıfa ayrılır. Tip I β -ekzotoksin ATP ile yarışarak DNA-bağımlı RNA polimerazı engellediği düşünülen bir adenin nükleotid analogudur. Tip II β -ekzotoksin ise urasil nükleotid analogu olabilir. β -ekzotoksinin memeli hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinden dolayı *B. thuringiensis* tabanlı ticari insektisitler yasaklanmıştır (Siegel, 2001).

B. thuringiensis böceklere karşı patojenik etkiye sahip çeşitli ekzoenzimler üretirler. Örneğin, *B. thuringiensis* tarafından üretilen proteaz ve kitinaz peritrofik zarın yapısını bozarak bağırsak epitelinden rahatlıkla geçebilmektedir (Sampson ve Gooday, 1998).

Omurgalı eritrositlerini parçalayan hemolizinler genel olarak insanlarda sistematik hastalıkların belirlenmesinde önemli bir faktördür. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'den saflaştırılan bir hemolizinin *B. cereus*'da bulunan hemolizin ile aynı olduğu belirlenmiştir (Matsuyama ve ark., 1995).

1.1.10. *B. thuringiensis* Toksinlerine Karşı Böcek Direnci

Bitki zararlısı böcekler üretim faaliyetlerinin hemen her safhasında önemli kayba neden olan canlılar olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsektisitlerin yaygın kullanımı böceklerin adaptasyon göstererek bu insektisitlere direnç kazanmalarına sebep olmuştur. Bu kazanımların genetik kökenli olması sebebiyle direnç sonraki döllere de aktarılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü direnci ‘normal bir popülasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin belirli bir dozuna karşı, aynı türün diğer popülasyonundaki bireylerin tolerans kazanma yeteneğinin gelişmesi’ şeklinde tanımlamaktadır. 500’ den fazla arthropod türünün bir veya daha çok insektisite direnç geliştirdiği belirlenmiştir. Bu durum tarımda önemli ürün kayıplarına yol açarken hastalık etmenlerinin taşıyıcısı olan karasinek, sivrisinek gibi böceklerle mücadelede başarıyı düşürmektedir. İnsektisit direncinde görülen bu mikro-evrim her geçen yıl birim alanda daha fazla kimyasal kullanımına yol açmaktadır. Bu da hedef olmayan türler üzerinde negatif etki ve çevresel kirlenme gibi ciddi ekolojik problemleri ortaya çıkarmaktadır (Kence, 1988).

Hem laboratuvar hem de doğal ortamdan elde edilen birçok böcek türünün *B. thuringiensis* toksinlerine karşı farklı seviyede direnç geliştirdiği tespit edilmiştir. Direnç geliştiren böcek türleri *Plodia interpunctella*, *Cadra cautella*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Chrysomela scripta*, *Spodoptera littoralis*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis* gibi türlerdir. Bunların direnç geliştirdiği suşlar; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ve *B. thuringiensis*’in diğer alttürleridir. Bir çeşit güve olan *Plutella xylostella*’nın *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*’ya karşı direnç geliştirdiği Hawaii, Filipinler, Endonezya, Malezya, Orta Amerika ve bazı Amerika şehirlerinde görülmüştür.

B. thuringiensis δ -endotoksinlerinin larva orta bağırsak hücrelerindeki spesifik reseptörlere bağlanmasıyla oluşan değişikliklerin bir tür direnç mekanizması olduğu belirtilmiştir (Ferre ve Van Rie, 2002). Van Rie ve arkadaşları (1990) hedef böcek reseptörlerinin Cry1Ab proteinlerine bağlanmada 50 kat azalma göstermesiyle direnç geliştirdiklerini belirtmişlerdir. Gould ve arkadaşları (1992) *H. virescens* ile yaptıkları çalışmada popülasyonun Cry1Ac’ye karşı 50 kat, Cry1Ab’ye karşı 13 kat, Cry2Aa’ya karşı ise 53 kat direnç sağladığını göstermişlerdir. Bu durum, toksin-

reseptör etkileşiminde görülen değişikliğin direnç mekanizması olduğunu göstermektedir. Bu özelliğin aynı zamanda bağırsak epitel hücrelerindeki spesifik glikoproteinlerin farklı glikozilasyonu ile de bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Jurat-Fuentes ve ark., 2002).

Refüj stratejileri tarla koşullarında direncin azaltılması için kullanılmıştır. Bu çalışma, Cry toksinlerini yüksek derecede ifade eden *B. thuringiensis* ürünlerin kullanılması ve *B. thuringiensis* ürünlerin, *B. thuringiensis* olmayan ürünlerin yanında ekilmesi stratejisine dayanmaktadır ve içerisinde Amerika'nın da bulunduğu pek çok ülkede kullanılmaktadır. Çalışmalar direnç oluşumunun belirli şartlarda geciktirilebileceğini göstermiştir. *B. thuringiensis* ürünlerdeki çekinik homozigot dirençli böcekler (RR) ile baskın homozigot duyarlı böcekler çiftleştirilir (SS) ve böyle çiftleşmelerden doğacak heterozigot dölleri (RS), yüksek konsantrasyonda Cry toksin üreten *B. thuringiensis* ürünleri tarafından öldürülürler (Tabashnik ve ark., 2008).

1.2. *B. thuringiensis* Suşlarının Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler

B. thuringiensis suşlarının tanımlanmasında ilk olarak kristal proteinlerin tespit edilmesi gerekir. Bunun için en iyi yöntemlerden birisi *B. thuringiensis*'in oluşturduğu kristal proteinleri boyayarak ışık veya faz-kontrast mikroskopunda incelemektir. Kristal yapıların büyüklüğünü tespit etmek için elektron mikroskobu ile de daha ayrıntılı inceleme yapılabilmektedir (Iriarte ve ark., 2000).

B. thuringiensis suşları ve insektisidal kristal proteinlerin (ICP) karakterizasyonunda hücre duvarı yağ asiti analizi, monoklonal antikolar, spor morfolojileri, oligonükleotid DNA problemleri, plazmit profilleri, PCR analizi, DNA parmak izi, SDS-PAGE profilleri, VITEK-2 sistemi ve 16S rRNA analizi gibi yöntemler kullanılmaktadır (Turnbull ve ark., 1990; Koneman ve ark., 2006).

B. thuringiensis izolatlarının sınıflandırmasında kullanılan bir yöntemde H-serotiplendirilmez. Serotip içinde, suşların farklılığı De Barjac ve Bonnefoi (1962) tarafından flagella antijenlerine dayandırılarak geliştirilmiştir. Ancak serotip içindeki izolatların biyokimyasal karakterleri, plazmit profilleri ve insektisidal aktiviteleri her zaman aynı değildir. Aynı zamanda, kendi kendine aglütine olan ve hareket yeteneğine sahip olmayan suşlar bu yöntemle tiplendirilemez. İzolatların

belirlenmeleri amacıyla yapılan bir takım çalışmalarda özgün DNA problemleri kullanılarak ICP'leri kodlayan genin tanımlanması, özel amaçlar için plazmit profil analizi ve insektisidal kristal proteini (ICP) belirlemek için monoklonal antikor kullanılarak yapılan immünolojik testleri kapsamaktadır (Lereclus ve ark., 1982; Lynch ve Baumann, 1985; Frutos ve Juarez Perez, 1997).

B. thuringiensis çok sayıda ve farklı büyüklüklerde plazmitlere sahiptir. Çoğu δ -endotoksin genleri büyük plazmitler üzerinde bulunurken, bazıları da bakteri kromozomu üzerinde yer almaktadır (Kronstad ve ark., 1983). *B. thuringiensis* suşlarının plazmit içerikleri birbirinden farklı olabilmektedir ve bu suşlardaki plazmit sayısının belirlenmesi ve bu plazmitlerin *cry* genlerini taşıyıp taşımadığının tespit edilmesi karakterizasyon için önemlidir (Aptosoglou ve ark., 1997).

Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) metodu *B. thuringiensis*'in analizini kolaylaştıran yöntemlerden biri olmuştur. PCR analizi, spesifik DNA bölgelerini çoğaltmada kullanılır. Bu yöntemle hedef bir genin varlığı ya da yokluğu belirlenebilir. *B. thuringiensis* δ -endotoksinlerin PCR ile tanımlanması karakterizasyon açısından kolaylık sağlar (Schnepf ve ark., 1998). İnsektisidal aktiviteyi tespit etmek için *B. thuringiensis*'in *cry* genlerinin PCR'ye dayalı tanımlanması ilk kez Carozzi ve arkadaşları tarafından (1991) gerçekleştirilmiştir.

B. thuringiensis, *B. cereus* ve *B. anthracis*, genetik olarak aynı grupta bulunmasına rağmen değişik virülans fenotipleri nedeniyle farklı türler olarak sınıflandırılmışlardır (Helgason ve ark., 2000). *B. anthracis*'in *B. cereus* ve *B. thuringiensis*'ten pXO virülans plazmitini alması (Keim ve ark., 1997) ve takip eden genom adaptasyonu ile ortaya çıktığı iddia edilmiştir (Mignot ve ark., 2001). Organizmalar arasındaki genetik ilişki ve filogeninin belirlenmesinde özellikle 16S ve 23S rRNA genleri kullanılmaktadır (Ash ve Collins, 1992; Ash ve ark., 1991). Fakat bu yöntemde de *B. thuringiensis*, *B. cereus*, ve *B. anthracis* türlerinin üçünde de korunmuş bölge oldukça fazla olduğu için tür seviyesinde ayırmak zordur (Bavykin ve ark., 2004). Ribozomal genler göz önünde bulundurulduğunda 16S ve 23S rRNA genleri arasındaki genler arası ifade edilen bölgelerin (ITS) oldukça değişken olduğu ve türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Gurtler, 1999; Gurtler ve Stanisich, 1996).

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleriyle muamele edilerek incelenmesine dayanan RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) yöntemi *cry* toksin genlerinin yeni varyantlarını belirlemek için kullanılmaktadır (Kuo ve Chak, 1996). Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde restriksiyon endonükleaz enzimi sentezler. Esas görevleri dışarıdan bakteriye giren ve bazı özel gen veya markerları taşıyan genetik materyalleri parçalayarak mutasyonlara mani olmak ve türlerin genetik yönden stabilitesini korumaktır. Bu, gerçekte bir çeşit savunmadır. Bakteriye özgü bu enzimler çift sarmallı DNA üzerinde özgün bir bölgeyi tanırlar ve çift sarmallı DNA'nın her iki zincirindeki fosfodiester bağını keserek DNA'yı iki parçaya ayırır. Bu enzimlerin birçoğunun tanıdığı bölge tekrarlayan diziler şeklindedir. Yeni oluşan parçalar palindromiktir (Akar, 1998).

B. thuringiensis izolatlarının oluşturduğu kristallerden protoksinler ve aktif toksinlerde karakterizasyonda kullanılmaktadır. Tek yönlü poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) proteinlerin ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir (Bravo ve ark., 1998).

1.3. Tezin Amacı

B. thuringiensis ekonomik değeri olan, yıllardır biyoinsektisit olarak başarılı bir şekilde ve en yaygın kullanılan çevre dostu mikrobiyal patojendir. Bugüne kadar belirlenmiş çok sayıda *B. thuringiensis* izolatu mevcuttur. Bu bakımdan laboratuvar ortamında farklı zararlılara karşı yeni ve etkili izolatların belirlenmesi ve insektisidal etkisi daha yüksek biyopestisitlerin elde edilmesinin faydalı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca *B. thuringiensis* toksinlerine karşı zararlılar direnç geliştirmektedir ve yeni izolatların bulunması böcek direncinin azaltılması bakımından da önemlidir. Bu amaçla çalışmada topraktan izole edilen *B. thuringiensis* izolatlarının karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Bu sayede tarımda zararlı böceklere karşı kullanılacak insektisidal aktivitesi yüksek mikrobiyal kontrol ajanları bulmak hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

TÜBİTAK projesi kapsamında Giresun Adası'ndan toplanan toprak örneklerinde yapılan ön çalışmalar sonucu elde edilen dört *Bacillus thuringiensis* izolatu bu çalışmada kullanılmıştır.

2.1. Örneklerin Alınması

Toprak yüzeyinin yaklaşık 5 cm aşağısından steril spatül ile yaklaşık 10 gr toprak örneği alınmış ve kilitli poşetlere koyulmuştur. Alınan örneklerden izolasyon yapılana kadar tüm örnekler +4 °C'de saklanmıştır.

2.2. Topraktan *B. thuringiensis* İzolasyonu

Steril falcon tüpünde 1 gr toprak örneği 9 ml steril saf su ile 5 dk vortekslenmiş ve bakterilerin suya karışması sağlanmıştır. 5 dk toprağın dibe çökmesi için beklenerek üstteki sıvı kısım steril tüpe aktarılmıştır. Tüpler 65 °C'ye ayarlanmış sallayıcı su banyosunda 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda örneklerden 1 ml alınmış ve 9 ml saf steril su ile 10 kat seyreltme yapılmıştır. Her seyreltikten 100 µl alınarak NA besiyerine yayma ekim yapılmıştır. Yayma ekimler 30 °C'ye ayarlı etüvde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından NA besiyerinde büyüyen *B. thuringiensis*'e benzeyen koloniler dikkatlice seçilerek NA besiyerine çizgi ekim yapılmış ve saf kültürler elde edilmiştir.

