

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT *BACILLUS THURINGIENSIS* SUŞLARI İLE
BÜYÜK ÖLÇEKLİ İNSEKTİSİT ÜRETİMİ VE YERLİ
İZOLATLARIN SİVRİSİNEK LARVALARI ÜZERİNDEKİ
TOKSİK ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EYLÜL GÜVEN DALKÜREK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

EKİM 2025

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**REKOMBİNANT *BACILLUS THURINGIENSIS* SUŞLARI
İLE BÜYÜK ÖLÇEKLİ İNSEKTİSİT ÜRETİMİ VE
YERLİ İZOLATLARIN SİVRİSİNEK LARVALARI
ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

EYLÜL GÜVEN DALKÜREK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

EKİM 2025

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**LARGE-SCALE INSECTICIDAL PRODUCTION USING
RECOMBINANT *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS
AND EVALUATION OF THE TOXIC EFFECTS OF
LOCAL ISOLATES ON MOSQUITO LARVAE**

EYLÜL GÜVEN DALKÜREK

**A THESIS OF MASTER OF SCIENCE DEPARTMENT
OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

ADVISOR: PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

OCTOBER 2025

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 30/06/2025 tarih ve 2025/34 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/10/25 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Eylül GÜVEN DALKÜREK'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Handan EMİŞOĞLU KÜLAHLI

ÜYE

: Doç. Dr. Fatma İnci ÖZDEMİR

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR



*Aileme
ve
biricik eşime*

ÖZET

Bacillus thuringiensis israelensis (*Bti*), sivrisinek ve karasinek larvalarına karşı etkili, çevre dostu bir biyopestisit olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. *Bti*, hedef larvaların sindirim sistemini bozan *Cry* ve *Cyt* proteinlerinden oluşan parasporal kristaller üretir. Özellikle *Cry4A*, *Cry4B*, *Cry11A* ve *Cyt1A* proteinleri, *Diptera* türlerine karşı yüksek toksisite göstermektedir. Polifosfat (poliP), enerji depolama ve stres yanıtı gibi temel hücresel süreçlerde görev alan bir polimerdir ve polifosfat kinaz (PPK) enzimi tarafından sentezlenir. Laboratuvarımızda daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda, *ppk* genini yüksek düzeyde ifade eden *Bti pHT315ppk* suşu ve genin silinmesiyle elde edilen *Bti Appk* suşunun yaban suşa göre daha fazla δ -endotoksin ürettiği gözlenmiştir. Laboratuvarımızda oluşturulan bir diğer rekombinant suş olan *Bti pHT315lon*, hücresel homeostazın korunmasında görevli ve çeşitli fizyolojik süreçlerde rol alan önemli bir enzim olan Lon proteazı yüksek seviyede ifade etmektedir. Bu tez çalışmasında, rekombinant suşların δ -endotoksin üretim kapasitelerinin karşılaştırılması, yüksek üretici suşun seçilerek optimum koşulların belirlenmesi ve büyük ölçekli üretime geçiş için ön denemelerin yapılması amaçlanmıştır. Bunun yanında sivrisinek larvalarını öldürebilen potansiyel *Bacillus thuringiensis* suşlarının izole edilmesi de çalışmaya dahil edilmiştir. Rekombinant suşlar arasında en yüksek üretim kapasitesine sahip suş *Bti Appk* olarak belirlenmiş ve bu suşun δ -endotoksin üretimini artıran kültür koşulları DSM besiyerinde optimize edilmiştir. En yüksek üretimin 25 °C, pH 8.0 koşullarında ve ve nişasta içeren besiyerinde gerçekleştiği belirlenmiştir. Ayrıca, *Bti Appk* suşunun sadece yüksek düzeyde endotoksin üretmediği aynı zamanda yaban tipe kıyasla daha hızlı büyüdüğü ve daha yüksek sporlanma verimi gösterdiği saptanmıştır. 2. ve 3. evre *Culex pipiens* larvaları üzerinde gerçekleştirilen toksisite analizlerinde ise, *Bti Appk* suşu için LC_{50} değeri $5,9 \pm 2,0$ ng/ml ve LC_{90} değeri $45,8 \pm 22,8$ ng/ml olarak belirlenmiş ve rekombinant suşun yaban suşa göre daha yüksek larvasidal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Büyük ölçekli üretim, 2 L'lik fermentörde gerçekleştirilmiş, kristal protein veriminin laboratuvar ölçeğine göre düşük olduğu gözlemlendiğinden, gelecek çalışmalarda değişkenlerin fermentör ortamı için tekrar optimize edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Tez kapsamında ayrıca farklı ölü böcek örneklerinden 8 tane *Bacillus thuringiensis* benzeri suş izole edilmiş ve izolatların morfolojik, biyokimyasal ve toksikolojik özellikleri değerlendirilmiştir. *Culex pipiens* larvalarıyla yapılan biyoassay sonuçları, izolatların 5 tanesinin potansiyel biyoinsektisid adayı olduğunu göstermiştir. Toksisitesi yüksek doğal izolatların rekombinant suşlarla kombinasyonu yoluyla etkinliği artırılmış biyoinsektisid karışımların hazırlanması için ön verilerin toplandığı bu çalışma, *Bti* suşlarından etkili bir biyopestisit elde edilmesi için hem genetik çalışmaların hem de doğal izolatların önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, Polifosfat kinaz, Lon proteaz, Biyoinsektisit, Büyük ölçekli üretim

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis israelensis (*Bti*) is widely used as an environmentally friendly biopesticide effective against mosquito and housefly larvae. *Bti* produces parasporal crystals composed of Cry and Cyt proteins that disrupt the digestive system of target larvae. Among these, Cry4A, Cry4B, Cry11A, and Cyt1A proteins exhibit high toxicity against Dipteran species. Polyphosphate (polyP) is a polymer involved in fundamental cellular processes such as energy storage and stress response, and it is synthesized by the enzyme polyphosphate kinase (PPK). In our previous studies, the *Bti* pHT315*ppk* strain, which overexpresses the *ppk* gene, and the *Bti* Δ *ppk* strain, in which the gene was deleted, were observed to produce higher levels of δ -endotoxin compared to the wild type. Another recombinant strain constructed in our laboratory, *Bti* pHT315*lon*, expresses the Lon protease gene, an enzyme responsible for maintaining cellular homeostasis and involved in various physiological processes. This thesis aims to compare the δ -endotoxin production capacities of recombinant strains, select the high-crystal producing strain and determine the optimal conditions, and conduct preliminary trials for transition to large-scale production. Furthermore, the study incorporates the isolation of potential *Bacillus thuringiensis* strains, which have the capacity to kill mosquito larvae. Among the recombinant strains, *Bti* Δ *ppk* was identified as the highest δ -endotoxin producer, and the culture conditions enhancing toxin production were optimized in DSM medium. It has been determined that the highest production occurs at 25 °C, pH 8.0 conditions, and in a starch-containing medium. Furthermore, it was determined that the *Bti* Δ *ppk* strain not only produces elevated levels of endotoxin but also exhibits accelerated growth and higher sporulation yield in comparison to the wild type. Toxicity analyses performed on second and third-instar *Culex pipiens* larvae revealed LC₅₀ and LC₉₀ values of 5.9 ± 2.0 ng/ml and 45.8 ± 22.8 ng/ml, respectively, indicating that the recombinant strain had higher larvicidal activity than the wild type. Large scale production was carried out in a 2 L fermenter, and since the yield was lower compared to the laboratory scale, it was concluded that further optimization of the fermentation parameters is required for future studies. Within the scope of the thesis, 8 *Bacillus thuringiensis*-like strains were also isolated from different dead insect samples, and their morphological, biochemical, and toxicological characteristics were evaluated. Bioassay results conducted with *Culex pipiens* larvae showed that 5 isolates are potential bioinsecticide candidates. This study, which collected preliminary data for the preparation of bioinsecticide mixtures with enhanced efficacy through the combination of toxic natural isolates with recombinant strains, underscores the significance of both genetic studies and natural isolates for the effective biopesticide development from *Bti* strains.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Polyphosphate kinase, Lon protease, Bioinsecticide, Large scale production

TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu yolculukta bana rehberlik eden, sabrı ve bilgeliğiyle her zaman yanımda olan değerli danışmanım Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bilimsel vizyonu, akademik disiplini ve sonsuz sabrıyla bu süreçte bana yol gösteren Sayın Hocam'a en derin şükranlarımı sunarım. Kendisinden aldığım eğitim ve rehberlik, yalnızca bu tezle sınırlı kalmayacak, tüm akademik kariyerim boyunca ışık tutacaktır.

Aynı laboratuvarı paylaşmaktan mutluluk duyduğum ve her konuda desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Fatma İnci ÖZDEMİR'e şükranlarımı ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar arkadaşlarım Zeynep Begüm ÖZMAN, Gözde ŞÜKÜR ve Efe AKSOY ile gerçekleştirdiğimiz eğlenceli laboratuvar sohbetlerimiz ve mutluluk çılgınlıklarımız olmasa, bu tez bu kadar eğlenceli bir süreçte bitmezdi. Kim bilir kaç kez bu sefer kesin çıkacak dediğimiz deneyler bize oyun oynadı, çıkmaz dediklerimiz ise bizi şaşırttı. Tüm bu zorlu ve eğlenceli süreçte yanımda olduğunuz için size minnettarım.

Laboratuvarımızın değerli üyelerinden Araştırma Görevlisi Halil YILMAZ'a bilgi birikimini cömertçe paylaştığı için, Sude KARA ve Aslı BAYRAKTAR KAVALCI'ya ilk günlerimde gösterdikleri rehberlik için, ayrıca Nagihan GENEL, Emine YARADIR'a katkıları için içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu akademik yolculuğumda, başta annem Gülfizar Yaprak GÜVEN ve babam Ercan GÜVEN olmak üzere, her koşulda, her zaman yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz minnettarım. Eşimin ailesi Şenay DALKÜREK ve Osman DALKÜREK'e gösterdikleri şefkat ve destek için ayrıca içtenlikle teşekkürlerimi borç bilirim. Özellikle Osman babamın sivrisinek larvaları üzerinde yürütmüş olduğum deneysel çalışmalarına olan katkıları takdire şayandır. Her iki ailemin de her anlamda yanımda olduğunu görmek bana bu süreçteki en büyük motivasyon idi.

Hayat arkadaşım canım eşim Eren DALKÜREK'e, bu zorlu süreçte gösterdiği anlayış, sabır ve destek için kelimelerle ifade edemeyeceğim kadar minnettarım. Varlığı, tüm zorlukları aşmamda en büyük motivasyon kaynağım olmuştur.

Ayrıca, Gebze Enzim Tanıma Merkezi (GETM) bünyesinde bizlere fermentör kullanımı ve optimizasyonu konusunda değerli bilgi ve deneyimlerini paylaşarak büyük destek sağlayan Arş. Gör. Buse ÇALOĞLU'na ve bu sürece izin ve katkı sağlayan GETM Sorumlusu Prof. Dr. Barış BİNAY'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bu akademik çalışmanın gerçekleşmesinde doğrudan veya dolaylı katkısı olan tüm kişi ve kurumlara şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmayı gerçekleştirmeme olanak sağlayan 2023/1 dönemi bursiyeri olduğum TÜBİTAK BİDEB 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı'na ve değerli burs komitesi üyelerine en derin şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özeti, Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. BİYOLOJİK ZARARLI MÜCADELESİNDE <i>BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENSIS</i>	4
2.1. <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> 'in Tarihçesi	4
2.2. <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> ve δ -Endotoksin Proteinler	6
2.3. <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> 'in Yaşam Döngüsü ve Etki Mekanizması	9
2.4. <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (<i>Bti</i>) İzolasyonu	12
3. POLİFOSFAT KİNAZ	14
4. LON PROTEAZ	17
5. <i>BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENSIS</i> 'İN BİYOREAKTÖRDE BÜYÜK ÖLÇELİ δ -ENDOTOKSİN ÜRETİMİ	20
6. MATERYAL VE YÖNTEMLER	25
6.1. Kullanılan Materyaller	25
6.1.1. Cihazlar ve Ekipmanlar	25
6.1.2. Kimyasallar	27
6.1.3. Enzimler	28
6.1.4. Kitler ve Moleküler Belirteçler	29
6.1.5. Antibiyotikler	29
6.1.6. Besiyerleri	31
6.1.7. Çözeltiler ve Tamponlar	32
6.1.8. Mikroorganizmalar	35
6.1.9. Plazmidler	36
6.1.10. Primerler	37
6.2. Metot	38
6.2.1. <i>Bti</i> suşlarından Endotoksin İzolasyonu ve SDS-PAGE	38
6.2.2. Rekombinant Suşların Oluşturulması ve Doğrulanması	39
6.2.2.1. <i>E. coli</i> ET12567 Suşundan Plazmid İzolasyonu	39
6.2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi	40
6.2.2.3. Rekombinant Plazmidlerin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi	40
6.2.2.4. Rekombinant Plazmidlerin PCR ile Doğrulanması	41
6.2.2.5. Elektrokompentan Hücrelerin Hazırlanması ve Elektroporasyon	42
6.2.2.6. <i>Bti</i> Suşlarından Plazmid DNA İzolasyonu	43

6.2.2.7. <i>Bti</i> suşlarından Genomik DNA İzolasyonu	44
6.2.2.8. <i>Bti</i> Δppk Suşunun PCR ile Doğrulanması	45
6.2.3. <i>Bti</i> Δppk Suşunun Optimizasyon Çalışmaları	45
6.2.3.1. Büyüme Eğrisinin Oluşturulması ve Sporlanma Kapasitesinin Belirlenmesi	45
6.2.3.2. Farklı İnkübasyon Sürelerinin δ -Endotoksin Üretimine Etkisi	46
6.2.3.3. Farklı Sıcaklık ve pH Değerlerinin δ -Endotoksin Üretimine Etkisi	46
6.2.3.4. Farklı Karbon Kaynaklarının δ -Endotoksin Üretimine Etkisi	46
6.2.4. Sivrisinek Larvalarıyla Toksikite Çalışması	47
6.2.5. <i>Bti</i> suşlarının Fermentör Ölçeğinde Büyütülmesi	48
6.2.5.1. Gram Boyama	49
6.2.5.2. Spor Sayımı	49
6.2.5.3. Kristal Proteinlerin Coomassie Brilliant Blue ile Boyanması	49
6.2.6. Doğal Kaynaklardan <i>Bti</i> Benzeri Suşların İzolasyonu	50
6.2.6.1. Olası <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bt</i>) Türü Bakterilerin İzolasyonu	50
6.2.6.2. Koloni Morfolojisine Dayalı Ön Seçim	51
6.2.6.3. Gram Boyama	51
6.2.6.4. Spor Boyama	51
6.2.6.5. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi	52
6.2.6.6. Kristal İnküzyon Yapıların Coomassie Brilliant Blue ile Boyanması	52
6.2.6.7. SDS-PAGE Analizi	53
6.2.6.8. Biyolojik Aktivite Deneyleri	53
6.2.6.9. İzolatların Saklanması	53
7. SONUÇLAR	54
7.1. <i>Bti</i> pHT315ppk ve <i>Bti</i> pHT315lon Suşlarının Oluşturulması ve Doğrulanması	55
7.1.1. <i>E. coli</i> ET12567 Suşlarından Plazmid İzolasyonu ve Doğrulanması	55
7.1.2. Rekombinant Plazmidlerin <i>Bti</i> 'ye Aktarılması ve Doğrulanması	57
7.2. <i>Bti</i> Δppk Suşunun Doğrulanması	60
7.3. Doğruluğu Teyit Edilen Rekombinant Suşlardan Endotoksin İzolasyonu ve SDS-PAGE	61
7.3.1. <i>Bti</i> Δppk Suşunun DSM Besiyerindeki Büyüme Eğrisi ve Sporlanma Kapasitesi	63
7.3.2. <i>Bti</i> Δppk Suşunun Zamana Bağlı δ -Endotoksin Üretimi	64
7.3.3. <i>Bti</i> Δppk Suşunun Endotoksin Üretiminde Sıcaklığın Etkisi	66
7.3.4. <i>Bti</i> Δppk Suşunun Endotoksin Üretiminde pH'nın Etkisi	67
7.3.5. <i>Bti</i> Δppk Suşunun Endotoksin Üretiminde Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi	68
7.3.6. Optimum Koşullarda Endotoksin Üretimi	69
7.3.7. Biyolojik Aktivite Deneyleri	70