2.3. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.3.1. Gram Boyama

Gram boyama için 24 saatlik kültürlerden smear hazırlanmıştır. Hazırlanan smear, 1 dakika kristal viole ile muamele edilerek saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra 1 dakika Gram iyodu ile muamele edilerek tekrar saf su ile yıkanmıştır. Aseton-alkolle mor renk gidinceye kadar yıkandıktan sonra, renk kaybını durdurmak için hemen saf su ile yıkanmıştır. 30-60 saniye safraninle muamele edilmiş ve tekrar saf su ile yıkanmıştır. Açık havada kurutulduktan sonra ışık mikroskobu altında incelemeye alınmıştır. Mor renkle boyanan Gram pozitif çubuk şekilli bakteriler seçilmiştir.

2.3.2. Spor-Kristal Boyama

İzolatlar nutrient agar besiyerlerinde beş gün büyütülmüş ve smearları hazırlanmıştır. Smearlar, etanol/aseton (%50/50) karışımından geçirilmiştir. Daha sonra Coomassie Brilliant Blue (%50 etanol ve %7 asetik asit çözelti içinde %25 oranında CBB) boyası ile boyama yapılmıştır (Sharif ve Alaeddinoğlu, 1988). Boyama neticesinde preparatlar ışık mikroskobu altında incelenmiştir ve sporlar boyanmazken kristaller mavi renge boyanmıştır. Kristal benzeri yapılar tespit edilen izolatlar seçilmiştir.

2.4. İzolatların Stoklanması

Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri'ye ekilmiş taze kültürler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere %20'lik steril gliserol içerisinde -20 ve -80 °C'lerde muhafaza edilmiştir.

2.5. Spor ve Kristal Süspansiyonlarının Hazırlanması

İzolatlar nutrient agar besiyerlerinde beş gün büyütülmüştür. Besiyerlerinden toplanan spor-kristal karışımları soğuk 1 M'lık NaCl'de süspansiyon edilmiştir. Daha sonra bu karışım 13.000 xg'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelte steril dH₂O ile iki kez yıkanmıştır. Pelte steril dH₂O'da çözülmüştür. Kullanılincaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca spor-kristal karışımlarından smear hazırlanmış ve ışık mikroskobu görüntüleri fotoğraflanmıştır.

2.6. İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

2.6.1. Çalışmada Kullanılan Standart *B. thuringiensis* Suşları

Çalışmada topraktan izole edilen 4 bakteri izolatu ve kontrol olarak *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Daniel R. Zeigler, Bacillus Genetic Stock Center, Columbus, Ohio), *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (DSMZ 5724) ve *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Plant Genetic System J. Plateaustroat, 22 9000 Gent, Belçika) standart suşları kullanılmıştır.

2.6.2. İzolatların Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA'nın izolasyonu, Sambrook ve arkadaşları (1989) tarafından açıklanan yönteme göre yapılmıştır. Çalışmada kullanılan izolatlar LB sıvı besiyerinde 30 °C'de bir gece inkübe edilerek üretilmiştir. Elde edilen sıvı kültür iki kez oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Süpernatant kısmı dökülerek pelletin üzerine, 500 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8) ilave edilmiş ve pellet çözülmüştür. Daha sonra her bir tüpe 10 µg lizozim ilave edilerek vortekslenmiş ve 37°C'de 1 saat bekletilmiştir. Hücrelerdeki proteinlerin parçalanması için, 50 µl %10'luk SDS eklenerek 37 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda, tüpe 3 M'lık 0,1 hacim 55 µl sodyum asetat (pH 5,2) eklenerek 65 °C'de 30 dakika bekletilmiş ve her 10 dakikada bir alt üst edilerek hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Üzerine 500 µl fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ilave edilmiş, tekrar alt-üst edilerek karıştırılmış ve 4 dakika 13.000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmındaki sıvı alınıp temiz tüpe bırakılmış, alt kısmı ise atılmıştır. Bu tüpe tekrar 500 µl kloroform eklenmiş ve alt-üst edilerek 13.000 rpm'de tekrar 4 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra üst sıvı kısım yeni tüpe alınmıştır. Bu sıvı kısma 0,1 hacim (55 µl) 3 M sodyum asetat ve 2 hacim (1.000 µl) %96'lık etanol ilave edilmiş ve -20 °C'de 45 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst kısımdaki sıvı boşaltılmıştır. Kalan pelletin üzerine 500 µl %70'lik etanol ilave edilerek tekrar 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısımdaki sıvı dökülerek pellet açık havada kurutulmuştur. Elde edilen DNA pelleti, 50-100 µl TE tamponunda çözülmüş, 10 mg/ml'lik EtBr'den (etidyum bromür) 2,5 µl ilaveli %0,7'lik jelde 7 µl'si yürütülerek kontrol edilmiş ve geri kalanı -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.6.3. *B. thuringiensis* İzolatlarının *cry* Gen İçeriklerinin Belirlenmesi

İzolatlarının *cry* gen içeriklerinin tespit edilebilmesi için PCR kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan genel primerler: *cry* 1 (forward, 5'-CAT GAT TCA TGC GGC AGA TAA AC-3'; reverse, 5'-TTG TGA CAC TTC TGC TTC CCA TT-3'), *cry* 2 (forward, 5'-GTT ATT CTT AAT GCA GAT GAA TGG G-3'; reverse, 5'-CGG ATA AAA TAA TCT GGG AAA TAG T-3'), *cry* 3 (forward, 5'-CGT TAT CGC AGA GAG ATG ACA TTA AC-3'; reverse, 5'-CAT CTG TTG TTT CTG

GAG GCA AT-3') ve *cry 4* (forward, 5'-GCA TAT GAT GTA GCG AAA CAA GCC-3'; reverse, 5'-GCG TGA CAT ACC CAT TTC CAG GTC C-3') (Ben-Dov ve ark., 1997). Bu primerlerin oluşturduğu alt sınıfların ürünlerinin büyüklükleri Tablo 2.1'de verilmiştir (Ben-Dov ve ark., 1997).

Tablo 2.1. Genel primerler ile tespit edilen *cry* genleri ve ürün büyüklükleri

Gen Terminolojisi		Ürün Büyüklüğü (bp)
Yeni Adı	Orijinal Adı	
<i>cry1Aa5</i>	<i>cryIA(a)</i>	277
<i>cry1Ab9</i>	<i>cryIA(b)</i>	277
<i>cry1Ac5</i>	<i>cryIA(c)</i>	277
<i>cry1Ad</i>	<i>cryIA(d)</i>	277
<i>cry1Ae</i>	<i>cryIA(e)</i>	277
<i>cry1Ba</i>	<i>cryIB</i>	274
<i>cry1Bb</i>	<i>cryI ETS</i>	274
<i>cry1Ca1</i>	<i>cryIC</i>	277
<i>cry1Cb</i>	<i>cryIC(b)</i>	277
<i>cry1Da</i>	<i>cryID</i>	277
<i>cry1Db</i>	<i>prtB</i>	277
<i>cry1Ea3</i>	<i>cryIE</i>	277
<i>cry1Eb</i>	<i>cryIE(b)</i>	277
<i>cry1Fa2</i>	<i>cryIF</i>	277
<i>cry1Fb</i>	<i>prtD</i>	277
<i>cry1G</i>	<i>prtA</i>	277
<i>cry1H</i>	<i>prtC</i>	277
<i>cry1Hb</i>		277
<i>cry1Ja</i>	<i>cryI ET4</i>	274
<i>cry1K</i>		274
<i>cry2Aa1</i>	<i>cryIIA</i>	701
<i>cry2Ab2</i>	<i>cryIIB</i>	701
<i>cry2Ac</i>	<i>cryIIC</i>	689
<i>cry3A6</i>	<i>cryIIIA</i>	589
<i>cry3Ba1</i>	<i>cryIIIB</i>	595
<i>cry3Bb1</i>	<i>cryIIIBb</i>	595
<i>cry3C</i>	<i>cryIIID</i>	604
<i>cry4A2</i>	<i>cryIVA</i>	439
<i>cry4B4</i>	<i>cryIVB</i>	439

İzolatların *cry* gen içeriklerinin belirlenmesi için yukarıdaki primerler kullanılarak PCR reaksiyonu yapılmıştır. Reaksiyon 50 µl'lik hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR tüpüne, 2,5 U Go Taq DNA polimeraz (Promega), 10 µl 5x PCR tamponu (10mM Tris-HCl, pH 8,3), 3 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 1mM ileri primeri, 1 µl 1mM geri primeri, 1 µl 10 mM dNTP'den ve 2 µl genomik DNA bırakılarak steril dH₂O ile 50 µl'ye tamamlanmıştır. PCR reaksiyon şartları: 94 °C'deki ilk denatürasyon basamağının ardından 30 döngü 94 °C'de 60 saniye, 55 °C'de 50 saniye ve 72 °C'de 90 saniye olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.6.4. İzolatların 16S rRNA Gen Bölgelerinin Araştırılması

2.6.4.1. İzolatların 16S rRNA Primerlerinin Dizaynı ve Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

İzole edilen DNA'ların 16S rRNA gen analizi yapılabilmesi için aşağıdaki primerler tasarlanmıştır.

Forward, 5'–ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA–3';

Reverse, 5'–ATG GTA CCG TGT GAC GGG CGG TGT GTA–3'.

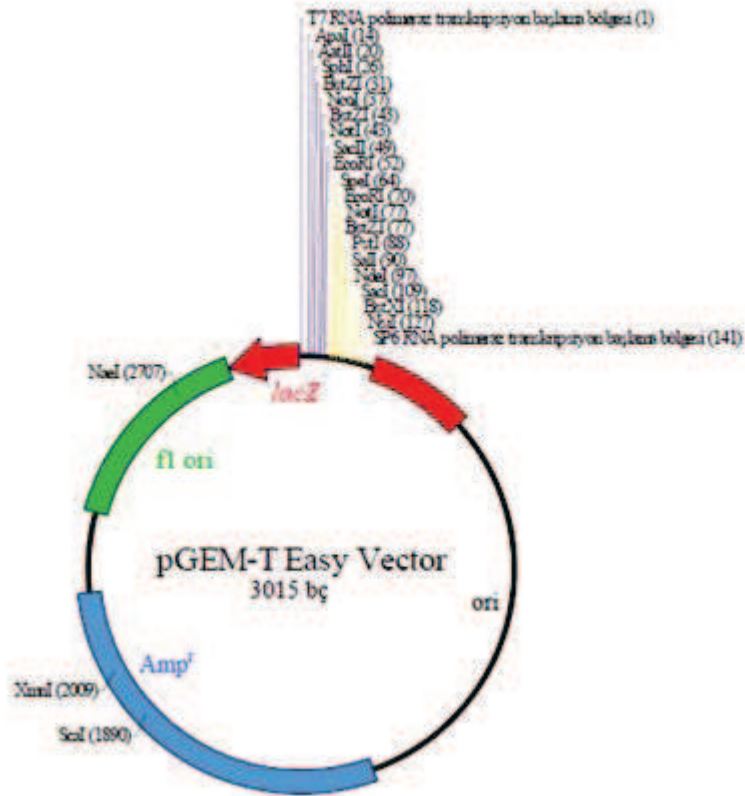
İzolatların 16S rRNA gen analizlerinin yapılabilmesi için yukarıdaki primerler kullanılarak PCR reaksiyonu yapılmıştır. Reaksiyon 50 µl'lik hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR tüpüne, 2,5 U Go Taq DNA polimeraz (Promega), 10 µl 5x PCR tamponu (10mM Tris-HCl, pH 8,3), 3 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 1mM ileri primeri, 1 µl 1mM geri primeri, 1 µl 10 mM dNTP'den ve 2 µl genomik DNA bırakılarak steril dH₂O ile 50 µl'ye tamamlanmıştır.

PCR şartları 95 °C'de 2 dakikalık denatürasyondan sonra 35 döngü 95 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 2 dakika şeklinde gerçekleştirilmiştir (Riffard, 1998). PCR reaksiyonu, 10 mg/ml EtBr ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntülenmiştir.

2.6.4.2. İzolatların 16S rRNA Gen Bölgelerinin pGEM-T Easy Vektöre Klonlanması

İzolatların PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 16S rRNA bölgelerine ait DNA fragmentleri, pGEM-T Easy vektöre (Promega) 3 DNA fragmenti : 1 vektör oranında (0,3 µg DNA fragmenti ve 0,1 µg pGEM-T Easy) klonlanmıştır (Şekil 2.1).

Reaksiyon, 1µl pGEM-T Easy vektörü, 7,5 µl 2x ligasyon tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz, 5,5 µl DNA fragmenti bir araya getirilerek 15 µl'lik hacim içinde ligasyon ürünleri hazırlanmıştır. Karışım 16 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 2.1. pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesini, replikasyon orijinini, *LacZ* genini ve ampisilin direnç genini gösteren harita (URL-6)

2.6.4.3. *Escherichia coli* JM101 Hücrelerinin Hazırlanması

Gece kültürünü hazırladığımız *E. coli* JM101 suşu yoğunluğu OD 600 nm’de 0,1 olacak şekilde 30 ml’lik LB sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. 37 °C’ye ayarlanmış çalkalamalı etüvde büyüme yoğunluğu 0,45–0,55 ulaşan hücreler 4500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım dökülerek pellet soğuk steril 10 ml 100 mM CaCl₂ içerisinde iyice çözülmüştür. 30 dakika buzda bekletildikten sonra 4500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek pellet oluşturulmuştur. Oluşan pellet 2 ml soğuk steril 100 mM CaCl₂ içerisinde iyice çözülerek kompetent hücre hazırlanmıştır.

2.6.4.4. İzolatların 16S rRNA Gen Bölgelerinin *Escherichia coli* JM101’e Transformasyonu

Hazırlanan kompetent *E. coli* JM101 hücrelerinden 200 µl tüplere aktararak içerisine 3 µl ligasyon ürünü bırakılırken, bir tüpe hiçbir şey eklenmeyerek kontrol olarak kullanılmıştır. Tüpler iyice karıştırılmış ve 30 dakika buzda bekletilmiştir. Tüplerdeki karışımlar, 2 dakika 45 °C’de sıcaklık şokuna maruz bırakılarak ligasyon ürünlerinin kompetent hücrelere girmesi sağlanmıştır. Tüpler alınarak üzerlerine 1 ml LB sıvı besiyeri eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra tüm karışım 37 °C’ye ayarlanmış sallayıcı su banyosunda 2 saat boyunca büyümeye bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra büyüyen kültürler 6.000 rpm’de 3 dakika santrifüj yapılmıştır. Tüpte 100 µl kalacak şekilde süpernatant dökülmüş ve kalan süpernatant içinde pellet çözüldükten sonra 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar petrilere (üzerine 100 mg/ml IPTG çözeltisinden 40 µl ve 20 mg/ml X-gal çözeltisinden 40 µl sürülmüş petrilere) yayılmıştır. Gece boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda içerisine plazmid alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçilmiştir.

2.6.4.5. Transfer Edilen Rekombinant Plazmitlerin *Escherichia coli* JM101'den İzole Edilmesi ve Kontrolü

Mavi/beyaz koloni morfolojisine göre ayırım yapılarak seçilen beyaz kolonilerden içerdikleri plazmid DNA'larını izole etmek için 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB sıvı besiyerine ekim yapılmış ve 37 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir.

Hazırlanan sıvı kültürler mikrosantrifüj tüplerine dökülerek 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Sıvı kısım dökülerek pellet 80 µl lysis buffer (50 mM glikoz, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 0.8) solüsyonunda çözülmüş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüplere 200 µl taze hazırlanmış NaOH/SDS (0,2 M NaOH, %1 SDS) solüsyonundan ilave edilmiş ve 5 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra 150 µl 3 M sodyum asetat (pH 5,2) ilave edilmiş ve 10 dakika buzda beklemiştir. Tüpler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve pellet atılmıştır. Üzerlerine oda sıcaklığında muhafaza edilen 1.000 µl %96'lık etanol ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve sıvı kısım atılarak pellete oda sıcaklığında muhafaza edilen %70'lik etanolden 500 µl ilave edilmiştir. Tekrar 2 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Pellet açık havada kurutulurak 50 µl dH₂O' da çözülmüştür.

Beyaz ve mavi koloni örnekleri jel elektroforezi ile yürütülerek kontrol edilmiştir. Kontrol amacıyla beyaz koloni olan örneklerin yanında mavi kolonilerde jel elektroforezinde yürütülerek kütle farkından faydalanılarak beyaz kolonilerin kontrolü yapılmıştır.

2.6.4.6. İzole Edilen Plazmitlerin 16S rRNA Gen Bölgelerinin Dizi Analizi ve İncelenmesi

İzole edilen plazmitlerden 16S rRNA genini taşıyan klonlar amfisilinli LB besiyerine ekimleri yapılmış ve 37 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Kültürler, 13.000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra "Wizard Plus SV Minipreps" (Promega) kiti kullanılarak izole edilmiştir. 16S rRNA bölgelerinin tanımlanması için örnekler yurtdışına gönderilmiştir (Macrogen, Hollanda).

Sekans sonucunda elde edilen 16S rRNA gen bölgelerinin baz dizilimi gerçekleştirildikten sonra gen bankasında bulunan diğer 16S rRNA genleri ile NCBI web adresindeki Blast (basic local alignment search tool) programı kullanılarak karşılaştırması yapılmıştır. Karşılaştırma sonucuna göre sonuçlar değerlendirilmiştir.

2.7. İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin VITEK-2 Sistemiyle Belirlenmesi

İzolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve tanımlanması amacıyla Giresun İl Kontrol Laboratuvarı Mikrobiyoloji Analiz Birimi'nde bulunan VITEK-2 cihazı kullanılmıştır.

İzolatlar nütrient agara ekilerek bir gece 30 °C'de inkübe edilmiştir. Her bir izolattan koloni steril öze ile alınarak 3 ml %45'lik steril NaCl çözeltisi (pH 4.5-7.0) bulunan plastik tüplere aktararak süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon homojenize edilerek DensiChek adı verilen bir bulanıklık ölçerle yoğunluğu 1.80-2.20 McFarland'a ayarlanmıştır. Daha sonra süspansiyon tüpü ile birlikte *Bacillus* identifikasyon kartları kasete yerleştirilmiştir. Kartlar üzerindeki seri numaralar barkod okuma sistemi ile bilgisayara kaydedilmiştir. Kaydedilen kaset VITEK-2 sistemine yüklenmiştir. Sonuçlar 14,25 saat sonra sistemden alınmıştır.

2.8. Bakteriyel İzolatların Yağ Asidi Profillerinin Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS) Kullanılarak Belirlenmesi

İzolatların yağ asidi metil esterlerinin (FAME) izolasyonu yapılmış ve bilgisayar kontrollü gaz kromatografi sistemi olan Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS) kullanılarak izolatların tür seviyesinde tanısı yapılmıştır. İzolatların hücresel yağ asidi analizi Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde yapılmıştır.

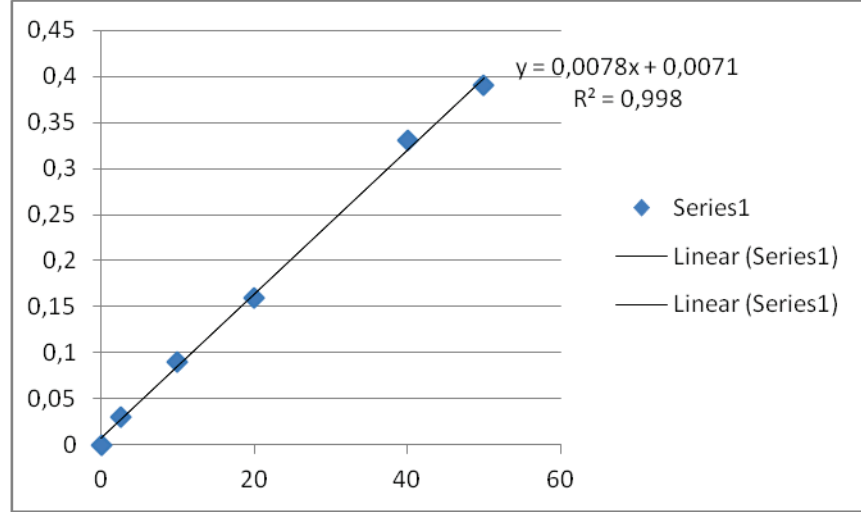
2.9. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez

İzolatların spor-kristal karışımlarının protein miktarı spektrofotometrik olarak 595 nm de Bradford metoduna göre yapılmıştır. Ölçümlerde bovin serum albümin proteini standart olarak kullanılmıştır (Bradford, 1976). Elde edilen sonuçlara göre Şekil 2.2’de verilen grafik çizilmiştir.

B. thuringiensis izolatlarındaki kristal proteinleri tespit etmek için hazırlanan spor-kristal karışımları Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %10’luk sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektrofrezinde (SDS-PAGE) analiz edilmiştir.

Ayırma jeli (%10) çözeltileri 50 ml’lik erlen içerisinde 9.9 ml distile su, 8.3 ml %30 akrilamid karışımı, 6.3 ml tris (1.5 M, pH 8.8), 0.25 ml %10’luk SDS, 0.25 ml %10’luk amonyum persülfat, 0.01 ml TEMED olacak şekilde 25 ml olarak hazırlandıktan sonra cam tablalar arasına enjektör ile dökülmüştür. Düz bir yüzey elde etmek ve oksijenle teması kesmek amacıyla ayırma jeli üzerine tarak dişlerine kadar saf su ilave edilmiştir. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra saf su dökülmüştür.

Yükleme jeli (%5) çözeltileri 50 ml’lik erlen içerisinde 4,1 ml distile su 1.0 ml %30 akrilamid karışımı, 0.75 ml tris (1 M, pH 6.8), 0.06 ml %10’luk SDS, 0.06 ml %10’luk amonyum persülfat ve 0.006 ml TEMED olacak şekilde 6 ml olarak hazırlandıktan sonra, polimerize olan ayırma jeli üzerine dökülmüş ve ardından tarak yerleştirilmiştir. Polimerizasyon işlemi gerçekleştikten sonra tarak yavaşça çıkarılmış ve polimerize olmayan akrilamidin temizlenmesi için kanallar saf su ile iyice yıkanmıştır. Cam tablalar elektrofrez cihazına yerleştirildikten sonra üst ve alt bölmelere tris-glisin elektrofrez tamponu dökülmüştür.



Şekil 2.2. Protein standart grafiği

Protein standart grafiğine (Şekil 2.2) göre miktarları belirlenen numunelerden uygun miktarlarda (10µg) alınmıştır. Bu numunelere muamele tamponu (60 mM Tris-HCl (pH 6,8), %25 gliserol, %2 SDS, %5 2-merkaptoetanol, %0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra numuneler kaynayan su içerisinde 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra her bir örnekten 100 µl alınarak kuyucuklara yüklenmiştir. Jele 30 mA akım uygulanarak ayrılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra cam tablaların arası plastik bir cetvelle dikkatlice açılarak boyama işlemine geçilmiştir.

Jel Coomassie Brilliant Blue (%0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2-4 saat boyanmış ve Yıkama- I (%50 metanol, %10 asetik asit) çözeltisinde 1 saat bekletildikten sonra Yıkama- II (%7 asetik asit, %5 metanol) çözeltisine alınmıştır. Daha sonra tarayıcı kullanılarak bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

2.10. *B. thuringiensis* İzolatlarından Plazmit İzolasyonu

B. thuringiensis izolatlarından plazmitler Jensen ve arkadaşları (1995) tarafından gerçekleştirilen yöntemle göre yapılmıştır.

Hücreler 5 ml'lik LB sıvı besiyerinde 30 °C'de bir gece büyütülmüştür. Kültürlerden 2 ml alınarak 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve pelte 100 µl TE tamponunda (40 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7,9) çözülmüştür. Daha sonra hücrelere taze olarak hazırlanmış 200 µl alkali çözeltisi (%3 SDS, %15 sukroz, 50 mM Tris, pH 12,5) ilave edilmiş ve parçalanması sağlanmıştır. Karışım 60 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 5 U proteinaz K ilave edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünde bulunan karışımlar 20 kez alt-üst edildikten sonra 37 °C'de 90 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlem sonucunda alınan numuneler üzerine 1'er ml fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiştir. Tüpler 40 kez alt-üst edildikten sonra 6.000 xg'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Üst fazdaki plazmit içeren karışımdan 60 µl alınıp 1X TBE (Tris-Borik asit EDTA) de hazırlanmış %5'lik agaroz jelde 62 V'da 4 °C'de 5-7 saat elektroforez edilmiştir.

Jel 1 µg /ml'lik etidyum bromürlü dH₂O'lu karışım içerisinde, 4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Daha sonra tarayıcı kullanarak bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

2.11. İzolatların İnsektisidal ve Antibakteriyel Etkilerinin Araştırılması

2.11.1. İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

B. thuringiensis izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının insektisidal aktivitelerini test etmek için bioassayler yapılmıştır. Test edilecek karışımların yoğunluğu, spektrofotometrede ölçülerek OD600'de 1.89 (1.89×10^9 spor-kristal/ml) olacak şekilde ayarlanmıştır.

İzolatların spor-kristal karışımı, un güvesi *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) ve kızılağaç yaprak böceği *Agelastica alni* Linnaeus (Coleoptera, Chrysomelidae) larvalarına uygulanmıştır.

Kızılağaç yaprak böceği için taze kızılağaç yaprakları, un güvesi için kırılmış fıstık besin olarak kullanılmıştır. Spor-kristal karışımı steril distile su içerisinde homojenize edilmiş üç tekerrür halinde petri kaplarındaki besinlere uygulanmış ve oda sıcaklığında 15 dakika kurutulmuştur. Kontrol grubu olarak steril distile su ile ıslatılmış besinler kullanılmıştır. Daha sonra 10'ar adet *E. kuehniella* ve *Agelastica alni* larvası petrilere konmuş ve 10. gün sonunda ölü ve sağlıklı larvalar sayılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Bioassay uygulaması

2.11.2. İzolatların Bazı Bitki Patojeni Bakteriler Üzerinde Antibakteriyel Etkilerinin Araştırılması

Elde edilen izolatlar ile bitki patojeni bakteriler üzerinde etkilerine bakılarak biyolojik mücadele ajanı geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada; birçok bitki türü üzerinde önemli ekonomik kayıplara neden olan hastalıkların patojeni olduğu bilinen 8 bakteriyel bitki patojeni kullanılmıştır. Kùltürler; Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'ndeki kùltür koleksiyonlarından temin edilmiştir. Kullanılan bakteri türleri Tablo 2.2'de verilmiştir.