7.4. <i>Bti</i> suşlarının Fermentör Ölçeğinde Büyütülmesi	71
7.4.1. <i>Bti</i> Δ <i>ppk</i> Suşunun Fermentörde Büyütülmesi	72
7.4.2. <i>Bti</i> Δ <i>ppk</i> Suşunun Fermentörde Spor ve Canlı Hücre Sayımı	73
7.4.3. <i>Bti</i> Δ <i>ppk</i> Suşunun Fermentörde Kristal Protein Üretimi	75
7.5. Ölü Böceklerden Olası <i>Bt</i> Suşlarının İzolasyonu	77
7.5.1. Koloni Morfolojisine Dayalı Ön Seçim	78
7.5.2. Gram Boyama	78
7.5.3. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi	79
7.5.4. Spor Boyama	80
7.5.5. Kristal Proteinlerin Boyanması	81
7.5.6. SDS-PAGE Analizi	82
7.5.7. Biyolojik Aktivite Deneyleri	83
7.5.8. Olası <i>Bt</i> İzolatları İçin Genel Değerlendirme	83
8. TARTIŞMA	85
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	107
TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR	108

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

δ	: Delta
σ	: Sigma
Apr	: Apramisin
APS	: Amonyum Persülfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BamHI	: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H endonükleazı
Bç	: Baz çifti
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CaNO ₃	: Kalsiyum nitrat
DSM	: Difco Sporulasyon Medya
dk	: Dakika
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FeSO ₄	: Demir sülfat
kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum klorür
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum hidrojen fosfat
KH ₂ PO ₄	: Potasyum fosfat monobazik
KOAc	: Potasyum asetat
KpnI	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> endonükleaz I
HindIII	: <i>Haemophilus influenzae</i> endonükleaz III
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani
M	: Molar
mg	: Miligram
Mg ²⁺	: Magnezyum iyonu
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
MnCl ₂	: Mangan klorür
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
ng	: Nanogram
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1: (A) <i>Bti</i> 'nin sporlanan hücresi ve (B) bu türün bireysel toksin kapanımlarını ve toksin bileşimlerini gösteren tipik bir parasporal gövdesi.	8
Şekil 2.2: <i>Bacillus thuringiensis</i> tarafından üretilen δ -endotoksin proteinlerinin hedef organizma yelpazesi.	9
Şekil 2.3: <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in yaşam döngüsü.	9
Şekil 2.4: <i>Bt</i> hücresinde sporulasyon süreci sırasındaki morfolojik değişimler. <i>Bt</i> 'de sporlanmanın diyagramatik şeması.	10
Şekil 2.5: Cry toksinlerinin hedef organizmanın larva bağırsağındaki etki mekanizması.	11
Şekil 3.1: İnorganik polifosfat (PoliP).	14
Şekil 4.1: Lon proteaz alt ailelerinin şematik blok diyagramı.	18
Şekil 5.1: Pitched blade (A) ve Rushton tipi (B) karıştırıcılar.	22
Şekil 6.1: Bu çalışmada kullanılan moleküler belirteçler.	29
Şekil 6.2: pHT315 plazmidi haritası.	36
Şekil 6.3: BSA ile oluşturulan standart eğri grafiği.	39
Şekil 7.1: <i>Bti</i> suşlarına ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analiz sonuçları.	55
Şekil 7.2: <i>E. coli</i> ET12567 suşlarından izole edilen pHT315ppk ve pHT315lon plazmidlerinin doğrulanması.	56
Şekil 7.3: <i>E. coli</i> ET12567 hücrelerinden izole edilen rekombinant plazmidlerin kalıp olarak kullanıldığı, farklı primer setleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.	57
Şekil 7.4: <i>Bti</i> hücrelerinden elde edilen plazmidler ve bu plazmidlerin uygun restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucunda oluşan bant profillerine ait agaroz jel elektroforez görüntüleri.	58
Şekil 7.5: <i>Bti</i> hücrelerinden izole edilen rekombinant plazmidlerin şablon olarak kullanıldığı, farklı primer setleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.	59
Şekil 7.6: <i>Bti</i> yaban suş ve <i>Bti</i> Δ ppk mutant suştan izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.	60
Şekil 7.7: <i>Bti</i> Δ ppk suşunun PCR ile doğrulanması.	61
Şekil 7.8: <i>Bti</i> suşlarına ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analizi.	62
Şekil 7.9: <i>Bti</i> yaban suşu ve <i>Bti</i> Δ ppk suşunun DSM besiyerinde zamana bağlı büyüme eğrisi (OD ₆₀₀).	63
Şekil 7.10: <i>Bti</i> yaban suşu ve <i>Bti</i> Δ ppk mutantının 24., 48. ve 72. saatlerdeki spor yoğunluklarının logaritmik (log ₁₀ CFU/ml) karşılaştırması.	64
Şekil 7.11: DSM besiyerinde büyütülen <i>Bti</i> suşlarının farklı inkübasyon sürelerindeki δ -endotoksin üretimine ait SDS-PAGE analizleri.	65

Şekil 7.12:	Farklı sıcaklıklarda (25 °C, 30 °C ve 37 °C) DSM besiyerinde inkübe edilen <i>Bti</i> yaban suş ve <i>Bti Δppk</i> suşuna ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analizi.	67
Şekil 7.13:	Farklı pH koşullarına sahip DSM besiyerinde <i>Bti</i> yaban suş ve <i>Bti Δppk</i> suşuna ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analiz sonuçları.	68
Şekil 7.14:	Farklı karbon kaynakları içeren DSM besiyerinde <i>Bti</i> yaban suşu ve <i>Bti Δppk</i> suşuna ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analizi.	69
Şekil 7.15:	<i>Bti</i> yaban ve <i>Bti Δppk</i> suşlarının normal ve optimum koşullardaki δ-endotoksin üretimlerinin SDS-PAGE analizi.	70
Şekil 7.16:	<i>Bti Δppk</i> suşunun 0–72 saat arası 2 L biyoreaktör ve 500 ml Erlende büyüme eğrisi.	72
Şekil 7.17:	<i>Bti Δppk</i> suşunun DSM besiyerinde sporlanma kapasitesi.	74
Şekil 7.18:	Fermentör koşulları altında büyüyen <i>Bti Δppk</i> suşunun Gram boyama sonucunun 100X objektif kullanılarak ışık mikroskobu altındaki görüntüleri.	75
Şekil 7.19:	Fermentör koşullarında DSM besiyerinde büyütülen <i>Bti Δppk</i> suşunun kristal boyama sonuçları.	76
Şekil 7.20:	<i>Bti Δppk</i> suşunun 24, 48 ve 72. saatlerde Erlen ve biyoreaktör koşullarında üretilmiş protein profillerinin SDS-PAGE analizi.	76
Şekil 7.21:	Böcek örneklerinden izole edilen bakteri kültürlerinin antibiyotik içeren besiyerine ekiminden sonra elde edilen koloni görüntüleri.	77
Şekil 7.22:	A) İlk alt kültürleme sonuçlarına örnek olarak paylaşılan suşlar. B) Morfolojik olarak Bt'ye benzeyen 24 izolatın ikinci alt kültürleme sonuçlarına örnek olarak paylaşılan suşlar.	78
Şekil 7.23:	Gram pozitif, çubuk morfolojisine sahip olan bakterilerden bir tanesinin Gram boyama sonucu (İzolat #16).	79
Şekil 7.24:	İzolat #19'ın spor boyama sonucu. 100X objektif kullanılarak ışık mikroskobu altında gözlenen sporlar kırmızı çember içerisine alınmış, mavi ok ile gösterilmiştir.	80
Şekil 7.25:	DSM besiyerinde 72 saatlik inkübasyon sonrası oluşan spor-kristal yapılarının 100X objektif kullanılarak ışık mikroskobu altındaki görüntüleri.	81
Şekil 7.26:	DSM besiyerinde 72 saat büyütülen izolatlara ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analiz sonuçları.	83

TABLÖLAR/ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 6.1: Laboratuvarda kullanılan cihazlar ve teknik özellikleri.	25
Tablo 6.2: Tez kapsamında kullanılan kimyasallar, formülleri ve markaları.	27
Tablo 6.3: Kullanılan enzimler ve depolama koşulları.	28
Tablo 6.4: Antibiyotik özellikleri, konsantrasyonları ve hazırlanma yöntemi.	30
Tablo 6.5: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.	31
Tablo 6.6: Kullanılan solüsyonlar/çözeltiler.	32
Tablo 6.7: Kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri.	34
Tablo 6.8: Bu çalışmada kullanılan suşlar ve plazmidler.	35
Tablo 6.9: Bu çalışmada kullanılan plazmidler ve özellikleri.	35
Tablo 6.10: Kullanılan primerler ile ilgili bilgiler.	37
Tablo 6.11: Rekombinant plazmidlerin doğrulanması için kurulan PCR reaksiyonları.	41
Tablo 6.12: Rekombinant plazmidlerin doğrulanması için kurulan PCR döngü detayları.	42
Tablo 6.13: Elektroporasyon deneylerinde transformantların elde edildiği deney koşulları.	43
Tablo 6.14: DSM besiyerinde kullanılan farklı karbon kaynaklarına ait bilgiler.	47
Tablo 6.15: İzolasyon deneylerinde sporlanan bakterilerin seçimi için uygulanan ön işlem koşulları.	51
Tablo 7.1: PCR analizlerinde kullanılan pozitif kontroller.	57
Tablo 7.2: Elektroporasyon deneylerinde transformantların elde edildiği şartlar.	58
Tablo 7.3: <i>Bti</i> yaban suşun ve <i>Bti</i> Δppk suşlarının larva mortalitesi % ölüm oranları (Ortalama $\pm$ SD).	71
Tablo 7.4: <i>Bti</i> yaban suşun ve <i>Bti</i> Δppk suşlarının 2. saatteki LC ₅₀ ve LC ₉₀ sonuçları (Ortalama $\pm$ SD).	71
Tablo 7.5: Fermentör koşullarında büyüyen <i>Bti</i> Δppk suşunun canlı hücre sayımı sonuçları.	74
Tablo 7.6: Katı besiyeri üzerindeki koloni morfolojileri.	79
Tablo 7.7: Katalaz testi sonuçları.	80
Tablo 7.8: Spor boyama sonuçları.	80
Tablo 7.9: Kristal proteinlerin yapıları.	82

1. GİRİŞ

Günümüzde artan insektisit direnci, çevresel kirlilik ve insan sağlığına yönelik tehditler, kimyasal böcek ilaçlarının kullanımını tartışmalı hale getirmiştir. Bu sorunlara karşı biyolojik mücadele stratejileri ön plana çıkmakta olup, özellikle *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bu alanda en yaygın kullanılan mikrobiyal ajanlardan biri olarak dikkat çekmektedir. *Bt*, spor oluşturan, Gram pozitif bir bakteri olup, sporulasyon sürecinde Cry ve Cyt proteinleri içeren parasporal kristal yapılar sentezler. Bu proteinler, hedef böcek larvalarının orta bağırsağında çözünerek toksik etkilerini gösterir ve hücre zarını bozarak ölümcül etki oluşturur [Ben-Dov, 2014]. *Bt*'nin bir alt türü olan *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), özellikle sivrisinek larvalarına karşı yüksek toksisiteye sahip kristal proteinler üretir. Bu toksinlerin hedef dışı organizmalara zarar vermemesi, çevre dostu yapısı ve biyolojik çeşitliliğe katkısı nedeniyle *Bti* günümüzde entegre zararlı yönetim programlarının temel bileşenlerinden biri haline gelmiştir [Federici vd., 2010; Lacey, 2007].

Polifosfat metabolizması, bakteriyel fizyolojide enerji depolama, stres yanıtı, sporulasyon ve biyofilm oluşumu gibi birçok temel sürecin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır [Rao vd., 2009]. Polifosfat kinazlar (PPK), bu metabolizmanın anahtar enzimleri olup hücre içi polifosfat (poliP) sentezinden sorumludur. *ppk* geninin silinmesi veya aşırı ekspresyonu, bakterilerde spor oluşumu, biyofilm üretimi, antibiyotik toleransı ve virülens gibi önemli fenotipik değişimlere yol açabilmektedir [Shi vd., 2004]. Benzer şekilde, Lon proteazlar da hücre içi protein kalitesinin kontrolünden sorumlu, ATP'ye bağımlı serin proteazlardır. Bu enzimler, özellikle hatalı katlanmış proteinlerin yıkımı, stres yanıtı, DNA replikasyonu ve sporulasyon süreçlerinde görev alır [Gur, 2013]. *Bacillus* türlerinde Lon proteaz aktivitesindeki değişimlerin spor oluşumu, hücre hareketliliği ve toksin üretimi gibi fizyolojik süreçleri doğrudan etkilediği gösterilmiştir [Barkad vd., 2021].

Laboratuvarımızda daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda, *ppk* genini yüksek seviyede ifade eden *Bti* pHT315*ppk*, genomundan *ppk* geni silinmiş *Bti* Δ *ppk* ve *lon* genini yüksek seviyede ifade eden *Bti* pHT315*lon* suşlarının yaban suşa kıyasla δ -endotoksin üretim kapasitelerinin belirgin biçimde arttığı ve buna bağlı olarak daha yüksek toksisite sergiledikleri gösterilmiştir [Doruk vd., 2013; Barkad vd., 2021].

Özellikle *Bti* pHT315*ppk* suşunun *Culex pipiens* larvalarına karşı larvasidal aktivitesinin yaban tipe göre yaklaşık 7,8 kat, *Bti* Δ *ppk* suşunun ise yaklaşık 2,4 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir [Doruk vd., 2013]. Buna karşın, *Bti* pHT315*lon* suşunda *lon* geninin aşırı ekspresyonu δ -endotoksin üretimini artırsa da sporulasyon ve hareketlilik üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu gösterilmiştir [Barkad vd., 2021]. Bu çalışmada, rekombinant suşların (*Bti* pHT315*ppk*, *Bti* pHT315*lon*, *Bti* Δ *ppk*) δ -endotoksin üretim potansiyelleri, kontrol suşları (*Bti* yaban suş ve *Bti* pHT315) ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. En yüksek verimi sağlayan suş seçilerek, Erlend düzeyindeki δ -endotoksin üretim koşulları optimize edilmiş, ardından büyük ölçekli fermentör sistemlerinde üretim verimi değerlendirilmiştir. Tez kapsamında genetiği değiştirilmiş *Bti* suşlarıyla yapılan çalışmaların yanında, doğadan izole edilen farklı *Bt* benzeri suşlar da izole edilerek morfolojik, biyokimyasal ve toksikolojik özellikleri değerlendirilmiştir.

1.1. Literatür Özeti, Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Literatürde, *Bti* suşlarında *ppk* ve *lon* genlerinin δ -endotoksin üretimi üzerindeki etkilerine ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Laboratuvarımızda daha önce yürütülen çalışmalar, bu genlerin manipülasyonunun δ -endotoksin üretimini anlamlı düzeyde etkilediğini göstermiştir [Doruk vd., 2013; Barkad vd., 2021]. Özellikle *ppk* geninin aşırı ekspresyonunun δ -endotoksin üretimini ve larvasidal etkinliği artırdığı, buna karşılık bu genin silindiği *Bti* Δ *ppk* mutantının da yaban tipe kıyasla daha yüksek toksisite gösterdiği belirlenmiştir. *lon* geninin aşırı ekspresyonunun ise toksin üretimini artırmakla birlikte sporulasyon verimini azalttığı bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasının temel amacı, rekombinant *Bti* suşlarının (*Bti* pHT315*ppk*, *Bti* pHT315*lon*, *Bti* Δ *ppk*) δ -endotoksin üretim potansiyellerini karşılaştırmak, yüksek üretici suşun optimum koşullarını belirlemek ve bu verilerle büyük ölçekli fermentörde üretim gerçekleştirmektir. Bunun yanında, doğadan toksik etkisi güçlü *Bt* benzeri yeni suşların izole edilerek endüstriyel ölçekte kullanılabilecek alternatif biyoinsektisit kaynaklarının ortaya çıkarılması da çalışmanın hedefleri arasındadır. Bu çalışma, *Bti* suşlarında δ -endotoksin üretimini etkileyen faktörlerin anlaşılmasına katkı sağlamasının yanı sıra, biyoteknolojik üretim süreçlerinde kullanılabilecek yüksek verimli suşların izolasyonu ve geliştirilmesi açısından değer taşımaktadır. Aynı

zamanda toksisitesi yüksek *Bti* temelli biyoinsektisitlerin endüstriyel olarak üretilmesine yönelik bilimsel bir altyapı sunmaktadır.