Antibakteriyel etkinin araştırılması için izolatlar Tryptic Soy Agar besiyerine nokta ekim yapılmış ve bir gece 30 °C'de inkübe edilerek koloni oluşturmaları sağlanmıştır. Bitki patojeni bakteriler ise Tryptic Soy Broth besiyerine ekilmiş ve bir gece 30 °C'ye ayarlanmış sallayıcı etüvde inkübe edilmiştir. Her bir bitki patojeni hazırlanan sıvı haldeki yumuşak Tryptic Soy Agar'a inoküle edilmiş ve izolatların bulunduğu petrilere dökülmüştür. Sıvı yumuşak besiyeri katılaştığında 30 °C'de bir gece inkübe edilerek izolatların patojen bakteriler üzerinde etki (zon) oluşturup oluşturmadıkları incelenmiştir.

Tablo 2.2. Antibakteriyel Etkinin Araştırılması için Kullanılan Bitki Patojeni Bakteriler

Bitki Patojeni Bakteriler
<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>
<i>Pseudomonas putida</i> biotype B/ <i>vancouverensis</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> <i>vitians</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> <i>begoniae</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> <i>phaseoli</i> <i>fuscans</i>
<i>Pseudomonas savastanoi</i> <i>nerium</i>
<i>Pseudomonas savastanoi</i> <i>oleae</i>

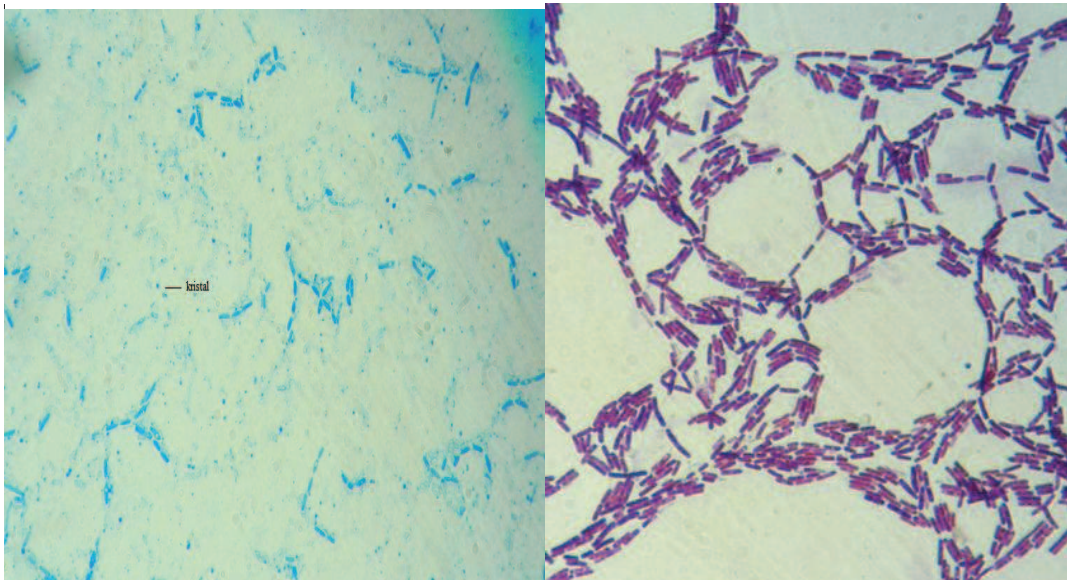
3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Giresun Adası'ndan alınan toprak örneklerinden izole edilen dört *Bacillus thuringiensis* izolatının morfolojik, kemotaksonomik ve moleküler teknikler kullanılarak tanımlanması yapılmıştır. Ayrıca moleküler çalışmaların yanında VITEK-2 ve toplam hücresel yağ asidi profillerine göre izolatlar tanımlanmıştır. Bu bakterilerin insektisidal ve antibakteriyel aktiviteleri de araştırılmıştır.

3.1. İzolatların Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.1.1. İzolatların Morfolojik Özellikleri

İzolatların koloni morfolojilerine bakıldığında krem renkli, dalgalı-yuvarlak olduğu belirlenmiştir. T1 izolatının diğer izolatlardan farklı olarak ıslak bir morfolojiye sahip olduğu görülmüştür. İzolatlar üzerinde spor ve Gram boyama yapıldıktan sonra sporları subterminal olan Gram pozitif çubuk şekilli bakteriler olduğu tespit edilmiştir. İzolatların kristal boyama sonucunda bipiramidal ve şekli belirlenemeyen kristaller içerdiği görülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. T1 izolatına ait kristal boyama (soldaki şekil) ve T4 izolatına ait Gram boyama (sağdaki şekil)

3.1.2. İzolatların Toplam Hücresel Yağ Asiti Profilleri

İzolatların toplam hücresel yağ asidi profillerinin belirlenmesi amacıyla Sherlock Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS) kullanılmıştır. Bu yöntemde öncelikle hücresel yağ asitleri saflaştırılmıştır. Saflaştırılan hücresel yağ asitlerine metil bağlanarak yağ asidi metil esterleri oluşturulmuştur. Daha sonra yağ asidi metil esterlerine hekzan bağlanarak, MIS cihazında, gaz kromatografisi yöntemiyle izolatların hücresel yağ asitlerinin cinsi, karbon sayısı, karbonlar arasındaki çift bağ sayısı, mevcut yağ asitlerinin konfigürasyonlarına göre durumları ve izolatlardaki yüzde olarak miktarları belirlenmiştir. İzolatların hücresel yağ asidi profilleri sistem bünyesinde bulunan elektronik kütüphaneye (Microbial Identification System-Library Generation Software) karşılaştırılarak, izolatların toplam hücresel yağ asidi profillerine göre tanısı yapılmıştır. İzolatların hücresel yağ asidi profilleri Tablo 3.1’ de verilmiştir.

MIS cihazı verilerinde bazı yağ asitleri tanımlanamamış ve “unknown” şeklinde verilmiştir. Bu tanımlanamayan yağ asitlerinin, toplam hücresel yağ asitleri içindeki oranları ise hesaplanmıştır. Ancak bu bilgilere tabloda yer verilmemiştir.

Bazı yağ asitleri tam olarak çözülememiş ve MIS cihazı verilerinde “summed feature” olarak verilmiştir. Bu yağ asitlerinin elde edilme zamanları göz önünde tutularak neler olabileceği verilerde belirtilmiş ve toplam hücresel yağ asitleri içindeki oranları hesaplanmıştır.

Yapılan bu çalışmada, yağ asidi profillerine göre izolatların içerdikleri yağ asitlerindeki karbon sayıları 12-18 arasında olduğu belirlenmiştir. İzolatların toplam 23 farklı yağ asidi içerdiği tespit edilmiştir.

Tüm izolatların C14:0 (Myristic acid) ve C16:0 (Palmitic acid) doymuş yağ asitlerini içerdikleri tespit edilmiştir. Diğer izolatlardan farklı olarak T2 ve T3 izolatlarının C12:0 (Lauric acid), T3 ve T4 izolatlarının C18:0 (Stearic acid) doymuş yağ asidi içerdikleri belirlenmiştir.

T4 izolatının 16:1 ω 11c (16 karbonlu, omega grubunun 11. karbonunda çift bağ bulunan tekli doymamış yağ asiti) içermesiyle diğer izolatlardan farklı bir yağ asiti içerdiği tespit edilmiştir. T1 izolatının diğer izolatlardan farklı olarak 16:0 iso

3OH (16 karbonlu, α grubunun 3. karbonuna bağlı bir OH grubu bulunan, iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği görölmüşür. T1, T3 ve T4 izolatlarında 17:1 anteiso A bulunduğu tespit edilmiştir.

İzolatların en fazla miktarda 15:0 iso (15 karbonlu, iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdikleri belirlenmiştir.

Tablo 3.1. İzolatların Toplam Yağ Asit Oranları (%)

Yağ Asitleri	İzolatlar			
	T1	T2	T3	T4
<u>Saturated</u>				
12:0	–	0.94	0.54	–
14:0	3.12	3.64	5.08	3.20
16:0	4.57	3.95	5.18	7.59
18:0	–	–	0.62	1.07
<u>Unsaturated</u>				
16:1 ω11c	–	–	–	0.94
17:1 ω 5c	4.69	4.85	4.85	3.30
17:1 iso ω10c	4.85	4.23	1.58	6.75
17:1 anteiso A	1.20	–	0.60	1.09
16:1 w7c alcohol	1.07	0.57	0.40	1.41
<u>Branched</u>				
12:0 iso	1.69	1.17	0.95	1.25
13:0 iso	12.24	15.80	9.38	8.81
13:0 anteiso	1.99	0.97	0.91	2.08
14:0 iso	5.03	3.81	5.29	4.41
15:0 iso	25.90	31.33	33.00	20.21
15:0 antesio	5.05	2.54	3.22	6.14
16:0 iso	5.54	4.21	5.92	7.29
17:0 iso	9.21	9.64	8.34	11.42

Tablo 3.1.'in devamı

17:0 antesio	1.48	0.85	0.97	2.63
<u>Hydroxy</u>				
15:0 2OH	1.30	0.95	0.44	1.08
16:0 iso 3OH	0.69	–	–	–
Sum In Feature 2 14:0 3OH/16:1 iso I	3.18	2.13	3.34	1.67
Sum In Feature3 16:1 w6c/16:1 w7c	7.23	8.45	9.40	7.66
Summed Feature 2 12:0 aldehyde? 16.1: iso I 14:0 3OH unknown 10.9525	3.18	2.13	3.34	1.67
Summed Feature 3 16:1 w7c/16:1 w6c	7.23	8.45	9.40	7.66

12:0 lauric acid, 13:0 tridecylic acid, 14:0 myristic acid, 15:0 pentadecylic acid, 16:0 palmitic acid, 17:0 margaric acid, 18:0 stearic acid, 16:1 palmitoleic acid, 17:1 heptadecenoic acid

Tablo 3.2. İzolatların Yağ Asit İçeriklerine Göre Benzediği Bakteriler ve Oranları

İzolatlar	Yağ Asit Sonuçları	% Oran
T1	<i>Bacillus cereus</i> -GC subgroup A	63
	<i>Bacillus cereus</i> -GC subgroup B	51,9
T2	<i>Bacillus cereus</i> -GC subgroup A	60,3
	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	40,1
T3	<i>Bacillus cereus</i> -GC subgroup A	80
	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	78,2
	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	72,4
	<i>Bacillus thuringiensis dendrolimus</i>	51,6
T4	<i>Bacillus cereus</i> -GC subgroup B	49,4
	<i>Bacillus cereus</i> -GC subgroup A	39,8
	<i>Bacillus mycoides</i> -GC subgroup A (<i>Bacillus cereus</i> group)	38,1

3.1.3. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri

İzolatların biyokimyasal özelliklerini tespit etmek ve tanımlama yapabilmek için VITEK-2 sistemi kullanılmıştır. İzolatların biyokimyasal özellikleri Tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri

Testler	İzolatlar			
	T1	T2	T3	T4
BETA-XYLOSIDASE	-	-	-	-
BETA-GALACTOSIDASE	-	-	-	-
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	-	(+)	+
ELLMAN	+	+	+	+
D-MANNOSE	-	(-)	-	-
BETA-MANNOSIDASE	-	-	-	-
INULIN	-	-	-	-
OLEANDOMYCIN-RESISTENS	-	-	-	-
L-lysin-ARYLAMIDASE	-	-	-	-
L-pyrrolidonyl-ARYLAMIDASE	+	+	+	+
CYCLODEXTRIN	-	-	-	-
METHYL-D-XYLOSID	-	-	-	-
D-MELEZITOSE	-	-	-	-
FOSFORYLCHOLIN	-	-	-	-
D-GLUKOSE	+	+	+	+
ÆSKULIN-hydrolyse	+	+	(-)	+
L-aspartat-ARYLAMIDASE	-	-	-	-
ALFA-GALACTOSIDASE	-	-	-	-
D-GALACTOSE	-	-	-	-
ALFA-MANNOSIDASE	-	-	-	-
N-ACETYL-D-GLUCOSAMIN	(+)	-	+	-
PYRUVAT	-	-	-	(-)
D-RIBOSE	-	-	(+)	-
TETRAZOLIUM-RØD	-	-	-	-
Leucin-ARYLAMIDASE	+	+	+	(-)
Alanin-ARYLAMIDASE	-	-	-	-

Tablo 3.3.'ün devamı

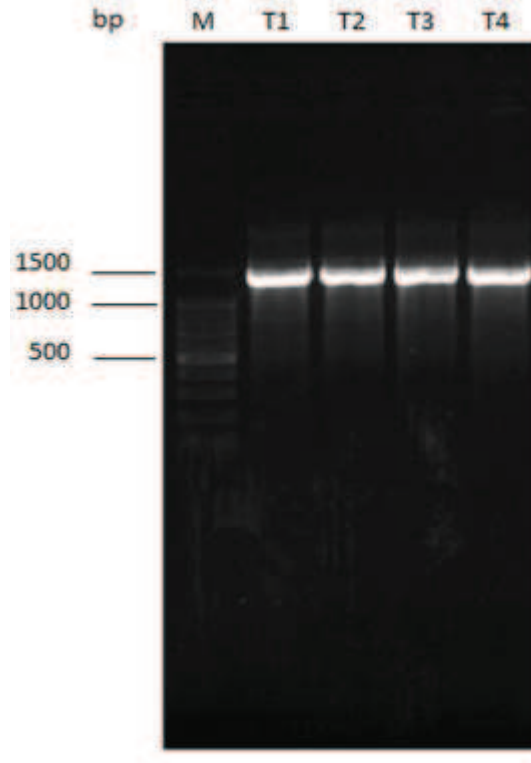
GLYCOGEN	-	-	-	-
MALTOTRIOSE	-	-	(-)	-
PALATINOSE	-	-	-	-
ALFA-GLUCOSIDASE	-	-	-	-
PUTRESCIN-assimilation	-	-	-	-
POLYMYXIN_B-RESISTENS	+	+	+	+
Fenylalanin-ARYLAMIDASE	-	(+)	+	-
Tyrosin-ARYLAMIDASE	-	-	-	-
myo-INOSITOL	-	-	-	(-)
Glycin-ARYLAMIDASE	-	-	-	-
L-RHAMNOSE	-	-	-	-
D-TAGATOSE	-	-	-	-
VÆKST I 6,5% NaCl	-	-	+	-
L-prolin-ARYLAMIDASE	-	-	-	-
BETA-N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE	+	+	-	+
METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSID- acidifikation	-	-	-	+
D-MANNITOL	-	-	-	-
BETA-GLUCOSIDASE	+	+	-	+
D-TREHALOSE	+	-	+	-
KANAMYCIN-RESISTENS	(-)	+	+	-

+: pozitif, - : negatif, (+): Pozitif eşik değerine yakın, (-): Negatif eşik değerine yakın.