2. BİYOLOJİK ZARARLI MÜCADELESİNDE *BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENSIS*

Vektörlerle taşınan hastalıklar, özellikle sivrisinek kaynaklı enfeksiyonlar, günümüzde küresel halk sağlığı için en büyük tehditlerden birini oluşturmaktadır. Dünya genelinde her yıl yüz milyonlarca insan, başta sıtma, dengue, chikungunya ve Zika virüsü olmak üzere sivrisineklerle bulaşan hastalıklarla karşı karşıya kalmaktadır [Kilpatrick ve Randolph, 2012]. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, yalnızca sıtma yılda yaklaşık 660.000 insanın ölümüne yol açmakta ve bu ölümlerin büyük kısmı Sahra Altı Afrika'daki çocuklar arasında görülmektedir [Ben-Dov, 2014].

Sivrisinek popülasyonlarının kontrol altına alınması, bu hastalıkların yayılımını önlemede kritik öneme sahiptir. 1950'lerden bu yana, bu amaçla yaygın biçimde kimyasal insektisitler kullanılmaktadır. Ancak bu maddelerin yaygın ve yoğun kullanımı, çevresel toksisite, insan sağlığına olumsuz etkiler ve hedef dışı organizmaların zarar görmesi gibi ciddi sorunlara yol açmıştır [Lee vd., 2018]. Dahası, sivrisinek türlerinde gelişen insektisit direnci, bu kimyasalların etkinliğini azaltmış ve alternatif mücadele yöntemlerine duyulan ihtiyacı artırmıştır [Weill vd., 2003].

Bu bağlamda, biyolojik mücadele yöntemleri çevre dostu ve etkili alternatifler olarak öne çıkmaktadır. Özellikle *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) tarafından üretilen toksinlerin kullanımı, hedef dışı canlılara zarar vermeyen, direnç gelişimini yavaşlatan ve çevresel olarak sürdürülebilir bir yaklaşım sunmaktadır [Lacey, 2007; Federici vd., 2010]. Bu çalışmada, *Bti*'nin biyopestisit olarak önemini, etki mekanizmasını, üretim yöntemlerini ve biyolojik mücadeledeki potansiyelini detaylı bir şekilde ele alarak, kimyasal insektisitlerin yarattığı problemlere sürdürülebilir bir çözüm önerisi sunmak hedeflenmiştir.

2.1. *Bacillus thuringiensis israelensis*'in Tarihçesi

Bacillus thuringiensis (*Bt*), entomopatojenik özellikleri nedeniyle biyolojik mücadelede uzun süredir kullanılan Gram pozitif, spor oluşturan bir bakteridir. *Bt*, ilk kez 1901 yılında Japon bilim insanı Shigetane Ishiwatari tarafından ipek böceklerinde görülen sotto hastalığının etkeni olarak izole edilmiştir. Bu nedenle başlangıçta

“*Bacillus sotto*” olarak adlandırılmıştır [Shigetane, 1901]. Bu keşiften yaklaşık on yıl sonra, 1911 yılında Alman araştırmacı Ernst Berliner, Almanya'nın Thuringia bölgesinde *Ephestia kuehniella* (Akdeniz un güvesi) larvalarından izole ettiği benzer bir bakteri türünü tanımlamış ve bu mikroorganizmaya bölgenin ismine atıfla *Bacillus thuringiensis* adını vermiştir [Berliner, 1911]. Berliner, 1915 yılında yayınladığı çalışmasında bakterinin yalnızca endospor değil, aynı zamanda çeşitli kristalin inklüzyonlar da içerdiğini göstermiştir [Berliner, 1915]. *Bt* kristallerinin varlığı daha sonra Mattes tarafından 1927’de doğrulanmış ancak bu yapıların insektisidal etkisi ancak 1950’li yıllarda net olarak anlaşılabilmiştir [Mattes, 1927]. 1953 yılında Thomas Angus, bu kristallerin insektisidal aktiviteye sahip olduğunu deneysel olarak göstermiş, [Angus, 1953] aynı yıl Hannay, kristallerin aerobik spor oluşturan bakterilerde kristalin yapıda olduğunu tanımlamıştır [Hannay, 1953]. 1955 yılında ise Hannay ve Fitz-James bu kristallerin protein yapısında olduğunu ortaya koymuştur [Hannay ve Fitz-James, 1955].

Bt’nin sahadaki ilk biyolojik kullanımı 1920’li yıllarda başlamış, böylece tarımsal zararlılara karşı mikrobiyal mücadelenin temelleri atılmıştır. İlk uygulama Macaristan’da yapılmış, ardından 1930’larda Yugoslavya’da mısır kurdu mücadelesinde kullanılmıştır [Husz, 1928; Vouk ve Klas, 1931]. İlk ticari *Bt* ürünü olan Sporeine ise, un güveleri ile mücadele amacıyla 1938 yılında Fransa’da Laboratoire Libec tarafından geliştirilmiştir [Aronson vd., 1986].

1950’li yıllara gelindiğinde kimyasal pestisitlerin yaygın kullanımıyla *Bt*’ye olan ilgi azalsa da, bu pestisitlerin çevresel zararları ve direnç gelişimi nedeniyle biyolojik mücadeleye olan ilgi yeniden artmıştır [Margalith ve Ben-Dov, 2000]. ABD’de ise ilk *Bt* ürünü 1958 yılında piyasaya sürülmüş ve Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından biyo-insektisit olarak onaylanmıştır [Hannay ve Fitz-James, 1955].

1970’lerin başında ise, Dipteran türlere (sivrisinekler, karasinekler vb.) özgü toksinler üreten ilk *Bt* alt türü olan *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), 1976 yılında Goldberg ve Margalit tarafından İsrail’de ölü *Culex pipiens* larvalarından izole edilmiştir [Margalit ve Dean, 1985]. Bu keşif, özellikle sivrisinek kaynaklı hastalıkların biyolojik kontrolünde çığır açıcı bir gelişme olmuştur. *Bti*, özellikle larval evredeki sivrisineklere karşı yüksek özgüllük ve etkinlik gösterdiği, ayrıca hedef dışı organizmalara minimal zarar verdiği için entegre vektör kontrol programlarının temel biyopestisit bileşenlerinden biri haline gelmiştir [Fillinger ve Lindsay, 2006].

Bti'nin sahadaki ilk uygulamaları, 1980'li yılların başında İsrail, ABD ve Almanya'da yürütülen sivrisinek kontrol projeleri ile başlamıştır. Bu süreçte özellikle *Culex*, *Aedes* ve *Anopheles* cinsine ait sivrisinek larvalarının yoğun bulunduğu bataklık, sulak alan ve durgun su habitatlarında geniş çaplı *Bti* uygulamaları gerçekleştirilmiştir. ABD'nin Florida eyaletinde 1982 yılında yürütülen bir çalışmada, *Bti*'nin kimyasal larvasitlere çevre dostu bir alternatif olarak kullanılabileceği ve halk sağlığı stratejilerine entegre edilebileceği gösterilmiştir [Lacey, 2007].

Aynı dönemlerde, *Bti* dahil olmak üzere *Bt* alt türlerinin toksin üretiminden sorumlu *cry* genlerinin plazmidler üzerinde taşındığı keşfedilmiş, bu genler klonlanarak genetik mühendislikte kullanılmaya başlanmıştır [Schnepf ve Whiteley, 1981; Gonzalez vd., 1982]. Bu moleküler gelişmelerin bir sonucu olarak, 1996 yılında *Bt* pamuk gibi genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) ticarileşmiş ve biyopestisit temelli modern tarım uygulamaları hız kazanmıştır [Shelton vd., 2002].

İlerleyen yıllarda, *Bti* içeren formülasyonlar Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından da desteklenerek, sıtma ve dang humması gibi vektör kaynaklı hastalıkların kontrolünde birçok gelişmekte olan ülkede yaygın biçimde kullanılmaya başlanmıştır. Ancak *Bti*'nin doğada kalıcılığının sınırlı olması, etkinliğini sürdürebilmek adına tekrarlayan uygulamaları zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle 1990'lı yıllardan itibaren, kontrollü salınım sağlayan granül, pelet ve sıvı süspansiyon gibi çeşitli *Bti* biyopreparatları geliştirilmiştir [Becker, 2000].

Sonuç olarak, günümüzde *Bti*, Dünya Sağlık Örgütü başta olmak üzere pek çok sağlık otoritesi tarafından onaylanmış, entegre vektör yönetimi programlarının vazgeçilmez bir bileşeni haline gelmiştir [Lacey, 2007; Becker, 2000].

2.2. *Bacillus thuringiensis israelensis* ve δ -Endotoksin Proteinler

Bacillus thuringiensis (*Bt*), spor oluşturan ve kristal protein sentezleyen bir bakteri olup, filogenetik olarak *B. cereus*, *B. anthracis* ve *B. mycoides* türleriyle yakın akrabalık gösterir [Höfte ve Whiteley, 1989]. Ancak bu türler arasında genetik ayrım yapmak güçtür. 16S rRNA ve diğer gen bölgelerine yönelik yapılan analizler yalnızca birkaç nükleotidlik fark göstermiştir [Ash vd., 1991]. Chen ve Tsen (2002) de 16S rDNA ve *gyrB* genlerini inceleyerek, *Bt* ile *B. cereus*'un güvenilir biçimde

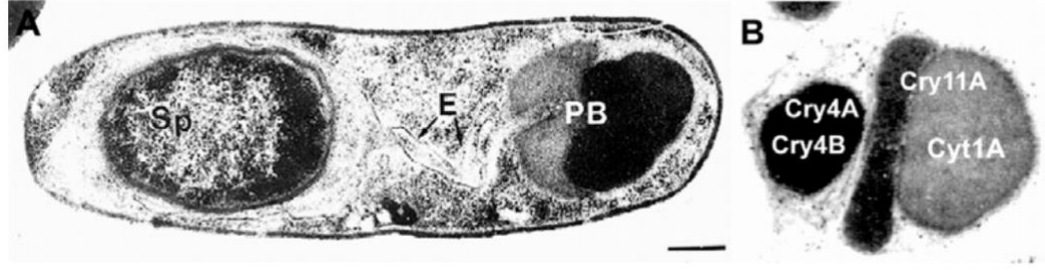
ayrılmasının zor olduğunu, bu ayırmada en güvenilir kriterin parasporal kristal proteinler veya *cry* genleri olduğunu belirtmiştir [Chen ve Tsen, 2002].

Bt tarafından sentezlenen kristal proteinler *Bt*'nin sınıflandırılmasında entomopatojenik etkinliğin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. İlk sistematik adlandırma, 1989 yılında Höfte ve Whiteley tarafından geliştirilmiş ve kristal proteinler hedef organizma gruplarına göre CryI (Lepidoptera), CryII (Lepidoptera ve Diptera), CryIII (Coleoptera) ve CryIV (Diptera) olmak üzere dört ana gruba ayrılmıştır [Höfte ve Whiteley, 1989]. Ancak bu sınıflama proteinler arasındaki genetik benzerlikleri yeterince yansıtmadığı için 1998 yılında Crickmore ve arkadaşları tarafından amino asit dizilimine dayalı dört seviyeli (örneğin: Cry4Aa, Cry4Ab) bir sistem önerilmiştir [Crickmore vd., 1998]. 2020'den beri Cry, Cyt ve Vip proteinleri dışında benzer toksinler üreten diğer türler de bu veri tabanına dahil edilmiştir [Crickmore vd., 2020].

Literatürde Cry ve Cyt proteinlerinin büyük bölümü δ -endotoksinler olarak sınıflandırılmaktadır. Bu toksinler, sporulasyon sırasında ana hücre içerisinde sentezlenerek kristal yapı halinde sporların yanında birikir. Larvalar tarafından yutulduğunda, bu yapılar sindirim sisteminde çözünerek aktif hale gelir ve hedef organizmanın bağırsak epitelinde bulunan özgül reseptörlere bağlanarak toksik etki oluşturur. Endotoksin terimi, toksinin bakteri dışına salınmaksızın etki göstermesi anlamına gelirken, “ δ ” öneki bu toksin sınıfının tanımlanmasında ayırt edici bir özellik olarak kullanılmaktadır [Bravo vd., 2007; Palma vd., 2014].

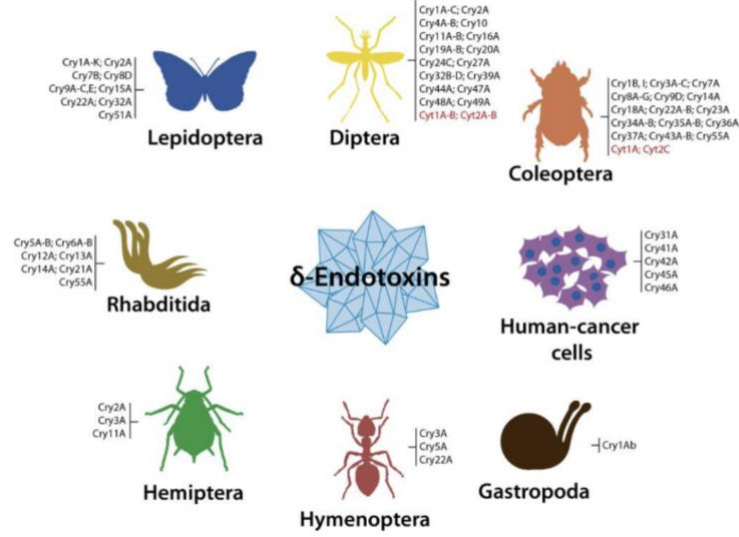
Bu tez kapsamında kullanılan *Bti* ATCC 35646 suşu, *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* ve *cyt2* genlerini taşımakta ve sırasıyla Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa ve Cyt2Ba gibi proteinleri kodlamaktadır [Ejiofor ve Johnson, 2002].

Bu proteinlerin tamamı (Şekil 2.1), özellikle Diptera takımı üyeleri olan sivrisinek, tatarcık ve karasinek larvalarında yüksek larvasit etki göstermektedir. Cry4Aa ve Cry4Ba proteinleri, hedef organizmanın bağırsak hücrelerinde özgül reseptörlere bağlanarak hücre zarında por oluşumuna neden olurken, Cry10Aa ve Cry11Aa sinerjik etki göstererek bu toksisitenin artmasına katkıda bulunur [Laurence vd., 2011; Palma vd., 2014].



Şekil 2.1: (A) *Bti*'nin sporlanan hücresi ve (B) bu türün bireysel toksin kapanımlarını ve toksin bileşimlerini gösteren tipik bir parasporal gövdesi. Sp, spor; E, ekzosporium; PB, parasporal gövde [Federici vd., 2003].

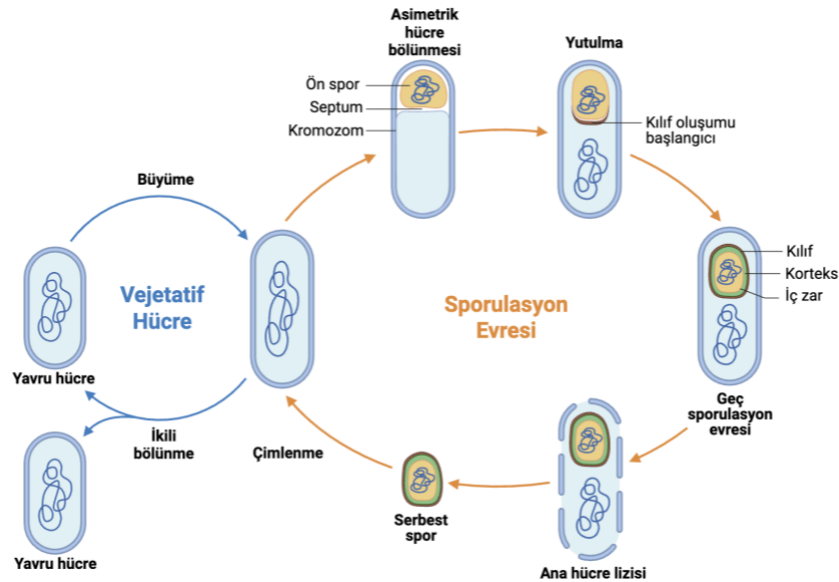
Her Cry proteini belirli bir böcek grubuna özgü toksisite göstermektedir (Şekil 2.2). Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa ve Cry11Aa gibi proteinler özellikle Diptera üzerinde etkilidir. Cyt proteinleri de genellikle Diptera ve Coleoptera'ya karşı etkilidir. Bu proteinlerin biyolojik etkinlik düzeyi, hem hedef organizmadaki özgül reseptörlerin varlığına hem de proteinlerin yapısal özelliklerine bağlı olarak şekillenmektedir [Palma vd., 2014]. Cyt1A proteini, amino asit dizisi ve toksikolojik özellikleri bakımından Cry proteinlerinden belirgin şekilde farklıdır. Çok sayıda çalışma, *Bti*'nin yüksek toksisitesinin Cry proteinleri arasındaki ve özellikle Cyt1A ile Cry proteinleri arasındaki sinerjik etkileşimlerden kaynaklandığını göstermiştir [Wu ve Chang, 1985; Ibarra ve Federici, 1986; Crickmore vd., 1995; Wirth vd., 2000]. Daha da önemlisi, Cyt1A'nın sivrisineklerde Cry proteinlerine karşı direnç gelişimini geciktirebileceğini ve geliştiğinde bu direnci ortadan kaldırabileceğini göstermektedir [Georghiou ve Wirth, 1997]. Örneğin, laboratuvar koşullarında *Culex quinquefasciatus* popülasyonlarında Cry11A'ya karşı >900 kat direnç gözlenirken, Cry11A'nın Cyt1A ile 3:1 oranında kombinasyonu bu direnci tamamen ortadan kaldırmıştır [Wirth vd., 1997].



Şekil 2.2: *Bacillus thuringiensis* tarafından üretilen δ -endotoksin proteinlerinin hedef organizma yelpazesi [Palma vd., 2014].

2.3. *Bacillus thuringiensis israelensis*'in Yaşam Döngüsü ve Etki Mekanizması

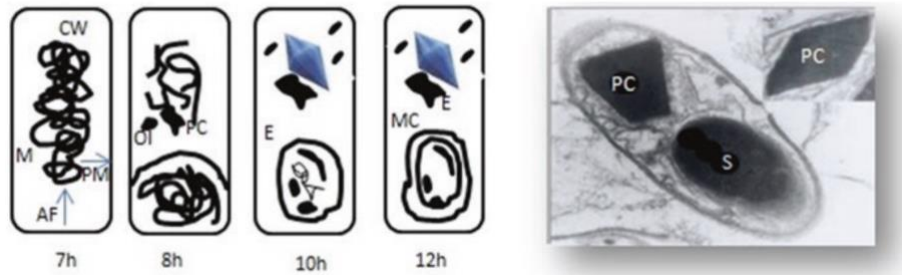
Bti'nin yaşam döngüsü çevresel koşullara bağlı olarak iki temel evrede ilerler: Vejetatif büyüme ve sporulasyon (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: *Bacillus thuringiensis*'in yaşam döngüsü (Aguirre-Zapata vd., 2020'den uyarlanarak, Eylül Güven Dalkürek tarafından BioRender'da oluşturulmuştur).

Vejetatif fazda hücreler, uygun çevresel koşulların sağlandığı ve besin açısından zengin ortamlarda hızlıca çoğalarak biyokütle artışı gösterir. Bu dönemde bakteriler, temel metabolik aktivitelerini sürdürür ve toksin üretimi gerçekleşmez. Bu faz, bakterinin hızlı büyüme ve enerji üretimi açısından avantajlı olduğu dönemdir. Besinlerin tükenmesi veya çevresel stres koşullarının başlamasıyla birlikte sporulasyon süreci tetiklenir [Bravo vd., 2007].

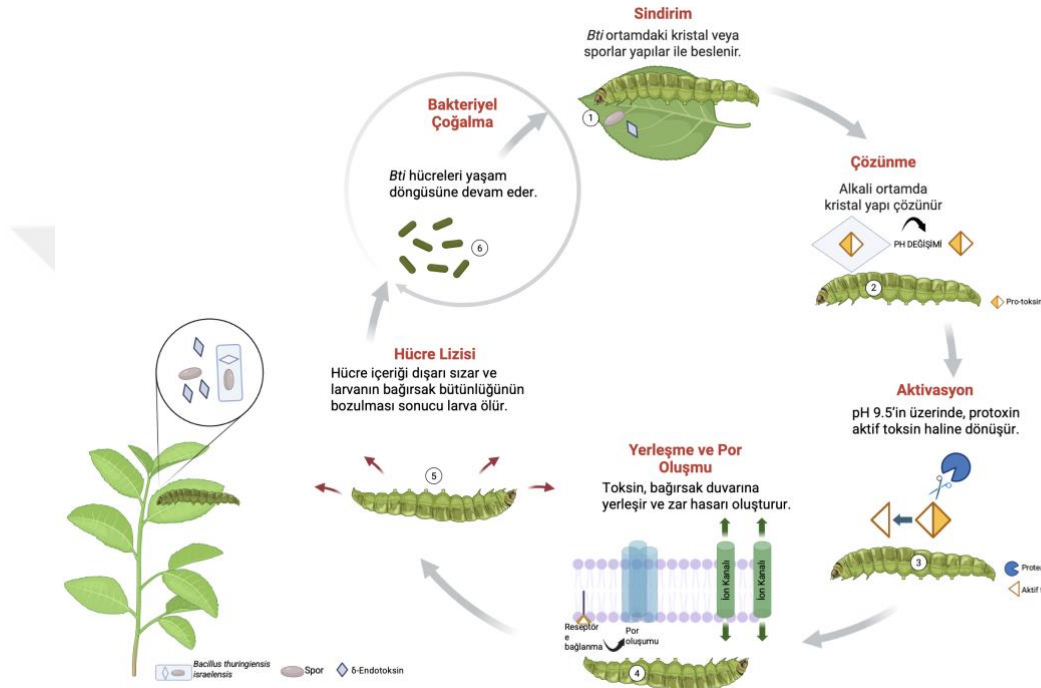
Sporulasyon, kristal protein biyosentezinin eş zamanlı gerçekleştiği oldukça özelleşmiş bir evredir. Bu süreçte polar bölünmeyle öncül spor (forespore) ve ana hücre (mother cell) oluşur. Ardışık olarak aktive olan sigma faktörleri (σ^F , σ^E , σ^G , σ^K), hem sporun yapısal gelişimini hem de Cry ve Cyt proteinlerinin genetik ekspresyonunu düzenler. Özellikle σ^E ve σ^K , kristal proteinlerin sentezinde kritik rol oynar [Deng vd., 2014; Sonenshein, 1989]. Bu moleküler düzenleme, kristal protein sentezinin zamanlamasını spor oluşumu ile senkronize ederek bakterinin hayatta kalma ve patojenitesini optimize eder. Sporlaşma süreci boyunca *Bt* hücreleri farklı morfolojik evrelerden geçer (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: *Bt* hücresinde sporulasyon süreci sırasındaki morfolojik değişimler. *Bt*'de sporlanmanın diyagramatik şeması. M: mezosom, CW: hücre duvarı, PM: plazma zarı, AF: aksenel filaman, OI: oval inklüzyon, PC: iki piramit şeklinde parasporal kristal, E: ekzosporiyum, S: spor [Bulla vd., 1980; Rabinovitch vd., 2017].

Kristal protein sentezi bu süreçte spor oluşumu ile eş zamanlıdır ve lizis sonrası kristaller sporla birlikte çevreye salınır. Sporogenez sırasında biriken parakristal yapılar hedef organizmalar için öldürücü etki gösterir. Bu kristallerin büyük çoğunluğu Cry ve Cyt proteinlerinden oluşur. Dolayısıyla sporulasyon süreci yalnızca bakterinin hayatta kalması için değil, aynı zamanda entomopatojenik toksinlerin sentezi için de kritik öneme sahiptir [Stragier ve Losick, 1996].

Bu noktadan sonra, spor ve kristal yapının biyolojik rolü devreye girer. *Bti* suşlarının entomopatojenik etkisi, sporogenez sırasında sentezlenen δ -endotoksinlerin hedef organizmalar tarafından yutulmasıyla başlar. Spor ve kristallerin birlikte çevreye salınması, hedef organizmalar tarafından alındığında toksik süreci tetikler. Cry proteinlerinin etki mekanizması, oldukça özgül ve çok aşamalı bir biyokimyasal süreçtir (Şekil 2.5) [Palma vd., 2014].



Şekil 2.5: Cry toksinlerinin hedef organizmanın larva bağırsağındaki etki mekanizması (Bravo vd., 2007'den uyarlanarak Eylül Güven Dalkürek tarafından BioRender'da oluşturulmuştur).

Larvalar bu toksinleri yuttuğunda kristal yapılar, alkali pH'a sahip orta bağırsakta çözünür hale gelir. Bu çözünme süreci, protoxinleri aktif toksin formlarına dönüştüren orta bağırsak proteazları tarafından gerçekleştirilir [Bravo vd., 2011]. Aktive edilen Cry toksinleri, larva bağırsağındaki özgül reseptörlere bağlanır [de Maagd vd., 2001]. Reseptörlere bağlanan toksinler, oligomerizasyon süreciyle birleşerek çok alt birimden oluşan yapılar haline gelir ve ardından epitel hücre zarına gömülerek por oluşturur [Soberón vd., 2009]. Bu porlar hücre içi iyon dengesini bozar, su girişine bağlı hücre şişmesi ve lizisle sonuçlanır [Bravo vd., 2011].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, Cry toksinlerinin klasik por oluşum modelinin ötesinde farklı hücresel hedefleri etkileyebileceğini, alternatif sinyal yollarını

bozabileceğini ve apoptoz mekanizmalarını tetikleyebileceğini göstermektedir [Vachon vd., 2012]. Ayrıca bazı Cry toksinlerinin oligomerleşme olmaksızın da por oluşturabileceği öne sürülmektedir [Soberón vd., 2009]. Böylece Cry toksinlerinin etki mekanizmasının tek bir modele indirgenemeyecek kadar karmaşık bir biyolojik süreç olduğu anlaşılmaktadır.

2.4. *Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)* İzolasyonu

Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin neden olduğu zararları azaltmak amacıyla, bu böceklerle karşı etkili olan doğal düşmanların kullanılması şeklinde tanımlanabilir. “Doğal düşman” ifadesi parazitler, avcı türler (predatörler) ve hastalık etkeni mikroorganizmaları kapsamaktadır. Ancak, hastalık oluşturan mikroorganizmaların kullanımı özel olarak mikrobiyal mücadele olarak adlandırılır [Peter, 1984]. Mikrobiyal mücadelede yer alan bakteriler, zararlı böceklerin popülasyonlarını baskılayabildikleri için tarımsal zararlılarla savaşta önemli bir yere sahiptir. *Bti*, bu biyolojik mücadelede özellikle sivrisinek ve kara sinek larvalarına karşı yüksek etkinlik gösteren spor oluşturan bir bakteridir [Lacey, 2007]. Bu bakterinin doğal ortamlardan izole edilerek laboratuvar koşullarında çoğaltılması, biyoinsektisidal ürünlerin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. *Bti* izolasyonu genellikle toprak, su birikintileri, kompost materyalleri ve larva yoğunluğu yüksek alanlardan alınan örneklerle gerçekleştirilir. Uygun besiyerlerinde yapılan inkübasyon sonucunda elde edilen koloniler, mikroskopik ve biyokimyasal analizlerle tanımlanarak saflaştırılır. Bu süreç, hem doğal suşların etkinliğinin test edilmesini hem de yeni, potansiyel olarak daha etkili *Bti* varyantlarının elde edilmesini mümkün kılar [Santana vd., 2008].

Bti suşlarının izolasyonu amacıyla yapılan çalışmalarda, çevresel örneklerin doğru alanlardan ve uygun tekniklerle toplanması büyük önem taşımaktadır. Özellikle toprak [Santana vd., 2008; Al-Obaidy, 2014; Al Bouq, 2010], ölü veya canlı böcekler [Katı vd., 2017; Eski vd., 2018; Sezen vd., 2010; Dadaşoğlu ve Dadaşoğlu, 2016], çiçekler [García-Suárez, 2021], çürümeye başlayan yapraklar [Tilquin vd., 2008], bataklık alanlar [Maeda vd., 2001], larva yoğunluğu yüksek doğal ortamlar gibi habitatlar [Tilquin vd., 2008] *Bti* açısından zengin kaynaklar olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, örnek alınan bölgelerin ekolojik özelliklerinin kayıt altına alınması, izole edilen

suşların çevresel bağlamda değerlendirilmesini mümkün kılar [Katı vd., 2017; Bozlağan vd., 2010; Zothansanga vd., 2016].

Toplanan çevresel örneklerden *Bti* suşlarının seçilmesi için çeşitli ön işleme ve seleksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu süreç genellikle örneklerin 80 °C'de kısa süreli ısıtılma işlemine tabi tutulması ile başlamaktadır böylece ısıya dayanıklı spor formundaki bakteriler seçilerek diğer mikroorganizmaların büyümesi engellenir [Lancini ve Lorenzetti, 1993]. Ardından uygun besiyerlerine (örneğin Nutrient Agar, LB agar veya T3 agar) ekim yapılır ve kolonilerin morfolojik özellikleri incelenir. Koloni morfolojisine göre şüpheli *Bt* suşları belirlenir ve spor ile kristal yapı oluşumu mikroskopik olarak değerlendirilir. Literatürde, izole edilen *Bt* suşlarının koloni morfolojilerinin beyaz ya da krem renkli, yuvarlak ve farklı kenar yapılarında olabileceği belirtilmektedir [Çetinkaya, 2002; El-kersh vd., 2011; Kaviyapriya vd., 2019; Navya vd., 2022]. Ayrıca, bu bakterilerin sporlanma sırasında oluşturduğu kristal yapıların da şekil bakımından çeşitlilik gösterdiği ve bu morfolojik özelliklerin toksisite ile ilişkili olabileceği ifade edilmektedir [Çetinkaya, 2002]. Bu bağlamda, *Bti* izolasyon çalışmaları sadece mikrobiyal tanımlama açısından değil, aynı zamanda biyolojik etkinliğin öngörülmesi bakımından da önem taşımaktadır [Santana vd., 2008].

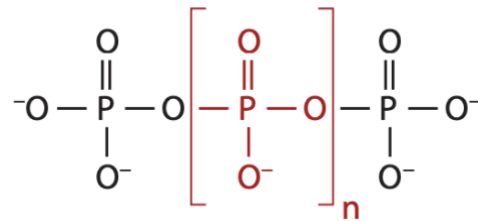
Bti suşlarının biyoinsektisidal potansiyelinin belirlenmesi, yalnızca morfolojik ya da moleküler tanımlamalarla sınırlı değildir. Bu suşların hedef canlılar üzerindeki etkilerinin doğrudan test edilmesi de gereklidir [Lacey, 2007]. Bu amaçla, çeşitli böcek larvaları üzerinde toksisite testleri yapılır [El-Kersh vd., 2011; Katı vd., 2017, García-Suárez, 2021; Bozlağan vd., 2010]. Laboratuvar koşullarında yapılan bu biyolojik etkinlik testleri, izolatların kullanım potansiyelini değerlendirme açısından önemli bir ölçüt sunar. Bazı suşlar kristal yapı üretmesine rağmen biyolojik aktivite göstermeyebilir. Bu nedenle biyolojik testler izolasyon sürecinin tamamlayıcı bir parçasıdır [Ammounh vd., 2011].

Sonuç olarak, *Bti* suşlarının doğadan izolasyonu sürecinde izole edilen suşların hem fenotipik özelliklerinin hem de biyoinsektisidal potansiyellerinin ortaya konması, çevreye duyarlı biyolojik mücadele stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır [de Barjac, 1990]. Bu bağlamda, çalışmada kullanılan izolasyon ve değerlendirme adımları, potansiyel olarak etkin ve yerel *Bti* suşlarının belirlenmesini hedeflemiştir.