VITEK-2 sistemi sonuçlarına göre T1, T2 ve T4 bakterileri sırasıyla %93, %95 ve %88 oranlarında *Brevibacillus laterosporus* bakterisine benzemektedir. T3 bakterisi ise %89 oranında *Bacillus cereus / thuringiensis / mycoides* bakterilerine benzemektedir.

3.1.4. İzolatların 16S rRNA Analizleri

İzolatların çoğaltılan 16S rRNA'larının yaklaşık 1500 bp uzunluğunda olan baz sıraları elde edilmiştir (Ekler) (Şekil 3.2). Bu baz sıraları NCBI blast programında karşılaştırıldıktan sonra izolatların benzerlik gösterdiği bakteri sonuçları Tablo 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.2. İzolatların 16S rRNA PCR ürünleri

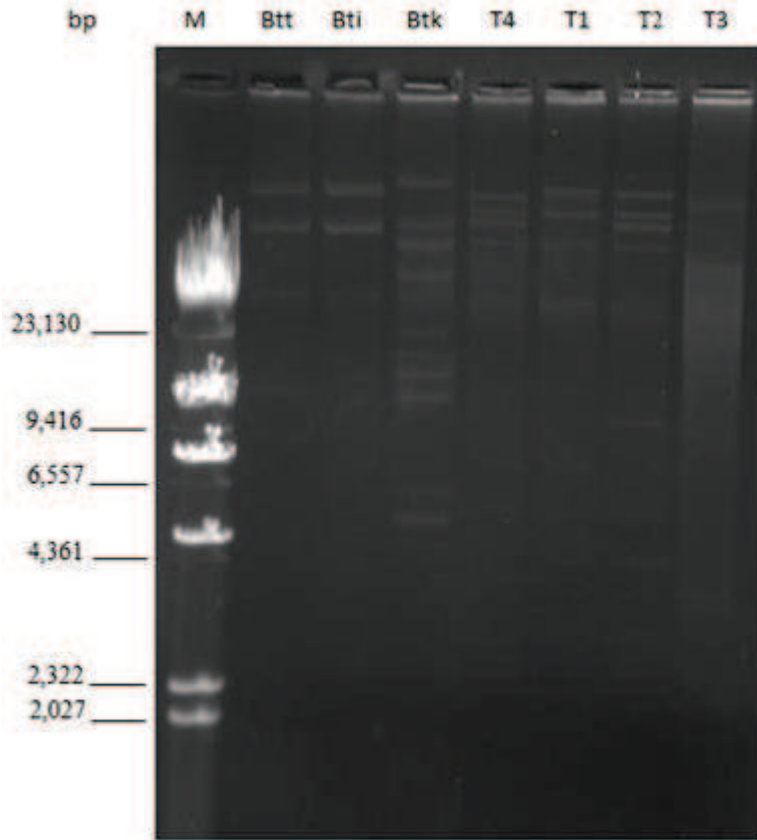
Tablo 3.4. İzolatların 16S rRNA Dizilerine Göre Tür Tayinleri

İzolat No	Kayıt No	16S rRNA Dizisine Göre En Fazla Benzediği Bakteri	% Oranı
T1	EU153549.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	99
T2	EU153549.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	99
T3	EU153549.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	99
T4	EU153549.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	99
	CP004123.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> strain IS5056	99

3.1.5. İzolatların Plazmit İçerikleri

İzolatların plazmit sayıları ve büyüklükleri kontrol *B. thuringiensis* suşları ile karşılaştırılmıştır. Plazmit izolasyonu için kullanılan bu yöntemde plazmitler linear olarak elde edilemezler. Bu yüzden bazı plazmitler agaroz jelde üç farklı bantdan daha fazla olabilmektedirler. *B. thuringiensis*'den izole edilen plazmitlerin tam sayısını belirlemek oldukça zordur. Bu nedenle, burada plazmitlerin kendilerinden ziyade plazmidik bantların sayısı ve büyüklükleri verilecektir.

İzolatların plazmit DNA büyüklükleri Lambda DNA/ HindIII Markers (Promega) ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. T3 izolatında 3, T1 izolatında 4, T4 izolatında 5 ve T2 izolatında ise 6 plazmit tespit edilmiştir. Plazmit DNA büyüklüklerinin 9,710 bp ile >23,130 bp arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3). İzolatların plazmit içerikleri birbirleri ve kontrol suşlar ile karşılaştırıldığında izolatların birbirlerinden ve kontrol suşlardan farklı oldukları görülmüştür. İzolatların plazmit büyüklüklerinin yaklaşık değerleri Tablo 3.5'de verilmiştir.



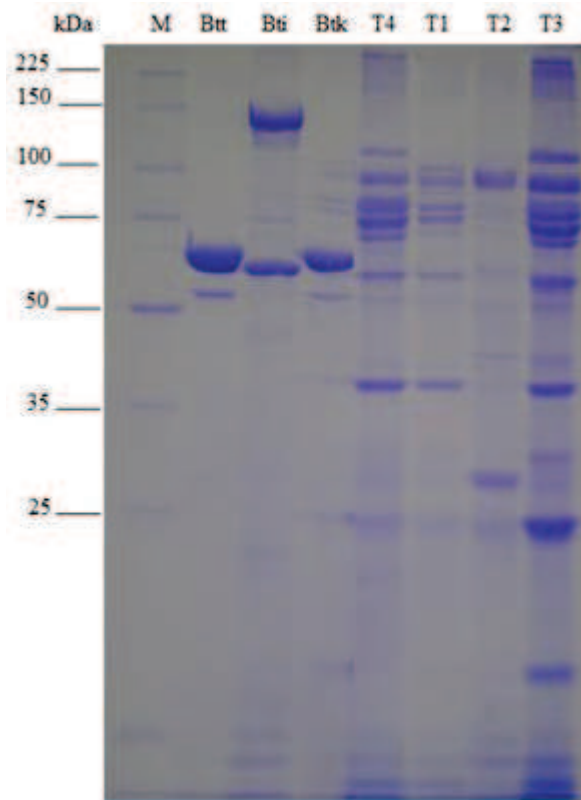
Şekil 3.3. İzolatların plazmit içerikleri (M:marker)

Tablo 3.5. İzolatların plazmit DNA sayıları ve büyüklükleri

İzolat	Plazmit Sayısı	Molekül Büyüklüğü (bp)
T1	4	43.233-39.961-35.441-28.962
T2	6	43.233-39.961-38.091-35.441-28.962-9.710
T3	3	41.052-32.169-28.962
T4	5	42.454-40.272-39.026-35.441-28.962

3.1.6. İzolatların Kristal Protein Profilleri

İzolatların kristal proteinlerini tespit etmek için hazırlanan spor-kristal karışımları %10'luk SDS-PAGE'de analiz edilmiştir. İzolatların kristal protein büyüklükleri Broad Range Protein Molecular Markers (Promega) ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. İzolatların kristal protein içerikleri birbirleri ve kontrol suşlar ile karşılaştırıldığında izolatların birbirlerinden ve kontrol suşlardan farklı oldukları görülmüştür (Şekil 3.4).



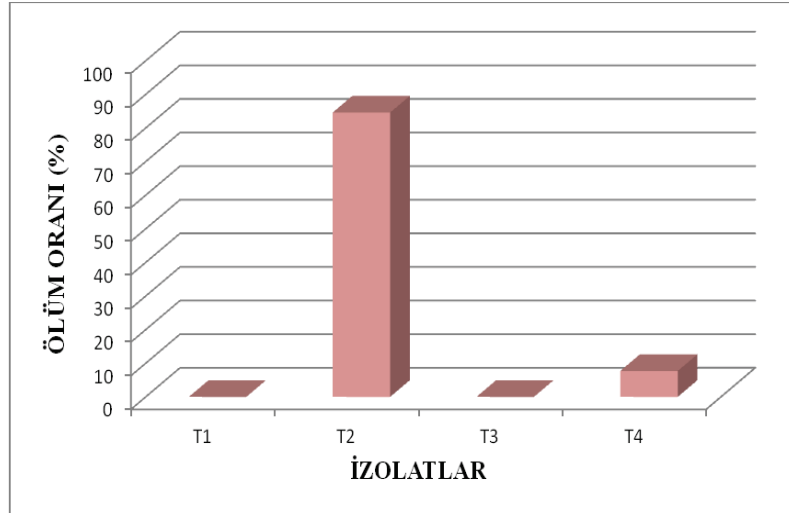
Şekil 3.4. *B. thuringiensis* izolatlarının spor-kristal karışımlarının protein profilleri

3.2. İzolatların İnsektisidal ve Antibakteriyel Etkileri

3.2.1. İzolatların İnsektisidal Aktiviteleri

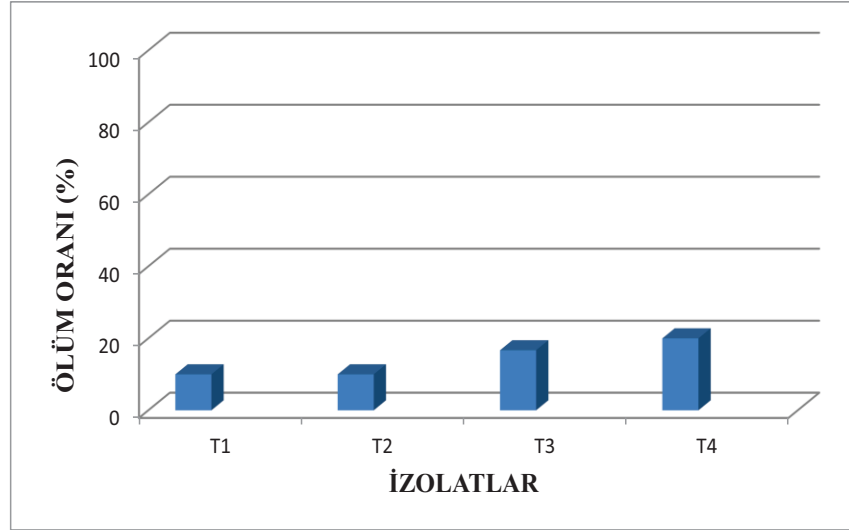
Farklı *B. thuringiensis* izolatlarının 10^9 spor-kristal/ml karışımı *Ephestia kuehniella* ve *Agelastica alni* larvalarına uygulanarak öldürücü etkileri belirlenmiştir. İzolatların öldürücü etkisi kontrol (saf steril su) ile karşılaştırılmıştır. %'de ölüm oranı Abbott (1925) tarafından geliştirilen formülle [%etki= (ilaçsızda canlı-ilaçlıda canlı / ilaçsızda canlı) x100] hesaplanmıştır.

Agelastica alni larvaları ile yapılan bioassaylerde en fazla insektisidal etki %84,6 ölüm oranı ile T2 bakterisinde görülmüştür. T4 bakterisi ise az bir etki göstermiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. İzolatlardan elde edilen 10^9 spor-kristal/ml karışımının *Agelastica alni* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi.

Lepidoptera grubundan olan *Ephestia kuehniella* larvaları kullanılarak yapılan biyoassaylerde T4 bakterisi %20 ölüm oranı ile diğer izolatlara göre larvalar üzerinde daha etkili olmuştur (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. İzolatlardan elde edilen 10^9 spor-kristal/ml karışımının *E. kuehniella* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi.

3.2.2. İzolatların Bitki Patojeni Bakteriler Üzerindeki Antibakteriyel Etkileri

Antibakteriyel etkinin araştırılması için bitki patojeni bakteriler üzerine izolatlar uygulanmıştır. T3 bakterisinin *Micrococcus luteus* patojeninin büyümesini engelleyici düşük bir antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. T3 bakterisinin oluşturduğu zon çapı Şekil 3.7’de gösterilmektedir.