3. POLİFOSFAT KİNAZ

İnorganik fosfat (Pi), hem toprak hem de sucul ekosistemlerde bulunan temel bir besin elementidir ve bakteriyel büyüme ile metabolizmanın sürdürülebilirliği için kritik öneme sahiptir [Rao vd., 2009]. Yapılan çalışmalar, Pi'nin tükenmesinin *Bacillus subtilis*'te çevredeki Pi konsantrasyonunu algılayan sensör kinaz PhoR ve yanıt düzenleyici PhoP'den oluşan PhoPR iki bileşenli sistemini aktive ettiğini, bunun sonucunda fosfat açlığı regulonunun indüklendiğini ve durağan faza geçişte çok sayıda genin ekspresyon profilinin değiştiğini göstermiştir [Liu ve Hulett, 1997; Allenby vd., 2005].

Hücre içinde fosfat genellikle inorganik polifosfat (poliP) formunda depolanır. PoliP, yüksek enerjili bağlarla birbirine bağlanmış çok sayıda fosfat molekülünden oluşan bir polimerdir (Şekil 3.1). Bakterilerde poliP metabolizması, iki temel enzim sınıfı olan poliP kinazlar (PPK1 ve PPK2) tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimler, ATP'nin terminal fosfatını poliP zincirine ekleyerek polimerizasyonu sağlar ve gerektiğinde poliP'yi tekrar ATP'ye dönüştürebilirler [Zhang ve Kornberg, 2002]. Öte yandan, polyP yıkımı, terminal fosfatı hidrolize eden eksozofosfataz (PPX) enzimiyle gerçekleşir [Shi vd., 2004].



Şekil 3.1: İnorganik polifosfat (PoliP): $[\text{PO}_3^-]$ biriminin n değeri, hücresel konuma ve metabolik duruma bağlı olarak onlarca hatta yüzlerce arasında değişiklik gösterebilir [Rao vd., 2009].

PoliP sadece enerji metabolizmasında değil, aynı zamanda stres yanıtı ve çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde merkezi rol oynar [Rao vd., 2009]. PoliP, özellikle besin kıtlığı ve stres koşullarında yıkılarak ATP'ye dönüştürülür. Bu durum,

hücrenin enerji dengesini koruyarak hayatta kalma şansını artırır [Zhang ve Kornberg, 2002].

Genetik düzeyde *ppk* veya *ppx* genlerinin silinmesi ya da aşırı ekspresyonu, bakteriyel büyüme hızı, hareketlilik, quorum sensing, biyofilm oluşumu, sporulasyon ve virülans gibi pek çok durumu etkileyebilir [Shi vd., 2004; Rao vd., 2009]. Örneğin, *Bacillus cereus*'ta *ppk* geninin silinmesi (Δppk mutasyonu), hücredeki poliP düzeyinin ciddi şekilde azalmasına neden olur. Buna bağlı olarak, bakterinin hareket etme yeteneği ve biyofilm oluşturma kapasitesi de belirgin şekilde zayıflar. Spor oluşturma yeteneğinde görülen ciddi bozulmalar ise özellikle Δppx (exopolifosfataz) mutantlarında dikkat çekicidir. Bu durum, poliP'nin hem sentez hem de yıkım süreçlerinin, farklı fizyolojik özellikleri farklı biçimlerde etkilediğini göstermektedir [Shi vd., 2004].

Model organizmalar ve bazı patojenik türlerde (ör. *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella*), Δppk mutasyonları biyofilm oluşumu, quorum sensing, virülans, stres toleransı ve durağan fazda uzun süreli yaşam gibi önemli özelliklerde belirgin bozulmalara yol açmaktadır [Rao vd., 2009; Rashid ve Kornberg, 2000; Rao ve Kornberg, 1996]. Ancak, *Vibrio cholerae* gibi bazı türlerde temel büyüme ve kolonizasyon süreçleri etkilenmeyebilir. Bu da *ppk* fonksiyonunun türe özgü fenotipik sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir [Ogawa vd., 2000].

Laboratuvarımızda gerçekleştirilen bir çalışmada, *Bti*'de *ppk* geninin aşırı ekspresyonu, δ -endotoksin üretimini ve buna bağlı olarak larvasidal aktiviteyi anlamlı şekilde artırmıştır. Çalışmada, *ppk* geni pHT315 vektörüne klonlanmış ve genin aşırı ifade edildiği rekombinant suşun endotoksin üretimi, yaban suş ve boş vektör taşıyan suşlarla karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, *ppk* geninin fazla ifade edildiği suşun endotoksin üretiminde anlamlı artış sağladığını göstermiştir. Ayrıca, bu rekombinant suşun, *Culex quinquefasciatus* sivrisinek larvalarına karşı toksisitesinin yaklaşık 7,7 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir [Doruk vd., 2013]. Aynı zamanda, *ppk*'nın kromozomal silinmesine yönelik güvenilir bir yöntem geliştirilmiş ve Δppk mutantlarının fizyolojik etkilerinin sistematik olarak incelenmesine olanak sağlanmıştır. Bu bağlamda, Δppk mutantının da aynı şekilde δ -endotoksin üretiminin ve larvasidal aktivitesinin yaban suşa göre 2,4 kat artırdığı gösterilmiştir [Doruk, 2013]. Bu çalışmalar, polifosfat metabolizmasının sadece enerji depolama ve stres tepkisinde değil, aynı zamanda biyoinsektisit biyosentezinde de rol oynayabileceğini ortaya koyan ilk çalışmalardan biri olma özelliği taşımaktadır. Bulgular, biyoinsektisit üretiminin genetik

mühendislik yoluyla artırılabilirliğini ve çevresel zararlılarla biyolojik mücadelede etkili yeni stratejiler geliştirilebileceğini göstermektedir.

Son yıllarda *Bacillus* ve polifosfat mekanizması konuları üzerine duran bir çalışmada ise, Yik ve arkadaşları (2023), çevresel stres etmeni olarak bakır iyonlarının etkisi altında *Bacillus thuringiensis* Y1 suşunun polifosfat ve polihidroksialkanoat metabolizmasına ait gen ekspresyon profillerini incelemiştir. Özellikle polifosfat kinaz (*ppk*), ekzopolifosfotaz (*ppx*) and NAD kinaz (*ppnk*), gibi polifosfatla ilişkili genlerin stres koşullarında nasıl davrandığına odaklanılmıştır. Çalışmanın temel bulgularına göre, bakır stresi altında bu genlerin ekspresyonu anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Bu da, *B. thuringiensis*'in aşırı metal iyonlarına karşı verdiği savunma tepkisinde polifosfat metabolizmasının aktif bir şekilde devreye girdiğini ortaya koymaktadır. Çalışmada, polifosfatın, enerji depolama molekülü olmasının ötesinde, iyon şelatlama ve oksidatif hasarı azaltma gibi koruyucu roller üstleniyor olabileceğine değinilmiştir. Bu çalışma, polifosfat metabolizmasının yalnızca fizyolojik süreçlerde değil, aynı zamanda çevresel stres yanıtında da kritik bir rol oynadığını göstermesi bakımından önemlidir. Özellikle *B. thuringiensis* gibi endüstriyel açıdan önemli türlerde stres toleransı ve metabolik esneklik konularında *ppk/ppx* genlerinin işlevine dair güçlü kanıtlar sunmaktadır [Yik vd., 2023].

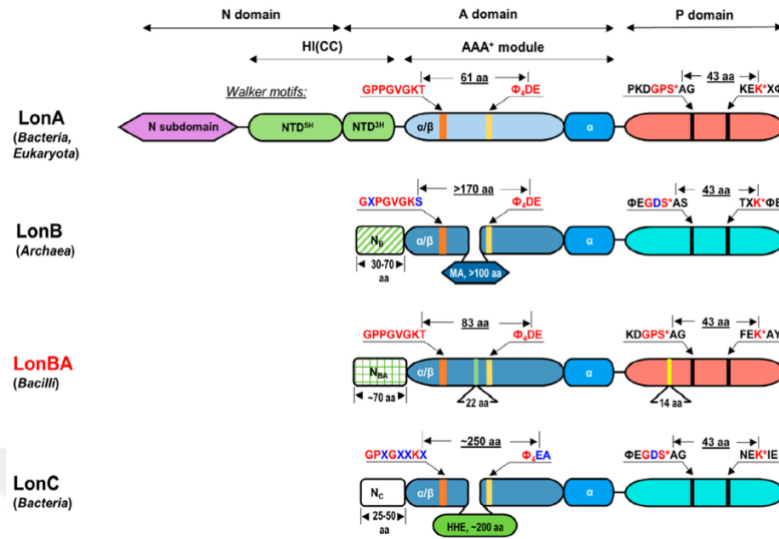
4. LON PROTEAZ

Proteazlar, biyosistemlerde yaygın olarak bulunur ve hücrelerin ve organizmaların biyokimyasal, fizyolojik ve düzenleyici süreçlerinde çeşitli roller üstlenir [Ward, 2019]. Hücre içi proteolizi gerçekleştiren özel bir proteaz grubu, hücre sağ kalımı için gereklidir. Bu proteazlar, özellikle proteomu tehdit eden stres koşullarında hasarlı, işlevsiz ve kısa ömürlü proteinleri ortadan kaldırarak hücre protein homeostazının korunmasında kritik bir rol oynar. Belirli fonksiyonel proteinlerin miktarını düzenleyerek, proteazlar transkripsiyonel ve post-translasyonel yolların düzenlenmesine katılır. Bakterilerde, hücre içi proteoliz, Lon gibi büyük AAA+ (ATPase Associated with various cellular Activities) protein ailesine ait ATP-bağımlı proteazlar tarafından gerçekleştirilir [Kirthika vd., 2023].

ATP'ye bağımlı bir proteaz olan Lon, yanlış katlanmış, oksidatif olarak hasar görmüş ya da görevini tamamlamış proteinlerin parçalanmasını sağlayarak proteostazın korunmasına katkıda bulunur [Gur, 2013; Lee ve Suzuki, 2008]. Moleküler olarak Lon, altı alt birimden (hexamer) oluşan halka şeklinde bir kompleks halinde çalışır. Her bir alt birim bir AAA+ ATPaz domaini ve bir serin-lizin proteaz domaini içerir. Bu yapı, substrat proteinleri ATP'nin hidroliziyle açarak merkezi proteolitik boşluğa alır ve burada yıkar. Yapılan yapısal analizler, Lon proteazlarının yalnızca bakterilerde değil, arkealarda (LonB) ve ökaryotlarda mitokondri ve kloroplast gibi organellerde de bulunduğunu, farklı türlerde LonA, LonB ve LonC alt ailelerine ayrıldığını göstermektedir. Özellikle LonA alt ailesinin geniş bir N-terminal domain taşıdığı ve bu bölgenin substrat tanıma ile kompleksin stabilitesinde kritik rol oynadığı görülmüştür [Gur, 2013; Wlodawer vd., 2022].

Son yıllarda yapılan yapısal ve biyoinformatik çalışmalar, Lon proteaz ailesinde daha önce tanımlanmamış hibrit özellikler taşıyan yeni bir alt aile olduğunu ortaya koymuştur. Bu yeni alt aile, LonBA olarak adlandırılmıştır ve özellikle *Bacillus subtilis*'te detaylı olarak incelenmiştir (Şekil 4.1). Gustchina ve arkadaşları (2022), proteaz (P) ve ATPaz (A) domainlerini hem kristal yapı hem de modelleme yöntemleriyle analiz ederek bu enzimin hem LonA hem de LonB ailelerinin özelliklerini birlikte barındırdığını göstermiştir. Proteaz domaininde LonA-benzeri

katalitik Ser-Lys çifti bulunurken, ATPaz domaininde LonB'ye özgü yapısal motifler korunmuştur [Gustchina vd., 2022].



Şekil 4.1: Lon proteaz alt ailelerinin şematik blok diyagramı. AAA+ modüllerinin A ve B tipleri (açık mavi ve mavi) ile proteolitik (P) alanlarının A ve B tipleri (kırmızı ve turkuaz) renklerle gösterilmiştir. LonB ve LonC'de membran bağlantı alt alanı (MA) ve helikal saç tokası uzantısı (HHE) sırasıyla mavi ve yeşil ile belirtilmiştir [Wlodawer vd., 2022; Gustchina vd., 2022].

Bu yapısal melezlik, LonBA'nın işlevine dair önemli çıkarımlar sunmaktadır. LonBA proteazının *Bacillus* hücrelerinde protein kalite kontrolünde rol aldığı, özellikle stres koşullarında yanlış katlanmış veya hasarlı proteinlerin yıkımında görev aldığı düşünülmektedir. Ayrıca ATP'ye afinitesi, substrat seçiciliği ve muhtemel membran ilişkisi klasik LonA ve LonB proteazlarından farklılık gösterebilir. Bu farklılıkların hücredeki lokalizasyon, düzenleyici mekanizmalar ve proteolitik hız üzerinde etkili olabileceği öngörülmektedir [Gustchina vd., 2022].

Mevcut veriler, LonBA'nın ekspresyonunun hangi stres koşulları veya regülatörler tarafından kontrol edildiği ve hangi spesifik substratları hedef aldığı konularında hala sınırlıdır. Gelecek çalışmaların, LonBA'nın *Bacillus* sporulasyonu, stres yanıtı ve metabolik düzenleme süreçlerindeki rolünü açıklığa kavuşturması beklenmektedir. Bu bilgiler, hem temel hücresel biyoloji hem de endüstriyel biyoteknoloji açısından önemli çıkarımlar sunacaktır [Gustchina vd., 2022].

Barkad ve arkadaşlarının laboratuvarımızda gerçekleştirmiş olduğu bir çalışmada, hücresel homeostazda merkezi bir rol oynayan Lon proteazın *Bti*'de endotoksin

üretimi ve stres yanıtı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, *lon* geni kendi promotörü ve terminatörü ile birlikte çok kopyalı bir plazmite klonlanarak *Bti* ATCC 35646 suşunda yüksek ifadesi sağlanmıştır. Rekombinant suşta *lon* geninin başarılı bir şekilde ifade edildiği ve üretilen Lon proteazın fonksiyonel olduğu gösterilmiştir [Barkad vd., 2021].

Elde edilen veriler, *lon* geninin aşırı ifadesinin sporülasyon verimliliğini düşürdüğünü ve hücre motilitesini zayıflattığını ortaya koymuştur. Buna karşılık, δ -endotoksin üretiminin arttığı, biyofilm oluşumunun yükseldiği ve suşun ozmotik stres, ısı şoku ve UV ışınına karşı daha yüksek tolerans geliştirdiği bulunmuştur. Bu sonuçlar, Lon proteazın yalnızca protein kalite kontrolünde değil, aynı zamanda entomopatojenik toksin üretimi ve stres adaptasyonunda da kritik bir düzenleyici rol üstlendiğini düşündürmektedir. Çalışma, *Bti*'nin biyoinsektisit üretim kapasitesinin genetik mühendisliği ile artırılmasına yönelik ileri çalışmalar için değerli bir model oluşturmaktadır [Barkad vd., 2021].

Son dönemde Wang ve ark. (2024) tarafından yapılan moleküler tabanlı bir çalışmada, LonA proteazının inaktivasyonunun özellikle sekresyona duyarlı enzimlerin üretimini anlamlı ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Araştırmacılar, xilanaz (XynA) ve maltogenik α -amilaz (AmyM) aşırı üreten *Bacillus subtilis* suşlarında transkriptom ve ribozom profil analizleri yapmış ve LonA geninin silinmesinin XynA üretimini %140 kat, AmyM üretimini ise %20 oranında artırdığını rapor etmiştir. Bu sonuçlar, LonA proteazının genetik olarak hedeflenmesinin, *Bacillus*'un rekombinant protein üretiminde kullanılabilecek güçlü bir strateji olabileceğini ve sekresyon kapasitesini artırmaya yönelik çalışmalara ışık tutabileceğini göstermektedir [Wang vd., 2024].

5. *BACILLUS THURINGIENSIS* *ISRAELENSIS*'İN BİYOREAKTÖRDE BÜYÜK ÖLÇELİ δ -ENDOTOKSİN ÜRETİMİ

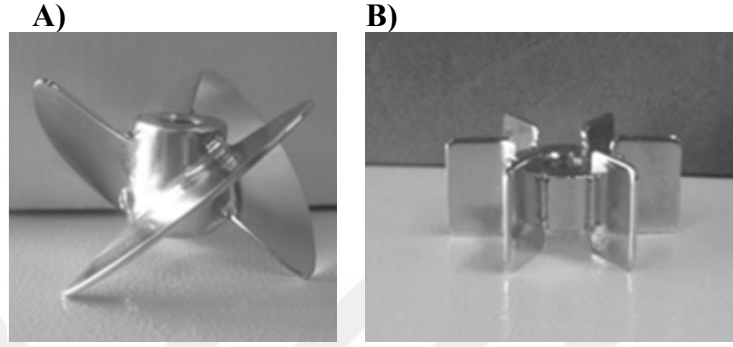
Mikroorganizmaların kontrollü koşullarda çoğaltılarak biyoteknolojik ürün elde edilmesi, endüstriyel biyoteknolojide temel bir uygulamadır. Fermentasyon süreçleri genellikle küçük ölçekli fermentörlerde başlatılır. Bu sistemler (2–5 L), sıcaklık, pH ve çözülmüş oksijen gibi parametrelerin hassas kontrolünü mümkün kılar ve büyük ölçekli üretime geçişte kritik bir adımdır. Orta ölçekli fermentörler (20–100 L) pilot üretim için kullanılırken, endüstriyel sistemlerde (500 L ve üzeri) özellikle oksijenin sıvı faza geçiş verimliliğini ifade eden $k_L a$ değeri, pervane tipi ve karıştırma hızı gibi parametrelerin yeniden optimize edilmesi gerekir [Mahdinia ve Demirci, 2019; Lidén, 2002]. *Bti* üretimi genellikle sıvı fazlı fermentasyon sistemlerinde gerçekleştirilir. Ayrıca, ekonomik besiyeri formülasyonları ve ölçeklendirme teknikleri, endüstriyel üretimin sürdürülebilirliği açısından büyük önem taşır [Özkan vd., 2003].

Bti üretiminin endüstriyel ölçekte gerçekleştirilebilmesi için farklı fermentör stratejileri geliştirilmiştir. Fermentör sistemleri, yalnızca yüksek hücre yoğunluğu elde etmeyi değil, aynı zamanda sporulasyon ve toksin üretimini optimize etmeyi de hedefler [Masri ve Ariff, 2020]. Endüstriyel ölçekte *Bti* üretiminde sıcaklık, hem hücresel büyüme kinetiklerini hem de spor ve toksin sentezini doğrudan etkileyen en kritik parametrelerden biri olarak kabul edilmektedir. Fermentör bazlı çalışmalarda, 30 °C'nin bu tür üretimler için optimum sıcaklık olduğu birçok araştırmada teyit edilmiştir. Richardson ve ark. (2020), 2 L ve 5 L hacmindeki fermentörlerde yürüttükleri çalışmada, 30 °C'de en kısa bölünme süresi ve en yüksek büyüme oranının elde edildiğini bildirmiştir [Richardson vd., 2020]. Daha büyük ölçekli ve katı fermantasyon sistemlerine odaklanan bir araştırmada ise, 25–30 °C aralığı en uygun değer olarak belirlenmiş ve bu sıcaklığın yüksek spor yoğunluğu, kristal protein üretimi ve ölçeklenebilirlik açısından avantaj sağladığı gösterilmiştir [Thao vd., 2021]. Dolayısıyla, fermentör koşullarında 30 °C'nin tercih edilmesi endüstriyel ölçekli üretimde verimlilik, enerji tasarrufu ve süreç stabilitesi açısından da önem arz etmektedir.

Fermentasyon ortamının pH kontrolü ise hem bakterinin metabolizması hem de toksin salınımı açısından kritik öneme sahiptir. Literatürde fermentör koşullarında pH kontrolünün toksin sentezi açısından denenen farklı kontrol stratejileri bulunmaktadır. Awad ve ark. (2015), 16 L'lik biyoreaktörde yürüttükleri çalışmada, pH kontrolü uygulanmayan fermentasyonlarda daha yüksek spor ve hücre kütlesi elde ettiklerini, böylece asit ve baz kullanım maliyetini düşürerek pH kontrol cihazının işletme ve bakım maliyetinden tasarruf sağlanabileceğini raporlamışlardır [Awad vd., 2015]. Buna karşın, bazı çalışmalarda ise toksin verimliliğinin sabit pH uygulamalarında elde edildiği görülmektedir. Örneğin, Soccol ve ark. (2009), 2 L fermentörde pH'nın doğal dalgalanmalarına (5.8–8.4 arası) kıyasla pH 7.0 sabitlemesinin en yüksek toksisiteyi sağladığını bildirmiştir [Soccol vd., 2009]. Bu bulgular, pH kontrolünün yalnızca büyüme ve sporülasyonu değil, aynı zamanda toksin sentezini de optimize ettiğini göstermektedir.

Fermentörlerde oksijen transferi, özellikle spor ve toksin üretiminin hedeflendiği *Bti* fermentasyonlarında kritik bir parametredir. Oksijenin sıvı faza geçiş verimliliğini ifade eden kLa değeri, başta pervane tipi, karıştırma hızı (RPM) ve havalandırma (VVM) olmak üzere çeşitli operasyonel değişkenlerden etkilenmektedir. *Bti*'nin fermentör koşullarında üretiminde agitasyon (karıştırma (RPM)) ve aerasyon (havalandırma/oksijen verme (VVM)) hücresel büyüme ile toksin ve spor üretimi arasında kritik bir dengeyi sağlayan parametrelerdir. Richardson ve ark. (2020), *B. thuringiensis* üretiminin 2 L ve 5 L hacmindeki fermentörlerde sırasıyla 200 RPM/1,5 VVM ve 150 RPM/1,5 VVM koşullarında en yüksek büyüme oranı ve en kısa bölünme süresini elde ederek oksijen sağlanmasında 1,5 VVM aerasyonun belirleyici olduğunu göstermiştir. Bu bulgular aynı zamanda farklı hacimlerdeki fermentörlerin farklı koşullarda optimize olabileceğini göstermektedir [Richardson vd., 2020]. *B. thuringiensis* üretiminde 14 L fermentör kullanılan başka bir çalışmada 1 VVM'de 300 rpm'lik agitasyon hızının 200 rpm'e kıyasla spor üretimini yaklaşık 60 kat, kristal protein verimini ise %72 oranında artırdığını göstermiştir [Zafar vd., 2003]. Ancak başka bir çalışmada ise daha büyük ölçeklerde agitasyon hızının fermentör hacmiyle ters orantılı olarak azaldığı görülmektedir. Örneğin Kim ve ark. (2011), *Bacillus thuringiensis kurstaki* üretiminde 20 L fermentörde 300 rpm, 1000 L fermentörde ise 175 rpm ile benzer oksijen aktarımı sağlanmış ve spor verimleri birbirine yakın çıkmıştır [Kim vd., 2011]. Şekil 5.1'de gösterilen Pitched blade (A) ve Rushton tipi

(B) karıştırıcılar, biyoreaktörlerde karıştırma ve oksijen transferi performansı açısından yaygın olarak kullanılan iki farklı çark tasarımıdır. Pitched blade karıştırıcılar, düşük kesme kuvvetiyle daha yumuşak akış sağlarken, Rushton tipi karıştırıcılar, yüksek kesme kuvveti ve daha etkili gaz–sıvı karışımı için tercih edilir [Paciello ve Parascandola, 2020].



Şekil 5.1: Pitched blade (A) ve Rushton tipi (B) karıştırıcılar [Paciello ve Parascandola, 2020].

Endüstriyel ölçekli fermentasyonlarda yaygın olarak kullanılan Rushton tipi pervaneler, yüksek gaz dağılım kapasitesi sağlarken, hücreler üzerinde oluşturduğu yüksek kesme kuvveti nedeniyle bazı durumlarda olumsuz etkilere yol açabilir. Alternatif olarak kullanılan pitched-blade pervaneler, daha düşük kesme kuvvetiyle çalışarak hem yeterli oksijen transferi sağlar hem de hücre bütünlüğünü korur [Paciello ve Parascandola, 2020]. Bu sonuçlar, pervane tipinin, hava giriş basıncı ve karıştırma sisteminin birlikte optimize edilmesinin ölçek büyütmede üretkenliği korumada kritik olduğunu göstermektedir [Kim vd., 2011].

Endüstriyel ölçekte *Bti* üretiminde en önemli kısıtlardan bir diğeri, kullanılan besiyerlerinin yüksek maliyetidir. Glikoz, nişasta, sükroz ve mannitol gibi rafine karbon kaynakları laboratuvar koşullarında verimli olsa da, büyük hacimlerde kullanımında ciddi ekonomik yük oluşturmakta ve endüstriyel uygulanabilirliği sınırlamaktadır. Bu nedenle, literatürde çok sayıda çalışma tarımsal ve endüstriyel organik atıkların uygun maliyetli substratlar olarak değerlendirilmesine odaklanmıştır. Bu kapsamda, Prabakaran ve Balaraman (2006), yerel olarak temin edilebilen soya unu, yer fıstığı küspesi ve buğday kepeği ekstresi gibi tarımsal yan ürünleri kullanarak 100 litrelik bir fermentörde *Bti* üretmiş, özellikle soya unu içeren ortamda yüksek sporulasyon ve toksisite değerleri elde etmişlerdir [Prabakaran ve Balaraman, 2006]. Benzer şekilde, Yezza ve arkadaşları (2006), atık su ve atık su çamuru gibi endüstriyel

organik atıkları değerlendirmiş ve *Bt* üretimini 150 L'lik pilot ölçekli fermentörlerde başarılı bir şekilde gerçekleştirerek biyopestisit üretimini sağlamıştır [Yezza vd., 2006]. Bu çalışmalar, endüstriyel ölçekte *Bt* üretiminde atık bazlı ve tarımsal kökenli hammaddelerin kullanımı ile hem maliyetlerin düşürülebileceğini hem de üretim verimliliğinin artırılabilceğini ortaya koymaktadır.

Bti fermentasyonları sırasında, özellikle yoğun havalandırma ve karıştırma koşullarında köpük oluşumu yaygın bir sorundur. Bu durum, hem sensör okumalarının bozulmasına hem de kontaminasyon riskinin artmasına yol açabilir. Köpük kontrolü için genellikle kimyasal köpük kesiciler ya da mekanik köpük kırıcı sistemler kullanılmaktadır. *B. thuringiensis* bazlı biyopestisitlerin üretiminde köpük kontrolünün toksin verimine etkisini inceleyen bir çalışmada, polipropilen glikol (PPG)'ün *Bt*'nin büyümesi üzerinde toksik etki gösterdiği ve toksin verimini azalttığı belirlenmiştir. Buna karşılık, Antifoam A (Sigma Chemicals) daha az olumsuz etkiyle köpük kontrolü sağlamıştır. Ayrıca, doğal yağların büyüme ve toksin üretimi üzerinde olumsuz bir etki yaratmadan köpük kontrolü sağladığı ve spor ile toksin üretimini artırdığı rapor edilmiştir. Özellikle kanola, zeytin ve yer fıstığı yağları yüksek köpük baskılama kapasitesine sahip bulunmuş, tekli doymamış yağ asitleri bakımından zengin yağların toksin üretimini artırdığı gözlemlenmiştir. Ek olarak, yer fıstığı ve soya yağlarının, PPG'ye kıyasla yaklaşık 20 kat daha ekonomik köpük önleyici ajanlar olduğu ifade edilmiştir [Vidarthi vd., 2000].

Bti üretiminde downstream processing, yani fermentasyon sonrası saflaştırma ve stabilizasyon süreçleri, ürünün biyolojik etkinliğini koruyarak ticarileşmesini sağlayan kritik bir aşamadır. *Bt* üretiminde elde edilen başlıca ürün, sporlu kristal toksin kompleksidir ve bu yapı hedef böceklerde toksik etki gösterir. Bu kompleksin fermentasyon ortamından verimli şekilde ayrılması için santrifüj [Prabakaran ve Hoti, 2008], filtrasyon [Villafaña-Rojas vd., 1996], sprey kurutma (spray drying) [Zhang vd., 2024] ve dondurarak kurutma (freeze drying) [Ouattara vd., 2025] gibi çeşitli yöntemler kullanılır.

Bt üretiminde downstream processing aşamalarında ürünün etkinliğini ve daha sonrasında ürünün raf ömrünü artırmak amacıyla potasyum sorbat gibi antimikrobiyal koruyucuların eklenmesi önerilmektedir. Bu koruyucular, özellikle nemli ortamlarda mikrobiyal kontaminasyonu önleyerek ürünün stabilitesini artırır. Depolama koşulları açısından ise düşük nemli ortamlar, 4–25 °C arasında sabit sıcaklıkta muhafaza,

biyopestisit etkinliğinin uzun süre korunmasını sağlamaktadır [Brar vd., 2006]. *Bacillus thuringiensis tenebrionis* izolatu ile yurutulen çalışmada, fermentasyon sonrasında elde edilen spor-kristal karışımının mikrobiyal kontaminasyona karşı korunması amacıyla formulasyona %0,5 potasyum sorbat eklenmiştir. Antimikrobiyal bir koruyucu olarak kullanılan potasyum sorbat, urunun depolama suresinde stabilitesini artırmış ve bozulmalara karşı ek bir guvenlik sağlamıştır. Bu yaklaşım, biyopestisit formulasyonlarında sadece etkinlik değil, aynı zamanda raf omru ve guvenilirliğin de geliştirilmesi açısından onemli bir katkı sunmaktadır [Eski vd., 2017].

Özetle, *Bti* tabanlı biyopestisitlerin urutimi, çevresel suşdurulebilirlik, insan sağlığı ve tarımsal verimlilik açısından buyuk oneme sahiptir. Bu bakterinin biyopestisit ozelliği, onu kimyasal pestisitlere kıyasla daha guvenli ve hedefe ozgu bir alternatif haline getirmiştir. Ancak yuksek verimli ve maliyet etkin urutim suresleri için yalnızca fermentasyon değil, fermentasyonun her aşaması (fermentor tasarımı, sıcaklık kontrolu, pH kontrolu, oksijen transferi, kopuk kontrolu, olekleme stratejileri ve downstream işlemler) bir butun olarak optimize edilmelidir. Tum bu teknik faktorlerin basariili şekilde entegre edilmesi, *Bti*'nin hem bilimsel araştırmalarda hem de endustriyel uygulamalarda suşdurulebilir ve ekonomik bir biyopestisit olarak kullanımını mumkun kılmaktadır [Kumar vd., 2019; Kough, 2008].

6. MATERİYAL VE YÖNTEMLER

6.1. Kullanılan Materyaller

6.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar

Tez kapsamında yapılan deneylerde kullanılan cihazlar ve teknik özellikleri ve kullanım amaçları Tablo 6.1’de verilmiştir.

Tablo 6.1: Laboratuvarında kullanılan cihazlar ve teknik özellikleri.

Sıra No	Cihaz Adı	Marka / Model	Açıklama / Kullanım Amacı
1	4 °C Buzdolabı	Samsung	Numune ve çözelti saklama
2	-20 °C Derin Dondurucu	Samsung	DNA, enzim ve kimyasal madde saklama
3	-80 °C Derin Dondurucu	Thermo Scientific, Forma –86 °C ULT Freezer	Uzun süreli DNA, RNA ve bakteri stoklarının saklanması
4	Buz Makinesi	BAR-LINE, BF85	Buz ihtiyacının karşılanması
5	Yatay Elektroforez Sistemi	Bio-Rad	DNA/RNA elektroforezi
6	Dikey Elektroforez Sistemi	Bio-Rad	SDS-PAGE gibi protein analizlerinin yapılması
7	Güç Kaynağı	Bio-Rad PowerPac Basic	Elektroforez sistemine voltaj sağlanması
8	Masa Üstü Santrifüj	Heraeus, Labofuge 400R	Orta hacimli örneklerin santrifüjlenmesi
9	Masa Üstü Santrifüj	Beckman Coulter, Microfuge 22R	Küçük hacimli örneklerin santrifüjlenmesi
10	Otoklav	NÜVE NC 90M	Cihaz, malzeme ve çözelti sterilizasyonu
11	Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Standard	Çözeltilerin homojen şekilde karıştırılması ve ısıtılması
12	pH Metre	Hanna Instruments, pH 211	pH ölçümü
13	Steril Kabin	Heraeus, HP48	Laminar flow ile steril çalışma ortamı
14	Etüv	Binder, 9010-0078	Kuru sıcaklık ile ıslak malzemelerin kurutulması
15	İnkübatör	Heraeus, D-63450 Heraus	Sabit sıcaklıkta bakteri inkübasyonu

Tablo 6.1: Devamı.