Şekil 3.7. T3 bakterisinin *Micrococcus luteus* üzerindeki antimikrobiyal etkisi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tarım zararlıları ile mücadelede II. Dünya savaşından sonra kimyasal pestisitlerin kullanımı hızlı bir artış göstermiştir. Günümüzde ise eskiye oranla kimyasal pestisit kullanımında azalma olmasına karşın tarım alanlarında kimyasal pestisit kullanımı yaygın olarak devam etmektedir. Bu kimyasalların ortaya çıkardığı problemlerle mücadele etmek oldukça zordur. Kimyasal insektisitlerin çok fazla kullanılmaları doğada kalıntı bırakmakta ve bu durum çeşitli böceklerin bu ilaçlara karşı direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Ayrıca bunların kendi hedef organizmalarının dışında hayvan ve insanlara da toksik etki yaptığı bilinmektedir. Bu gibi olumsuzluklar insanları alternatif ve daha güvenli mücadele yöntemleri geliştirmeye yöneltmiştir.

Mikroorganizmalar tarafından üretilen insektisitler hedef böcek türü için oldukça spesifik olmaları, bakteriler sayesinde ayrıştırılabilir olmaları, zararlı böceklerde bu bileşiklere karşı direnç gelişiminin yavaş olması, hasat döneminde dahi uygulanabilmeleri, insan ve çevre sağlığı bakımından güvenli ilaçlar olması bakımından oldukça avantajlıdır. Özellikle *B. thuringiensis* bakterisi kullanılarak oluşturulan insektisitler etkili, güvenli ve spesifiktir.

Bu çalışmada Giresun Adası'ndan alınan toprak örneklerinden izole edilen 4 *B. thuringiensis* bakterisi kullanılmıştır. *B. thuringiensis* özellikle toprak olmak üzere hemen hemen her yerde bulunmaktadır (Vilas-Bôas ve ark., 2007; Raymond ve ark., 2010). *B. thuringiensis* Güney ile Kuzey Amerika (Martin ve Travers, 1989; Ibarra ve ark., 2003; Armengol ve ark., 2007; Park ve ark., 2008), Avrupa (Martin ve Travers, 1989; Doroszkiewicz ve Lonc, 1999; Quesada-Moraga ve ark., 2004), Batı ile Güney Asya (Martin ve Travers, 1989; Seifinejad ve ark., 2008; Bukhari ve Shakoori, 2010), Güney Doğu Asya (Martin ve Travers, 1989; Hastowo ve ark., 1992; Yasutake ve ark., 2006), Uzak Doğu (Çin, Kore ve Japonya) (Martin ve Travers, 1989; Ohba ve ark., 2000; Gao ve ark., 2008), Afrika (Martin ve Travers, 1989; Ogunijimi ve ark., 2000; Saadaoui ve ark., 2009) ve Antartika (Forsyth ve Logan, 2000) topraklarından izole edilmiştir. Ayrıca Orta Doğu'da Mısır (Merdan ve Labib, 2003) ve Ürdün (Sadder ve ark., 2006) topraklarında da bulunmuştur.

Karakterize edilen *B. thuringiensis* izolatlarının morfolojik şekli literatürde yer alan *B. thuringiensis* suşları ile benzerlik göstermektedir (Sneath, 1986). Fakat T1 izolatu nütrient agar besiyerinde diğer izolatlardan farklı olarak ıslak bir morfolojiye sahip olduğu görülmüştür. Bu da mevcut *B. thuringiensis* izolatları ile uyuşmamaktadır. Iriarte ve arkadaşlarının (2000) yaptığı bir çalışmada da *B. thuringiensis* izolatlarından birinin diğerinden farklı morfolojik özelliklere sahip olduğu bulunmuştur.

İzolatlar üzerinde endospor ve Gram boyama yapıldıktan sonra sporları subterminal olan Gram pozitif çubuk şekilli bakteriler olduğu tespit edilmiştir. İzolatların kristal boyama sonucunda bipiramidal ve şekli belirlenemeyen kristaller içerdiği görülmüştür. *B. thuringiensis* suşlarının kristal şekilleri; kristal proteinleri, parasporal inklüzyonlarının çözünme şartları, tripsin-dirençli proteinlerin büyüklüğü, plazmit içerikleri, *cry* genleri ve toksik olma özellikleri ile ilişkilidir (Höfte ve Whiteley, 1989).

İzolatların *cry* genlerini tespit etmek amacıyla genel primerler olan *cry1*, *cry2*, *cry3* ve *cry4* (Ben-Dov ve ark., 1997) kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yapılmış ve izolatların bu *cry* genlerini taşımadığı belirlenmiştir. Wang ve arkadaşları (2003) Cry1, Cry2 ve Cry9 proteinlerinin Lepidoptera, Cry3-7-8 grubundaki proteinlerin Coleoptera, Cry4 ve Cry11 proteinlerinin ise Diptera takımındaki böceklerle karşı oldukça etkili olduğunu belirtmişlerdir. Coleoptera grubundan *Agelastica alni* larvaları ile yapılan bioassaylerde en fazla insektisidal etki (%84,6) izolatlar arasından T2 bakterisinde görülmüştür. Çalışmada, T2 izolatında Coleoptera takımına karşı etkili *cry3* geni bulunamamıştır fakat etkili diğer *cry* genleri araştırılabilir. İzolatların Lepidoptera grubundan *Ephestia kuehniella* larvaları üzerinde ise düşük bir aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde Hossain ve arkadaşları (1997) yaptıkları bir çalışmada, toprak örneklerinin %100'ünde *B. thuringiensis* bulduklarını fakat bunların %97,5'inin sivrisinek larvalarına karşı toksik etki göstermediğini belirtmişlerdir. Toksik olmayan *B. thuringiensis* izolatları toprak örneklerinde, önceki çalışmalarda rapor edildiği gibi yaygın olarak bulunmaktadır (Ohba ve Aizawa, 1978; Ohba ve ark., 1988; Martin ve Travers, 1989).

Silva ve arkadaşları (2004) bipiramidal kristallerin Cry1 proteinlerle, kübik kristallerin ise Cry2 proteinleri ile bağlantılı olabileceğini belirtmişlerdir. Oysa Yılmaz (2010) çalışmasında *cry2* geni taşımayan izolatlarında kübik şekilli kristal proteinler görmüştür. Ohba ve Aizawa (1986) parasporal proteinlerin şekli ve toksisitesi arasında bağlantı olabileceğini ve bipiramidal kristallerin daha toksik olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmada da bütün izolatların bipiramidal kristal taşımalarına rağmen *cry1* geni taşımadıkları belirlenmiştir.

Laboratuar ortamında izolatların spor-kristal karışımları *E. kuehniella* ve *Agelastica alni* larvaları üzerinde öldürücü etkileri araştırılmış ve kontrol kıyaslanmıştır. Kalmykova ve arkadaşları (2009) spor-kristal karışımının tek spor ya da tek kristalden daha yüksek seviyede toksisite gösterdiğini ifade etmişlerdir. *B. thuringiensis* toksitesi yalnızca *cry* gen içeriğine bağlı değildir çünkü Cry proteinlerinden başka spor ve kristal protein etkileşimi ve β -ekzotoksin gibi diğer çözünebilir toksinler de toksiteye katkıda bulunmaktadır (Porcar ve ark., 2000).

İzolatların plazmit içerikleri incelendiğinde 3 ile 6 arasında değişen sayıda plazmit taşıdıkları gözlenmiştir (Tablo 3.5). Gao ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada izolatların farklı sayıda plazmit taşıdığını tespit etmişlerdir.

Spor ve kristal karışımının Bradford metodu ile protein miktarı belirlendikten sonra yapılan SDS-PAGE analizinde 25 kDa'lık (T3) protein bantları belirlenmiştir. Ayrıca 50 kDa ile 225 kDa'dan daha büyük protein bantları tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada 65 kDa ile 274 kDa arasında yer alan proteinlerin Cry proteini, 21 ile 25 kDa arasında yer alan proteinlerin ise Cyt proteini olduğu belirtilmiştir (Renganathan ve ark., 2011).

İzolatların yağ asit analizleri sonuçlarına göre *B. cereus* grubu içerisinde yer aldığı belirlenmiştir. Ancak *B. cereus* grubu içerisinde yer alan *B. cereus*, *B. mycoides* ve *B. thuringiensis* bakterilerinin yağ asit içerikleri benzerdir ve bu bakterileri birbirinden ayırt etmek için yağ asit analizi kullanılmaz (Vaisiinen ve ark., 1991). Ancak *B. antracis* bakterisinin *B. cereus* ve *B. thuringiensis* bakterilerinden farklı olduğunu belirlemek için yağ asit analizi kullanılmaktadır (Kaneda, 1967 ve 1968; Lawrence ve ark., 1991).

VITEK-2 sistemi sonuçlarına göre T1, T2 ve T4 bakterileri sırasıyla %93, %95 ve %88 oranlarında *Brevibacillus laterosporus* bakterisine benzemektedir. T3 bakterisi ise %89 oranında *Bacillus cereus / thuringiensis / mycoides* bakterilerine benzemektedir. *Brevibacillus laterosporus* Laubach, *B. thuringiensis* gibi çubuk şeklinde, endospor oluşturan bir bakteridir ve morfolojik olarak sporun bir tarafına sıkıca bağlanan tipik kano şekilli parasporal üretimi ile karakterize edilir ki bu da sporangiumun yan konumunu belirler (Shida ve ark., 1996). İzolatların parasporal şekilleri *B. thuringiensis* ile benzerlik göstermektedir.

İzolatların 16S rRNA dizi analizleri sonucu %99 oranında *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*'ye benzedikleri belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abbott, W. S. 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Abdul-Rauf, M. ve Ellar, D. J. 1999. Mutations of loop 2 and loop3 residues in domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1C delta-endotoxin affect insecticidal spesificity and initial binding to *Spodoptera littoralis* and *Aedes aegypti* midgut membranes. *Current Microbiology*, 39 (2): 94-98.
- Akar, N. 1998. *Klinik Moleküler Patolojiye Giriş*. Antıp, Ankara, 58-62.
- Alcantara, E. P., Alzate, O., Lee, M. K., Curtiss, A. ve Dean, D. H. 2001. Role of alpha-helix seven of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin in membrane insertion, structural stability, and ion channel activity. *Biochemistry*, 40 (8): 2540- 7.
- Aly, N. 2007. PCR Detection of cry Genes in Local *Bacillus Thuringiensis* Isolates. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1 (4): 461-466.
- Apaydin, O., Yenidünya, A. F., Harsa, S. ve Güneş H. 2005. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (3): 285-292.
- Aptosoglou, S. G., Sivropoulou, A. ve Koliais, S. L. 1997. Plasmid Patterns of *Bacillus thuringiensis* Strains and Isolates. *Microbios*, 91: 203-214.
- Armengol, G., Escobar, M. C., Maldonado, M. E. ve Orduz, S. 2007. Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 77-88.
- Aronson, A. I., Han, E. S., McGaughey, W. ve Jounson, D. 1991. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 981–986.
- Aronson, A. I., Wu, D. ve Zhang, C. 1995. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *Journal of Bacteriology*, 177: 4059–4065.

Ash, C. ve Collins, M. D. 1992. Comparative analysis of 23S rRNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 94: 75–80.

Ash, C., Farrow, A. E., Wallbanks, S. ve Collins, M. D. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-rRNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*, 13(4): 202–206.

Ayvaz, A. 2001. Un Güvesi *Ephestia kuehniella* Zeller., (Lepidoptera: Pyralidae) ve Yumurta Paraziti *Trichogramma evanescens* Westwood., (Hymenoptera: Trichogrammatidae)'in Bazı Biyolojik Özellikleri Üzerine Gamma Radyasyonunun Etkileri. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp. 172, Ankara.

Bajwa, W. I. ve Kogan M., 2001. *Bacillus thuringiensis* based biological control of insect pests. Integrated Plant Protection Center (IPPC), Oregon State University, Corvallis.

Bavykin, S. G., Lysov, Y. P., Zakhariyev, V., Kelly, J. J., Jackman, J., Stahl, D. A., Cherni, A. 2004. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (8): 3711–3730.

Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N. ve Margalith, Y. 1997. Extented Screening by PCR for Seven *cry*-Group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (12): 4883-4890.

Berliner, E. 1911. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe. *Zeitschrift Gesamte Getreidewes*, Berlin, 3: 63–70.

Bozlağan, İ., 2006. Kayseri'den Alınan Toprak Örneklerinden Elde Edilen *Bacillus thuringiensis* Suşlarının İzolasyonu, Tanımlanması ve Bazı Zararlı Böcek Türleri Üzerindeki Toksik Etkilerinin Araştırılması. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 55, Kayseri.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-251.
- Bravo, A., Gill, S. S. ve Soberón, M., 2005. *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use In: *Comprehensive Molecular Insect Science*, pp. 175-206, Elsevier B.V., St. Louis, MO.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S. ve Soberón, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab poreforming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1667 (1): 38–46.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F. J., Peña, G., Nuñez-Valdez, M-E., Soberón, M. ve Quintero, R. 1998. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (12): 4965-4972.
- Brown, K. L. ve Whiteley, H. R. 1992. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. *Journal of Bacteriology*, 174: 549–557.
- Bukhari, D. A. ve Shakoori, A. R. 2010. Isolation and molecular characterization of *cry4* harbouring *Bacillus thuringiensis* isolates from Pakistan and mosquitocidal activity of their spores and total proteins. *Pakistan Journal of Zoology*, 42: 1-15.
- Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2415-2422.
- Cannon, R. J. C. 1995. *Bacillus thuringiensis* in pest control. In: *Biological Control: Benefits and Risks* (Hokkanen, H. M. T. ve Lynch J. M., Ed.), pp. 190-197, Cambridge University Press.