Sıra No	Cihaz Adı	Marka / Model	Açıklama / Kullanım Amacı
16	Çalkalamalı İnkübatör	Edmund Bühler, KS-15	Sıvı kültürlerin havalandırmalı inkübasyonu
17	Görüntüleme Cihazı	CEMIDOC	Agaroz jelinin görüntülenmesi
18	Elektroporatör	Gene Pulser Xcell	DNA veya plazmidlerin hücre içerisine aktarılması
19	Su Banyosu	TECHNE, TE-10A Tempette	Sıcaklık kontrollü inkübasyon
20	Bloklu Isıtıcı	WiseTherm	Tüpler içerisindeki numunelerin kontrollü sıcaklıklarda inkübasyonu
21	UV Görüntüleme Cihazı	Beckman Coulter DU 530	Agaroz jel üzerindeki DNA/RNA bantlarının görüntülenmesi
22	Mikrodalga Fırın	Samsung	Hızlı ısıtma, tampon çözme işlemleri
23	Floresan Spektrofotometre	Bio-Rad, Smartspec 3000	Bakteriyel kültürlerin optik yoğunluk (OD) ölçümleri ve konsantrasyon analizleri
24	NanoDrop Lite Spectrophotometer	Thermo Scientific	DNA, RNA ve proteinlerin konsantrasyonlarını hızlı ve az hacimli ölçümle belirlemek
25	PCR Termal Döngüleyici	Applied Biosystems	DNA amplifikasyonu
26	Kapalı Hassas Terazi	Shimadzu	Hassas ağırlık ölçümlerinin yapılması
27	Hassas Terazi	Precisa	Ağırlık ölçümlerinin yapılması
28	Biyoreaktör	Applikon Bio	2 L ölçekli fermentör cihazında bakteri fermentasyonunun yapılması.

6.1.2. Kimyasallar

Tez kapsamında yapılan deneylerde kullanılan kimyasallar ve detayları Tablo 6.2’de verilmiştir.

Tablo 6.2: Tez kapsamında kullanılan kimyasallar, formülleri ve markaları.

Kimyasal Ad	Kimyasal Formül	Marka Adı
Sodyum klorür	NaCl	Merck
Pepton	-	Pronadisa
Maya	-	Biolife
Agar tozu	-	Titan Biotech
Glikoz	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma
Sükroz/Sakkaroz	-	Caisson
Çözülebilir nişasta	-	Merck
Maltoz	-	Merck
Kalsiyum nitrat tetrahidrat	CaNO ₃ .4H ₂ O	Merck
Magnezyum sülfat heptahidrat	MgSO ₄ .7H ₂ O	Fluka
Demir (II) sülfat heptahidrat	FeSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-Aldrich
Manganez (II) klorür tetrahidrat	MnCl ₂ .2H ₂ O	Merck
Nutrient broth (besiyeri)	-	Biolife
Potasyum hidrojen fosfat	K ₂ HPO ₄	Merck
Potasyum fosfat monobazık	KH ₂ PO ₄	Riedel-de Haen
Sükroz	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Caisson Labs
Magnezyum Klorür	MgCl ₂	AFG Bioscience
Etanol	C ₂ H ₅ OH	Merck
Glasiyal Asetik asit	C ₂ H ₄ O ₂	Merck
Akrilamid	-	Fisher BioReagents
Amonyum persülfat	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	AppliChem
TEMED	C ₆ H ₁₆ N ₂	AppliChem
2-merkaptotanol	C ₂ H ₆ OS	Merck
İzopropil alkol / 2-Propanol	C ₃ H ₈ O	Merck
Hidroklorik asit	HCl	Riedel de Haen
Potasyum hidroksit	KOH	Riedel de Haen
Tris	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Merck
Sodyum dodesil sülfat	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	Merck
Gliserol %99	C ₃ H ₈ O ₃	Isolab
β-merkaptotanol	C ₂ H ₆ OS	Merck
Bromofenol mavisi	-	Sigma-Aldrich
Metanol	CH ₃ OH	Merck
Coomassie mavisi	C ₄₇ H ₅₀ N ₃ NaO ₇ S ₂	Merck
Asetik asit	CH ₃ COOH	Sigma-Aldrich

6.1.3. Enzimler

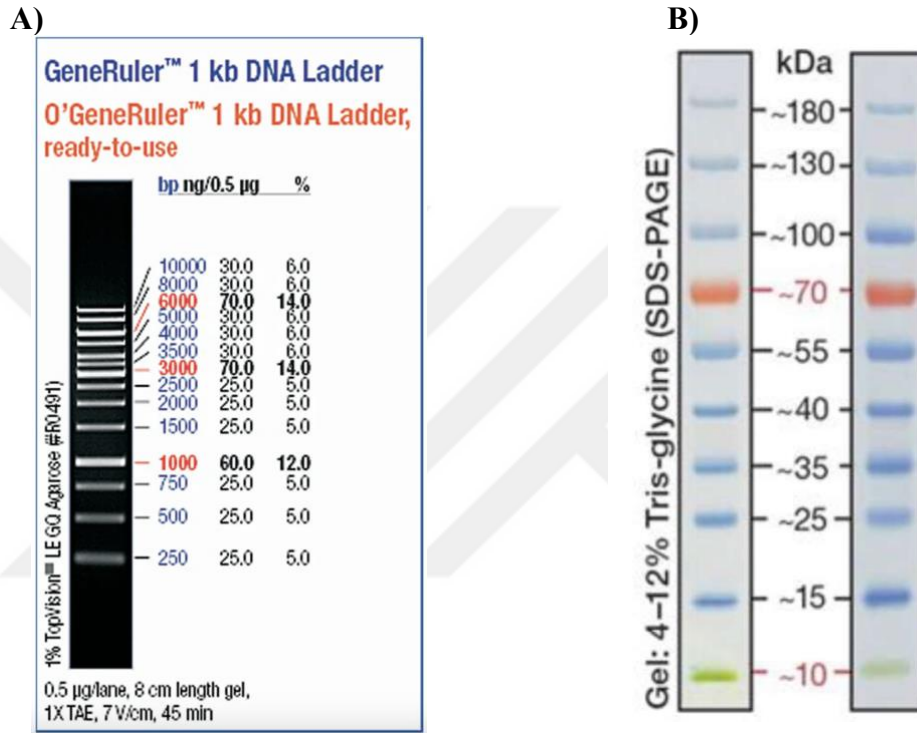
Bu çalışmada kullanılan enzimler, konsantrasyonları ve hazırlanma yöntemleri Tablo 6.3'te sunulmuştur. Enzim reaksiyonları, üretici firmaların önerdiği uygun tampon çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plazmid izolasyonunda, genomik DNA izolasyonunda ve protein saflaştırmalarında lizozim enzimi, PCR reaksiyonlarında Taq polimeraz, kesim reaksiyonlarında ise HindIII ve KpnI restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Tez boyunca kullanılan enzimler Thermo Scientific (ABD) tarafından sağlanmıştır. Lizozim ve RNaz enzimleri, Green ve Sambrook (2012) tarif ettiği standart protokole göre hazırlanmıştır [Green ve Sambrook, 2012].

Tablo 6.3: Kullanılan enzimler ve depolama koşulları.

Enzim Adı	Marka Adı	Hazırlama Yöntemi ve Saklama Koşulları
Lizozim (10 mg/ml)	Thermo Scientific	100 mg lizozim, 10 ml deiyonize su veya Tris-EDTA (pH 7.4) içinde çözülür. Steril tüpe aktarılır ve çözünene kadar karıştırılır. -20 °C'de alikotlar halinde saklanır [Green ve Sambrook, 2012].
RNaz (10 mg/ml)	Thermo Scientific	10 mg RNaz, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) içinde çözülür. 100 °C'de 15 dk ısıtılır, oda sıcaklığında soğutulur. -20 °C'de alikotlar halinde saklanır [Green ve Sambrook, 2012].
Taq polimeraz	Thermo Scientific	Kullanıma hazırdır, -20 °C'de saklanır.
HindIII	Thermo Scientific	Kullanıma hazırdır, -20 °C'de saklanır.
KpnI	Thermo Scientific	Kullanıma hazırdır, -20 °C'de saklanır.

6.1.4. Kitler ve Moleküler Belirteçler

Plazmid izolasyonu sonrasında izole edilen plazmidlerin saflaştırılması için PCR Temizleme Kiti (Macherey-Nagel, Almanya) kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforezi analizlerinde GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD), SDS-PAGE analizlerinde ise PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (10–250 kDa) (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır (Şekil 6.1).



Şekil 6.1: Bu çalışmada kullanılan moleküler belirteçler. **A)** DNA belirteci: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific), **B)** Protein belirteci: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

6.1.5. Antibiyotikler

Bu tez kapsamında kullanılan antibiyotik bilgileri, konsantrasyonları ve hazırlama yöntemleri Tablo 6.4'te gösterilmektedir. Kullanılan antibiyotikler, Green ve Sambrook (2012) tarif ettiği standart protokole göre hazırlanmıştır [Green ve Sambrook, 2012].

Tablo 6.4: Antibiyotik özellikleri, konsantrasyonları ve hazırlanma yöntemi.

Antibiyotik	Kıs.	Stok kons.	<i>E. coli</i> kons.	<i>Bacillus</i> kons.	Çözücü	Depolama
Eritromisin	Ery	25 mg/ml	300 µg/ml	25 µg/ml	%100 etanol	-20 °C
Ampisilin	Amp	100 mg/ml	100 µg/ml	-	ddH ₂ O	-20 °C
Kloramfenikol	Chl	25 mg/ml	25 µg/ml	-	%100 etanol	-20 °C
Nalidiksik asit	Nal	25 mg/ml	-	25 µg/ml	NaOH	-20 °C
Nistatin	Nis	50 mg/ml	-	50 µg/ml	%100 metanol	-20°C
Hazırlama Yöntemi						
Antibiyotik Adı	Hazırlama Yöntemi					Kaynakça
Eritromisin (20 ml) (20 ml'lik stok çözeltisi için)	10 mg/ml stok çözeltisi için 200 mg eritromisin, 20 ml %100 etanolde çözülür. Steril tüpe aktarılır, homojen olarak çözünene kadar karıştırılır. -20 °C'de alikotlar halinde saklanır.					Green ve Sambrook, 2012
Kloramfenikol (10 ml) (10 ml'lik stok çözeltisi için)	25 mg/ml stok çözeltisi için 250 mg kloramfenikol, 10 ml %50 etanolde çözülür. Steril tüpe aktarılır ve homojen olarak çözünene kadar karıştırılır. -20 °C'de alikotlar halinde saklanır.					Green ve Sambrook, 2012
Ampisilin (10 ml) (10 ml'lik stok çözeltisi için)	100 mg/ml stok çözeltisi için 1 g ampisilin, 10 ml çift distile suda (ddH ₂ O) çözülür. 0,22 µm membran filtre ile sterilize edilir. -20 °C'de alikotlar halinde saklanır.					Green ve Sambrook, 2012
Nalidiksik asit (10 ml) (10 ml'lik stok çözeltisi için)	0,25 gram tartılan nalidiksik asit tozu, 0,3 M NaOH çözeltisinde çözündürülür, son hacim 10 ml'e tamamlanır. -20 °C'de alikotlar halinde saklanır.					Gruft, 1965
Nistatin (10 ml) (10 ml'lik stok çözeltisi için)	0,5 g nistatin tartılır, 10 ml metanolde çözülür. Steril tüpe aktarılır, homojen olarak çözünene kadar karıştırılır. -20 °C'de alikotlar halinde saklanır.					Al-Obaidy, 2014

6.1.6. Besiyerleri

Bu çalışmada kullanılan besiyerleri ve içeriklerine Tablo 6.5'te yer verilmiştir. Tüm besiyerleri, kullanılmadan önce 121 °C'de 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir.

Tablo 6.5: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.

Besiyeri	İçerik	Kaynak
Luria-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri (pH 7.5)	5 g maya ekstresi, 10 g tripton ve 10 g NaCl, distile su ile 1 litreye tamamlanır.	Gust vd., 2003
Luria-Bertani (LB) Agar Besiyeri (pH 7.5)	LB sıvı besiyerine %1,5 oranında agar eklenerek hazırlanır.	
Difco Sporülasyon Besiyeri (DSM) (pH 6.8)	10 ml %50 glikoz 1 ml Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O, 1 ml MgSO ₄ ·7H ₂ O, 1 ml FeSO ₄ ·7H ₂ O, 1 ml MnCl ₂ ·2H ₂ O, 4 g nutrient broth, 4,35 g K ₂ HPO ₄ , 3,40 g KH ₂ PO ₄ 1 litreye tamamlanır.	Nicholson ve Setlow, 1990
Beyin Kalp İnfüzyon Besiyeri (BHI) (pH 7,4±0,2)	37 g BHI, distile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlanır.	Macaluso ve Mettus, 1991
BHIG Besiyeri Brain Heart Infusion (BHI) + %1 Glikoz (w/v)	37 g BHI ile 10 g glikoz tartılır, distile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlanır.	
Tryptic Soy Sıvı Besiyeri (TSB) (pH 7,3±0,2)	30 g TSB, distile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlanır.	Powers, 1968; Uwamahoro vd., 2018
Tryptic Soy Agar Besiyeri (TSA) pH 7,4±0,2	TSB sıvı besiyerine %1,5 oranında agar eklenerek hazırlanır.	

6.1.7. Çözelti ve Tamponlar

Tez çalışmasında kullanılan çözeltiler ve içerikleri Tablo 6.6’da, kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri Tablo 6.7’de gösterilmiştir.

Tablo 6.6: Kullanılan solüsyonlar/çözeltiler.

Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar		
50X TAE Tamponu (200 ml) 48,4 g Tris 11,42 ml Glasiyal Asetik Asit 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) dH ₂ O ile 200 mililitreye tamamlanır.		%0,8 Agaroz Jel (40 ml) 0,32 g Agaroz 40 ml 1X TAE tamponu 3 µl RedSafe dH ₂ O ile 40 mililitreye tamamlanır.
SDS-PAGE için Kullanılan Solüsyonlar		
4X SDS Yükleme Tamponu (20 ml) 4 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8) 1,6 g SDS 8 ml %100 Gliserol 2 ml 0,5 M EDTA 820 µL β-merkaptoetanol 16 mg Bromofenol mavisi dH ₂ O ile 20 mililitreye tamamlanır.		2X Yürütme Tamponu (2 L) 28,8 g Glisin 6,04 g Tris 2 g SDS 1,8 L dH ₂ O dH ₂ O ile 2 litreye tamamlanır.
Coomassie Blue Boyası (1 L) 1 g Coomassie Brilliant Blue R 250 450 ml Metanol 100 ml Glasiyal Asetik Asit dH ₂ O ile 1 litreye tamamlanır.		Boya Arındırma Çözeltisi (1 L) 50 ml Metanol 70 ml Asetik asit dH ₂ O ile 1 litreye tamamlanır.
%12 SDS-PAGE		
Yükleme jeli (15 ml) 3,2 ml dH ₂ O 4 ml %30 Akrilamid 2,6 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 100 µl %10 SDS 100 µl %10 Amonyum persülfat (APS) 10 µl TEMED		Ayırma jeli (6 ml) 2,975 ml dH ₂ O 0,67 ml %30 Akrilamid 0,625 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 50 µl %10 SDS 50 µl %10 Amonyum persülfat (APS) 5 µl TEMED
E. coli Suşlarından Plazmid İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler		
Çözelti I (200 ml) 5 ml 1 M Tris (pH=8) 4 ml 0,5 M EDTA (pH=8) 3,96 ml %50 Glikoz dH ₂ O ile 200 ml'e tamamlanır.	Çözelti II* (10 ml) 200 µl 10 N NaOH 500 µl %20 SDS dH ₂ O ile 10 ml'e tamamlanır.	Çözelti III (200 ml) 120 ml 5M KOAc 23 ml Glasiyal asetik asit dH ₂ O ile 200 ml'e tamamlanır.

* Çözelti II taze hazırlanır.

Tablo 6.6: Devamı.