- Carozzi, N. B., Kramer, V. C., Warren, G. W., Evola, S. ve Koziel, M. G. 1991. Prediction of Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains by Polymerase Chain Reaction Product Profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (11): 3057-3061.
- Carroll, J., Convents, D., Van Damme, J., Boets, A., Van Rie, J. ve Ellar, D. J. 1997. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70: 41-49.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. ve Dean, D. H. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 807-813
- Da Silva, S. M. B., Silva-Werneck, J. O., Falcão, R., Gomes, A. C., Fragoso, R. R., Quezado, M. T., Neto, O. B. O., Aguiar, J. B., de Sá, M. F. G., Bravo, A. ve Monnerat, R. G. 2004. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. *Journal of Applied Entomology*, 128: 102–107.
- Dai, S. M. ve Gill, S. S. 1993. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* spp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23 (2): 273-283.
- Damgaard, P. H., Jacobsen, C. S. ve Sorensen, J. 1996. Development and application of a primer set for specific detection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil using magnetic capture hybridization and PCR amplification. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 436-441.
- De Barjac, H. ve Bonnefoi, A. 1962. Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *thuringiensis*. *Entomophaga*, 7: 5-31.
- De Barjac, H., 1981. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980* (Burgess, H.D., Ed.), pp. 35-43, Academic Press, London.

- De Maagd R. A., Bravo, A., Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 17 (4):193–199.
- De Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. ve Schnepf, H. E. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*, 37: 409-433.
- Delécluse, A., Charles, J. F., Klier, A. ve Rapoport, G. 1991. Deletion by in vivo recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. *Journal of Bacteriology*, 173 (11): 3374–3381.
- Doroszkiewicz, W. ve Lonc, F. 1999. Biodiversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the phylloplane and soils of Lower Silesia Region (Poland). *Acta Microbiologica Polonica*, 48: 355-361.
- Dulmage, H. T. ve Aizawa, K. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. In: *Microbial and Viral Pesticides* (Kurstak, E., Ed.), pp. 209-237, Marcel Dekker, New York.
- Ely, S. 1993. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. In: *Bacillus thuringiensis, An Experimental Biopesticide: Theory and Practice*, pp. 105-124, (Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J. ve Higgs, S., Ed.), John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- Eryüzlü, E. 2010. *Malacosoma neustria* Orjinli *Bacillus thuringiensis*'e Ait Cry2Ab Geninin Karakterizasyonu, Ekspresyonu ve İnsektisidal Aktivitesinin Araştırılması. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 89, Trabzon.
- Eschriche, B. B., Tabashnik, N., Finson, N. ve Fere, J. 1995. Immunochemical detection of binding of CryIA crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* in highly resistant strains of *Plutella xylostella* from Hawaii. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 212: 388-395.

- Espinasse, S., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Gohar, M., Bourguet, D. ve Sanchis, V. 2003. Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology*, 47: 501-507.
- Estrush, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A. ve Kozeil, M. G. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insect. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 93: 5389-5394.
- Feitelson, J. S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. In: *Advanced Engineered Pesticides* (Kim, L., Ed.), pp. 63–71, Marcel Dekker, New York.
- Feitelson, J. S., Payne, J. ve Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Biotechnology*, 10: 271-275.
- Ferre, J. ve Van Rie, J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 47: 501-33.
- Forsyth, G. ve Logan, N. A. 2000. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Northern Victoria Land, Antarctica. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 263-266.
- Frutos, R. ve Juarez Perez, V. M. 1997. PCR-Based Approach for Detection of Novel *Bacillus thuringiensis cry* Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 8 (63): 2997-3002.
- Frutos, R., Rang, C. ve Royer, M. 1999. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Critical Reviews in Biotechnology*, 19: 227-276.
- Gao, M., Li, R., Dai, S., Wu, Y. ve Yi D. 2008. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. *Biological Control*, 44: 380–388.
- Ge, A.Z., Rivers, D., Milne, R. ve Dean, D. H. 1991. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (27): 17954-17958.

Ge, A.Z., Shivarova, N. I. ve Dean, D. H. 1989. Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin protein. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 11: 4037-4041.

Glare, T. R. ve O'Callaghan, M., 2000. *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*, John Wiley and Sons, Chichester, New York.

Goldberg, L. H. ve Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*, 37: 355-358.

Gonzalez, J. M. ve Carlton, B. C. 1982. Plasmid transfer in *Bacillus thuringiensis*, In: *Genetic exchange: A celebration and a new generation*, pp. 85-95, (Streips, U., Goodgal, S., Guild, W. ve Wilson, G., Ed.), Marcel-Dekker, Inc., New York.

Gonzalez, J. M., Dulmage, Jr. H. T. ve Carlton, B. C. 1981. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, 5: 351–365.

Gould, F., Martínez-Ramírez, A., Anderson, A., Ferre J., Silva, F. J. ve Moar W. J. 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 89: 7986–7990.

Gurtler, V. 1999. The role of recombination and mutation in 16S-23S rDNA spacer rearrangement. *Gene*, 238: 241–252.

Gurtler, V. ve Stanisich V. A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142: 3–16.

Han, C. S., Xie, G. ve Challaconbe, J. F. 2006. Pathogenomic Sequence Analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Isolates Closely Related to *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 188 (9): 3382–3390.

Hansen, B. M., Damgaard, P. H., Eilenberg, J. ve Pedersen, J. C. 1996. *Bacillus thuringiensis* Ecology and Environmental Effects of its Use for Microbiol Post Control. Ministry of Environment and Energy, Denmark, Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 316.

- Hastowo, S., Lay, B. W. ve Ohba, M. 1992. Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. *Journal of Applied Bacteriology* 73: 108–113.
- Helgason, E. Okstad O. A., Cauquant, D. A., Johansen H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. ve Kolstø, A. B. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: one species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (6): 2627–2630.
- Hofmann, C. ve Lu, P. 1986. Binding and activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin to invertebrate cells. *Archives of Microbiology*, 146: 7–11.
- Hofmann, C., Lüthy, P., Hütter, R. ve Pliska V. 1988. Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *European Journal of Biochemistry*, 173 (1): 85–91.
- Hossain, M. A., Ahmed, S. ve Hoque, S. 1997. Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70: 221–225.
- Höfte, H. ve Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53 (2): 242–255.
- Ibarra, J. E., del Rincón, M. C., Ordúz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., de Oliveira, C. M. F., Lanz, H., Rodrigues, M. H., Sánchez, J., Pena, G. ve Bravo, A. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5269-5274.
- Iriarte, J., Dumanoir, V. C., Bel, Y., Porcar, M., Ferrandis, M. D., Lecadet, M. M., Ferre, J. ve Caballero, P. 2000. Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *balearica* (Serotype H48) and ser. *navarrensis* (Serotype 50): Two Novel Serovars Isolated in Spain. *Current Microbiology*, 40: 17-22.
- Jensen, G. B., Wilcks, A., Petersen, S. S., Damgaard, J., Baum, J. A. ve Andrup, L. 1995. The Genetic Basis of the Aggregation System in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Is Located on the Large Conjugative Plasmid pXO16. *Journal of Bacteriology*, 177: 2914-2917.

- Jurat-Fuentes, J., Gould, F. L. ve Adang, M. J. 2002. Altered glycosylation of 63- and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (11): 5711–5717.
- Kalmykova, G., Burtseva L., Milne, R. ve Frankenhuyzen, K. V. 2009. Activity of spores and extracellular proteins from six Cry strain and a Cry strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against the western spruce budworm, *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae). *Canadian Journal of Microbiology*, 55, 536-543.
- Kaneda, T. 1967. Fatty acids in the genus *Bacillus*. 1. Iso- and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids of 10 species. *Journal of Bacteriology*, 93: 894-903.
- Keim, P., Kalif, A., Schupp, J., Hill, K., Travis, S. E., Richmond, K., Adair, D. M., Hugh-Jones, M., Kuske, C. R. ve Jackson, P. 1997. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *Journal of Bacteriology*, 179 (3): 818–824.
- Kence, M. 1988. Ecological genetics of malathion resistance in housefly, *Musca domestica* L., Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp. 108, Ankara.
- Kirouac, M., Vachon, V., Noël, J. F., Girard, F., Schwartz, J. L. ve Laprade, R. 2002. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1561 (2): 171-9.
- Koneman, E. W. ve Winn, W. C. 2006. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed., Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, pp. xxxi, 30, 1535, 79 leaves of plates.
- Krieg, A. 1971. Concerning α -exotoxin produced by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17: 134-135.

- Krieg, A., Huger, A. M., Langenbruch, G. A. ve Schnetter, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, a New Pathotype Effective against Larvae of Coleoptera. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 96: 500-508.
- Kronstad, J. W., Schnepf H. E. ve Whiteley, H. R. 1983. Diversity of Locations for *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Genes. *Journal of Bacteriology*, 154: 419-428.
- Kuo, W. S. ve Chak, K. F. 1996. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1369-1377.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lawrence, D., Heitefuss, S. ve Seifert, H. S. H. 1991. Differentiation of *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* by gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (7): 1508- 15 12.
- Lee, M. K., Milne, R. E., Ge, A. Z. ve Dean, D. H. 1992. Location of *Bombix mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (5): 3115-3121.
- Lee, M. K., Walters, F. S., Hart, H., Palekar, N. ve Chen, J. S. 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4648-4657.
- Lereclus, D., Bourgouin, C., Lecadet, M. M., Klier, A. ve Rapoport, G. 1989. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for parasporal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: *Regulation of procaryotic development: structural and functional analysis of bacterial sporulation and germination* (Smith, I., Slepecky, R. A. ve Setlow, P., Ed.), pp. 255-276, American Society for Microbiology, Washington, D.C., U.S.A.

- Lereclus, D., Delecluse, A. ve Lecadet, M. M., 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. In: *Bacillus thuringiensis: An Environmental Biopesticide: Theory and Practise* (Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J. ve Higgs, S., Ed.), pp. 37-70, John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- Lereclus, D., Lecadet, M. M., Ribier, J. ve Dedonder, R. 1982. Molecular Relationships among Plasmids of *Bacillus thuringiensis*: Conserved Sequences through 11 Crystalliferous Strains. *Molecular Genetics and Genomics*, 186: 391-398.
- Li, J., Koni, P. A. ve Ellar, D. J. 1996. Structure of the mosquitocidal d-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *Journal of Molecular Biology*, 257: 129–152.
- Li, J.D., Carroll, J. ve Ellar, D. J. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353 (6347): 815–821.
- Lightwood, D. J., Ellar, D. J. ve Jarrett, P. 2000. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5174-5181.
- Liu, Y. B. ve Tabashnik, B. E. 1997. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the Royal Society London B*, 264: 605-10.
- Lynch, M. J. ve Baumann, P. 1985. Immunological Comparisons of the Crystal Protein from Strains of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 46: 47-57.
- MacIntosh, S. C., Kishore, G. M., Perlak, F. J., Marrone, P. G. ve Stone, T. B. 1990. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 1145-1152.
- Mark, E.W. ve Byron, A. W. 2003. Bt: Mode of Action and Use. *Arch Insect Biochem Physiol*, 54: 200–211.

- Martin, P. A. W. ve Travers, R.S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (10): 2437-2442.
- Matsuyama, J., Yamamoto, K., Miwatani, T. ve Honda, T., 1995. Monoclonal antibody developed against a hemolysin of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology and Immunology*, 39: 619-622.
- Mc Gaughey, W. H., Whalon, M. E. 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, 258: 1451–1455.
- Merdan, B. A. ve Labib, I. 2003. Soil characteristics as factors governing the existence, recycling and persistence of *Bacillus thuringiensis* in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 33: 331-340.
- Mert Tatar, D. 2008. *Bacillus thuringiensis* Xd3'e Ait cry3Aa Geninin Klonlanması, Karakterizasyonu ve Ekspresyonu. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 60, Trabzon.
- Mignot, T., Denis, B., Couture-Tosi, E., Kolsto, A. B., Mock, M. ve Fouet, A. 2001. Distribution of S-layers on the surface of *Bacillus cereus* strains: phylogenetic origin and ecological pressure. *Environmental Microbiology*, 3: 493–501.
- Miyasono, M., Inagaki, S., Yamamoto, M., Ohba, K., Ishiguru, T., Takeda, R. ve Hayashi, Y. 1994. Enhancement of delta-endotoxin activity by toxin-free spores of *Bacillus thuringiensis* against diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63: 111-112.
- Narva, K. E., Payne, J. M., Schwab, G. E., Hickie, L. A., Galasan, T. ve Sick, A. J. 1991. Novel *Bacillus thuringiensis* Microbes Active against Nematodes, and Genes Encoding Novel Nematode-Active Toxins Cloned from *Bacillus thuringiensis* Isolates: European Patent Application EP0462 721A2. Munich, Germany, European Patent Office.
- Ogunijimi, A. A., Gbenle, G. O., Olukoya, D. K. ve Akinrimisi, E. O. 2000. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil samples in Nigeria. *Zeitschrift für Naturforschung*, 55: 987-990.

- Ohba, M. ve Aizawa, K. 1978. Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 32: 303-309.
- Ohba, M. Yu, Y. M. ve Aizawa, K. 1988. Occurrence of non- insecticidal *Bacillus thuringiensis* flagellar serotype 14 in the soil of Japan. *Systematic and Applied Microbiology*, 11: 85-89.
- Ohba, M., ve Aizawa, K. 1986. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47: 12-20.
- Ohba, M., Wasano, N. ve Mizuki, E. 2000. *Bacillus thuringiensis* soil populations naturally occurring in the Ryukyus, a subtropic region of Japan. *Microbiological Research*, 155: 17-22.
- Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Jounson, D. ve McGauhey, W. H. 1997. Proteinase mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 23473-23476.
- Öztürk, F. 2000. Malathion ve Gamma Radyasyonun Kıрма Biti (*Tribolium confusum* J. DU. VAL.)'nin Gelişim Evreleri Üzerine Etkileri. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 65, Kayseri.
- Park, H. W., Hayes, S. R., Mangum, C. M. 2008. Distribution of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* from sediment samples in Florida. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 11: 217-220.
- Patel, K. D., Bhanshali, F. C. ve Ingle, S. S. 2011. Diversity and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from alluvial soil of Mahi River Basin, India. *Journal of Advances in Developmental Research*, 2 (1): 14-20.
- Pigott, C. R. ve Ellar, D. J. 2007. Role of reseptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71: 255–281.
- Porcar, M. ve Juarez-Perez, V. 2003. PCR-Based Identification of *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Genes. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 419-432.

- Porcar, M., Martín, C. ve Caballero, P. 2000. Host range and gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains toxic towards *Spodoptera exigua*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97: 339-346.
- Promdonkoy, B. ve Ellar, D. J. 2005. Structure-function relationships of a membrane pore forming toxin revealed by reversion mutagenesis. *Molecular Membrane Biology*, 22: 327-337.
- Quesada-Morage, E., García-Tóvar, E., Valverde-García, P. ve Santiago-Álvarez, C. 2004. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain. *Microbiological Research*, 159: 59-71.
- Rajamohan, F. F., Alzate, O., Cotrill, J. A., Curtiss, A. ve Dean, D. H. 1996a. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 93 (25): 14338-14343.
- Rajamohan, F., Cotrill, J. A., Gould, F. ve Dean, D. H. 1996b. Role of domain II, loop2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (5): 2390-2396.
- Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S. ve Ravel, J. 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Review*, 29: 303-329.
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D. ve Crickmore, N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an important pathogen?. *Trends in Microbiology*, 18: 189-194.
- Reddy, A., Battisti, L. ve Thorne, C. B. 1987. Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. *Journal of Bacteriology*, 169: 5263-5270.
- Renganathan, K., Rathinam, X., Danial, M. ve Subramaniam, S. 2011. Quick isolation and characterization of novel *Bacillus thuringiensis* strains from mosquito breeding sites in Malaysia. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 23 (1): 17-26.

Riffard, S. 1998. Species Identification of *Legionella* Via Intergenic 16S-23S Ribosomal Spacer PCR Analysis. *International journal of systematic bacteriology*, 48: 723-730.

Saadaoui, I., Rouis, S. ve Jaoua, S. 2009. A new Tunisian strain of *Bacillus thuringiensis* krustaki having high insecticidal activity and δ -endotoxin. *Archives of Microbiology*, 191: 341-348.

Sadder, M. T., Khyami-Horani, H. ve Al-Banna, L. 2006. Application of RAPD technique to study polymorphism among *Bacillus thuringiensis* isolated from Jordan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 1307-1312.

Sambrook, L., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Sampson, M. N. ve Gooday, G. W. 1998. Involvement of citinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insect. *Microbiology*, 144: 2189- 2194.

Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A. ve Vijayan, M. 1996. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a *Moraceae* plant lectin with a β -prism fold. *Nature Structural Biology*, 3: 596–603.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. ve Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 775-806.

Schnepf, H. E. ve Whiteley, H. R. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 78: 2893-2897.

Schwartz, J. L., Potvin, L., Chen, X. C., Brousseau, R., Laprade, R. ve Dean, D. H. 1997. Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 10 (63): 3978-3984.

- Seifinejad, A., Salehi Jouzani, G. R., Hosseinzadeh, A. ve Abdmishani, C. 2008. Characterization of Lepidoptera-active *cry* and *vip* genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Biological Control*, 44 (2): 216-226.
- Sharif, F. A. ve Alaeddinoğlu, N. G. 1988. A Rapid and Simple Method for Staining of the Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Industrial Microbiology*, 3: 227-229.
- Shida, O., Takagi H., Kadowaki K., Yano H. ve Komagata K. 1996. Differentiation of species in the *Bacillus brevis* group and the *Bacillus aneurinolyticus* group based on the electrophoretic whole-cell protein pattern. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70 (1): 31-39.
- Shimizu, T. ve Morikawa, K. 1996. The beta-prism: a new folding motif. *Trends in Biochemical Sciences*, 21 (1): 3–6.
- Siegel, J. P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 13-21.
- Tabashnik, B. E., Gassmann, A. J., Crowder, D. W. ve Carriere, Y. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology*, 26: 199–202.
- Thammasittirong, A. ve Attathom, T. 2008. PCR-based method for the detection of *cry* genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98 (2): 121-126.
- Turnbull, P. C. B., Kramer, J. ve Melling, J. 1990. *Bacillus*. In: *Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity* (Topley, W. W. C. ve Wilson G. S., Ed.), pp. 188-210, vol. 2, 8th ed., Edward Arnold, London.
- Uawithya, P., Tuntitippawan, T., Katzenmeir, G., Panyim, S. ve Angsuthanasombat, C. 1998. Effects on larvicidal activity of single proline substitutions in alpha3 or alpha4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin. *Biochemistry Molecular Biology International*, 44 (4): 825-32.
- Uribe, D., Martinez, W. ve Ceron, J. 2003. Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82 (2): 119-127.

- URL-1 <http://www.uniprot.org/taxonomy/86661>
- URL-2 <http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/summary826.htm>
- URL-3 biyolojiegitim.yyu.edu.tr/k/endsm/index.htm
- URL-4 <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>
- URL-5 <https://www.landesbioscience.com/curie/chapter/4301/>
- URL-6 pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual, Promega <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf> web adresinden edinilmiştir.
- Vachon, V. Préfontaine, G., Coux, F., Rang, C., Marceau, L., Masson, L., Brousseau, R., Frutos, R., Schwartz, J. L., Laprade, R. 2002. Role of helix 3 in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry*, 41 (19): 6178-84.
- Vachon, V., Préfontaine, G., Rang, C., Coux, F., Juteau, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., Frutos, R., Laprade, R. ve Masson, L. 2004. Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (10): 6123-6130.
- Vaisiinen, O. M., Mwaishumo, N. J. ve Salkionja-Saonen, M. S. 1991. Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature, and fatty acid analysis. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 315-324.
- Van Frankenhuyzen, K. 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*, In: *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide, Theory and Practice* (Entwistle, P. F., J. Cory, Bailey, M. J. ve Higgs S., Ed.), pp. 1-35, John Wiley ve Sons, Chichester, UK.
- Van Rie, J. McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Barnett, B. D. ve Van Mellaert, H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 247 (4938): 72–74.

- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. ve Van Mellaert, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *European Journal of Biochemistry*, 186 (1-2): 239-247.
- Vilas-Bôas, G. T., Peruca, A. P. S. ve Arantes, O. M. N. 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 673-687.
- Waheed, I. B. ve Kogan, M. 2006. *Bacillus thuringiensis*-Based Biological Control of Insect Pests. Integrated Plant Protection Center (IPPC), Oregon State University, Corvallis.
- Walker, K., Mendelsohn, M., Matten, S., Alphin M. ve Ave, D. 2003. The Role of Microbial Bt Products in U.S. Crop Protection. In: *Bacillus thuringiensis: A Cornerstone of Modern Agriculture* (Metz, M., Ed.), pp. 31-51, Food Products Press, USA.
- Wang, J., Boets, A., Van Rie, J. ve Ren, G. 2003. Characterization of *cry1*, *cry2* and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82 (1): 63-71.
- WHO, 1999. *Microbial pest control agent-Bacillus thuringiensis*, *Environmental Health Criteria*, 217. Geneva: World Health Organization.
- Widner, W. R. ve Whiteley, H. R. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* possess different host range specificities. *Journal of Bacteriology*, 171: 965-974.
- Winder, W. R. ve Whiteley, H. R. 1990. Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 172 (6): 2826-2832.
- Wolfersberger, M. G., Hofmann, C. ve Luthy, P. 1986. Interaction of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larval midgut. *Zentralblatt für Bacteriologie, Microbiologie, Hyg. Abt. 1 Orig.*, 15: 237-238.

Wu, S. J. ve Dean, D. H. 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIII δ delta-endotoxin. *Journal of Molecular Biology*, 255 (4): 628-640.

Yasutake, K., Binh, N. D., Kagoshima, K., Uemori, A., Ohgushi, A., Maeda, M., Mizuki, E., Yu, Y. M. ve Ohba, M. 2006. Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 365-372.

Yılmaz, S. 2010. Çeşitli Habitatlardan İzole Edilen *Bacillus thuringiensis* Suşlarının Moleküler Karakterizasyonu ve Bazı Zararlı Böceklere Karşı Mücadelede Kullanımı. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi, pp. 161, Kayseri.

Yu, C. G., Mullins, M. A., Warren, G. W., Koziel, M. G. ve Estruch, J. J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 532-536.

Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Rose-Young, L. ve Bulla, L. A. Jr. 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R₁ expressed in insect cells. *Cell Death and Differentiation*, 12 (11): 1407–1416.

Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R. ve Bulla, L. A. Jr. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 103: 9897-9902.

EKLER

“T1” izolatına ait 16S rDNA'nın kısmi sekans dizisi

GGGGATGGACTCCTTATAGGGCGAAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCC
GGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTATTCTAGAGTTTGATCATGG
CTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAAT
GGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCT
AATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATGGTTCGGAATTGAAAGGCGGCTT
CGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAAGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
AGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTT
GAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCA
GAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATAT
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTG
AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGC
TGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTAATTCGAGGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGA
AAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGG
TGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC
ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAG
AGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTC
GGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
CGTCACACGGTACCATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCGCTGCAGGTTCG

ACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTA
TAGTTCACCTAAAAGGATATGCCC

“T2” izolatına ait 16S rDNA’nın kısmi sekans dizisi

GGGATGACTTCCTTATAGGGCGAAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCG
GCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATGGTACCGTGGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATT
ACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAC
GAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTG
TACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGA
TTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGA
GTGCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGG
GACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
CTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTAGAGG
ATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATG
CTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC
GGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTAACTTCAGCACTAAAG
GGCGGAAACCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTT
ACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGC
ATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTC
CCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGAC
TTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCT
TGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTT
CTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTTCTTC
CCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGT
TGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCC
GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCA
GGTCCGCTATGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCT
AATGTGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAATT
CCGAACCATGCAGTTCAAAATATTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTTCCCGG
AGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCG
CCGCTAACTTCTTGAGAGCAAGCTCTCAATCCATTCGCTCGACTTGCATG

TATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCATGATCACTCTAGAATA
ATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTC
CCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTTCACCTAAAAGGT
CTGCCCC

“T3” izolatına ait 16S rDNA’nın kısmi sekans dizisi

AGGGATGACTCGTTATAGGGCGAAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCC
GGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATCCTTGTACCGTGTGACGGGC
GGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCG
ATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCAAGTTGCAGCCTACAATCCGA
ACTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGACAGCTCT
TTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGA
TGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTT
AGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTG
CGGGACTTAACCCAACATTTCAAGACCCGAGCTGAGGACAACCATGCAC
CACCTGTCATTTTGGTCCCGAAGGAGAAGCCCTATTTCTAGGGTTTTAG
AGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCAC
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTT
GCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAA
AGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTA
CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAG
TTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTAC
GCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTC
TCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAG
ACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCCAATAATTCCGGATAACG
CTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCT
TTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTTCT
TCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGC
GTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC
CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCT
CAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAG
CTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAA
TTTCGAACCATGCAGTTCAAAATATTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCC

GGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTC
CGCCGCTAACTTCATAAGAGCAAGCTCTCAATCCATTCGCTCGACTTGCA
TGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAG
AATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTGCACCATATGGGAG
AGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGGTCACCTAA
AAGGCATGGCCC

“T4” izolatına ait 16S rDNA’nın kısmi sekans dizisi

GTGGTAACTCTATAGGGCGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCG
CCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTATTCTAGAGTTGATCATGGCTCAGG
ATGAACGCTGGCGGCGTGCCATAACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTG
AGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC
GGATAATATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTG
TCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
AGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTT
GAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAAA
TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGC
AGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATA
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACT
GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTG
CTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG
AAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAG

GTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT
CATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAA
GAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTTCTCAGTT
CGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC
GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
CCGTCACACGGTACATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCG
ACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTA
TAGTTCACCTAAAAAGCCACCCCA

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve Orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2007 yılında girdiği Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Temmuz 2011'da Biyoloji Bölüm 1'incisi, Fen-Edebiyat Fakültesi 3'ncüsü olarak mezun oldu. Aynı yıl girdiği Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans programında öğrenim görmeye devam etmektedir. Giresun Üniversitesi Eğitim Fakültesi'nde 2012-2013 eğitim-öğretim yılı "Öğretmenlik Pedagojik Formasyon Sertifikası" Programını tamamladı.