Bti Suşlarından Plazmid İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler		
TGE Tamponu, pH 8.0 (50 ml) 0,1514 g Tris-HCl 0,18612 g EDTA 0,4504 g Glikoz dH ₂ O ile 50 ml'e tamamlanır.	Çözelti A* (10 ml) 10 ml TGE tamponunda 100 mg Lizozim ve 100 mg RNaz çözülür. <i>* Çözelti A taze hazırlanır.</i>	Çözelti B* (10 ml) 200 µl 10 N NaOH 500 µl %20 SDS dH ₂ O ile 10 ml'e tamamlanır. <i>* Çözelti B taze hazırlanır.</i>
3 M Potasyum Asetat, pH 4.8 (20 ml) 5,89 g Potasyum Asetat dH ₂ O ile 20 ml'ye tamamlanır.	Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol Çözeltisi (25:24:1) 50 ml için; 25 ml Fenol 24 ml Kloroform 1 ml İzoamil Alkol	Buz Soğuğu Etanol (%100 ve %70) %100 Etanol ve %70 Etanol -20 °C'de saklanır.
Bti suşlarından Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler		
Tris-EDTA tamponu (pH 7.4) (1 litre) 1,21 g Tris 0,372 g EDTA pH 7.4'e HCl ile ayarlanır, dH ₂ O ile 1 litreye tamamlanır.	5 M NaCl (30 ml) 8,77 g NaCl dH ₂ O ile 30 ml'e tamamlanır.	CTAB/NaCl (100 ml) 4,1 g NaCl 10 g CTAB (yavaşça eklenir) ısıtılarak (≈ 55-60 °C) dH ₂ O ile 100 ml'e tamamlanır.
Soğuk Etanol (%100 ve %70) %100 Etanol ve %70 Etanol -20 °C'de saklanır.	Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol Çözeltisi (25:24:1) 50 ml için; 25 ml Fenol 24 ml Kloroform 1 ml İzoamil Alkol	
Biyokimyasal Tanı Testlerinde Kullanılan Solüsyonlar		
%3'lük Hidrojen Peroksit %30'luk H ₂ O ₂ 'den 1 ml alınır ve dH ₂ O ile 10 ml'e tamamlanır.	Coomassie Brilliant Blue Çözeltisi Coomassie brilliant blue 0,125 gram Etanol 25 ml Asetik asit 3,5 ml dH ₂ O ile 50 ml'e tamamlanır.	

Tablo 6.7: Kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri.

Tampon Çözeltileri	İçerik
Elektroporasyon Tamponu (200 ml)	200 ml için, 44,5 g sakkaroz ve 0,041 g MgCl ₂ tartılır. dH ₂ O ile 200 ml'e tamamlanır ve 121 °C'de 20 dakika otoklavlanır.
TGE Tamponu (Hücre süspansiyon tamponu), pH 8.0 (50 ml)	50 ml için, 0,1514 g Tris-HCl, 0,18612 g EDTA ve 0,4504 g Glikoz tartılır, pH 8.0'e ayarlanır, dH ₂ O ile 50 ml'e tamamlanır.
Tris-EDTA (TE) tamponu (pH 7.4) (1 litre)	1 litre için, 1,21 g Tris ve 0,372 g EDTA tartılır, pH 7.4'e HCl ile ayarlanır, dH ₂ O ile 1 litreye tamamlanır.
Tris-EDTA (TE) tamponu (Lizis tamponu) (pH 7.4)	10 mg/ml lizozim hazırlanırken TE tamponu içerisinde çözdürülür. Bu tampon çözelti endotoksin izolasyonu aşamasında kullanılır.
4X SDS Yükleme Tamponu (20 ml) (Laemmli Tamponu)	4 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 1,6 g SDS, 8 ml %100 Gliserol, 2 ml 0,5 M EDTA, 820 µl β-merkaptoetanol, 16 mg Bromofenol mavisi dH ₂ O ile 20 mililitreye tamamlanır.
50X TAE Tamponu (200 ml)	200 ml için, 48,4 g Tris tartılır ve 11,42 ml Glasiyal Asetik Asit ile 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) eklenerek dH ₂ O ile 200 mililitreye tamamlanır.
1X TAE Tamponu (1 Litre)	1 litre hazırlamak için, 20 ml 50X TAE çözeltisinin üzerine 980 ml dH ₂ O eklenir. Homojen karıştırılır ve 1 L 1X TAE tamponu elde edilir.
R Buffer (Thermo Scientific) Tango Buffer (Thermo Scientific)	Kullanıma hazır halde teslim edilir, -20 °C'de saklanır.
Taq Polimeraz Tamponu (Thermo Scientific)	Kullanıma hazır halde teslim edilir, -20 °C'de saklanır.

6.1.8. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada kullanılan bakteri suşları ve genetik özellikleri Tablo 6.8'de listelenmiştir. Çalışmada kullanılan yaban suş (*Bti* ATCC 35646), Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edilmiştir. *Bti*'nin genetik modifikasyonları ile elde edilen rekombinant suşlar Doruk, 2013 ve Barkad, 2021'in çalışmalarından temin edilmiştir [Doruk vd, 2013; Barkad vd., 2021]. Diğer yandan, böcekten izole edilen *Bt* benzeri izolatlar numaralandırılarak isimlendirilmiş ve bu çalışmada elde edilmiştir.

Tablo 6.8: Bu çalışmada kullanılan suşlar ve plazmidler.

Bakteriyel Suşlar	Genotipik Özellikler	Kaynak
<i>Escherichia coli</i> türleri		
ET12567	<i>dam, dcm, hsdS, cat, tet</i>	MacNeil vd., 1992
<i>E. coli</i> ET12567 pHT315 <i>ppk</i>	pHT315 <i>ppk</i> plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> ET12567	Doruk, 2013
<i>E. coli</i> ET12567 pHT315 <i>lon</i>	pHT315 <i>lon</i> plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> ET12567	Barkad, 2021
<i>Bacillus thuringiensis</i> türleri		
<i>Bti</i>	ATCC 35646 – yaban suş	ATCC
<i>Bti</i> pHT315	pHT315 plazmidini taşıyan <i>Bti</i>	Doruk, 2013
<i>Bti</i> pHT315 <i>ppk</i>	pHT315 <i>ppk</i> plazmidini taşıyan <i>Bti</i>	Doruk, 2013
<i>Bti</i> pHT315 <i>lon</i>	pHT315 <i>ppk</i> plazmidini taşıyan <i>Bti</i>	Barkad, 2021
<i>Bti</i> Δ <i>ppk</i>	Δ <i>ppk</i> rekombinant suş	Doruk, 2013
Böcekten izole edilen <i>Bti</i> benzeri suşlar		
İzolat Numarası (Numaralar halinde isimlendirilmiştir.)	1, 4, 5, 6A, 7, 9, 16, 19	Bu çalışma

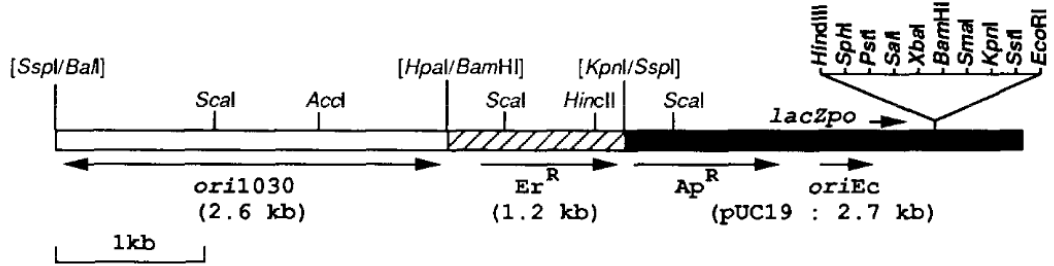
6.1.9. Plazmidler

Bu çalışmada kullanılan temel rekombinant plazmidlerin detaylarına ait bilgiler Tablo 6.9’da verilmiştir. *E. coli*–*Bacillus* mekik vektörü olan pHT315 eritromisin (Ery^r) ve ampisilin (Amp^r) direnç genlerini taşımaktadır. Doruk (2013), çalışmasında bu vektörü temel alarak pHT315*ppk* rekombinant plazmidini, Barkad (2021) ise pHT315*lon* rekombinant plazmidini oluşturmuştur [Doruk vd, 2013; Barkad vd., 2021]. pHT315 plazmidine ait harita [Arantes ve Lereclus, 1991] Şekil 6.2’de sunulmuştur.

Tablo 6.9: Bu çalışmada kullanılan plazmidler ve özellikleri.

Plazmidler	Açıklama	Kaynak
pHT315	<i>E. coli</i> – <i>Bacillus</i> arasında çalışan (shuttle) vektör, 6.5 kb, Ery ^r , Amp ^r direnci taşır.	Arantes ve Lereclus, 1991
pHT315 <i>ppk</i>	<i>ppk</i> geni pHT315 plazmidine klonlanmıştır.	Doruk, 2013
pHT315 <i>lon</i>	<i>lon</i> geni pHT315 plazmidine klonlanmıştır.	Barkad, 2021

Kısaltmalar: Ery^r → Eritromisin direnci ve Amp^r → Ampisilin direnci



Şekil 6.2: pHT315 plazmid haritası [Arantes ve Lereclus, 1991].

6.1.10. Primerler

Bu tez çalışmasında, rekombinant plazmidlerin doğrulanması ve hedef gen bölgelerinin varlığının kontrolü amacıyla özgül primerler kullanılmıştır. Kullanılan plazmidlere ait sekans bilgisi, PCR sonucu elde edilen ürün uzunluğu ve kullanım amaçlarına Tablo 6.10'da yer verilmiştir.

Tablo 6.10: Kullanılan primerler ile ilgili bilgiler.

Primer Adı	Dizi (5' → 3')	PCR Ürün Uzunluğu	Kullanım Amacı
<i>Bti-ppk-F</i>	5'-AGAGCAGCGAGAATTTATAG-3'	538 bç	<i>ppk</i> geninin varlığını doğrulamak için kullanılır.
<i>Bti-ppk-R</i>	5'-TAAATCTAATGGCCCATCCA-3'		
<i>Bti-lon-F</i>	5'-CTTGTTGGTTGGTGACGTA-3'	2204 bç	<i>lon</i> geninin varlığını doğrulamak için kullanılır.
<i>Bti-lon-R</i>	5'-GGGATTGGCGGATCTAATG-3'		
<i>Bti-apr-F</i>	5'-ATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'	1382 bç	Δppk suşlarında <i>apr</i> geninin genomda <i>ppk</i> yerine başarılı entegrasyonunu doğrulamak için kullanılır.
<i>Bti-apr-R</i>	5'-TGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'		
F- <i>ert-notI</i>	5'-ATAAGAATGCGGCCGCTAAACT ATCTTAGAAGCAAACCTAAGAG-3'	1200 bç	Plazmid üzerinde bulunan <i>erm</i> geninin varlığını doğrulamak amacıyla kullanılır.
R- <i>ert-speI</i>	5'-GACTAGTCATCGATACAAA TTCCCCGTAG-3'		

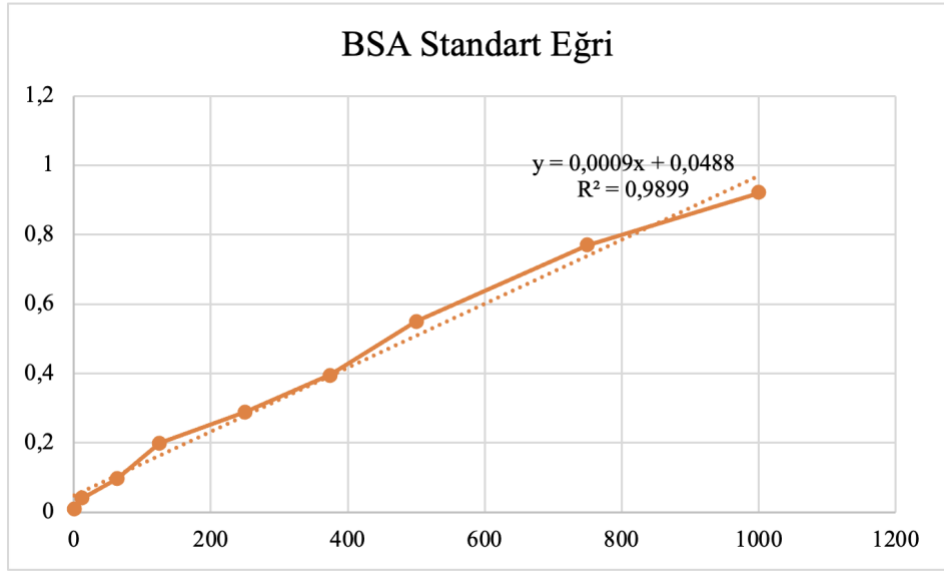
6.2. Metot

6.2.1. *Bti* suşlarından δ -Endotoksin İzolasyonu ve SDS-PAGE

Bti suşlarındaki kristal proteinlerin tespit edilmesi amacıyla spor-kristal kompleksleri, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde analiz edilmiştir. Protein izolasyonu, Donovan ve arkadaşları (1988) tarafından tanımlanan yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir [Donovan vd., 1988]. İlk olarak, bir öze dolusu *Bti* kültürü, uygun antibiyotik (Ery, 25 µg/ml) içeren 10 ml LB sıvı besiyeri bulunan 50 ml'lik Falkon tüplere inoküle edilmiştir. Tüpler 30 °C'de, 180 rpm'de, çalkalamalı inkübatörde 12-16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücrelerin optik yoğunlukları 600 nm dalga boyunda ölçülmüş ve eşit miktarda hücre, uygun antibiyotik bulunduran (Ery, 25 µg/ml) 100 ml Difco Sporülasyon Besiyeri (DSM) içeren Erlenmeyer şişelere aktarılmıştır. 72 saatlik inkübasyon sonunda, 100 ml kültürden 10 ml alınarak 4 °C'de, 4000 rpm'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış, elde edilen hücre peletleri önce 500 µl 1 M NaCl içinde çözölmüş, ardından 7000 rpm'de, 7 dakika santrifüj edilmiştir. Peletler 500 µl saf dH₂O ile yeniden süspanse edilmiş ve bu yıkama işlemi iki kez tekrarlanmıştır. Yıkama sonrası elde edilen peletlerin ıslak ağırlıkları ölçölmüş ve ıslak ağırlıklar tüm örnekler için eşitlenmiştir. Eşitlenen ağırlıklar 100 mg/ml (ıslak ağırlık) olacak şekilde saf dH₂O içinde yeniden süspanse edilmiştir. Her örnekten 50 µl alınarak, 50 µl lizozim içeren lizis tamponu (10 mg/ml lizozim, TE tamponu içerisinde çözdürölmüştür) ile karıştırılmıştır. Lizis tamponu eklenen hücre karışımları 37 °C'de, 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, her tüpe 10 µl %2 SDS eklenmiş, karışımlar 30 saniye vortexlenmiş ve 6000 rpm'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra peletler 50 µl %0,2 SDS içerisinde çözülmüştür.

Protein izolasyonundan sonra Bradford'un geliştirdiği yöntem ile protein miktarı tayin edilmiştir [Bradford, 1976]. Kontrol olarak BSA kullanılmış ve mikrolaka kuyucuklarına 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 ve 24 µg BSA eklenerek standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 6.3). İzole edilen proteinlerden her bir kuyucuğa 1'er µl eklenmiştir. Her kuyucuğa 200 µl Bradford reaktifi ilave edilmiş, oda sıcaklığında karanlıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından absorbans değeri 595 nm'de spektrofotometrik olarak ölçölmüştür.

Yükleme yapılmadan önce 4X SDS yükleme boyası ve protein örneği karışımı 5 dk 90 °C’de bekletilmiştir. Bu işlem sonucunda jellere yüklenmeye hazır hale gelen örneklerden her bir kuyucuğa 10 µl yüklenmiş ve 90 Volt’ta yürütülmüştür. Jel, Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyanmış, ardından boya arındırma çözeltisinde yeterince bekletilerek protein bantları net şekilde görüntülenmiştir.



Şekil 6.3: BSA ile oluşturulan standart eğri grafiği.

6.2.2. Rekombinant Suşların Oluşturulması ve Doğrulanması

6.2.2.1. *E. coli* ET12567 Suşundan Plazmid İzolasyonu

E. coli ET12567 suşlarından plazmid izolasyonu, Sambrook ve ark. (1989) tarafından tanımlanan protokol temel alınarak gerçekleştirilmiştir [Sambrook vd., 1989]. *E. coli* ET12567 hücreleri, 100 µl kloramfenikol 25 (µg/ml) ve 100 µl ampisilin (100 µg/ml) içeren 100 ml LB sıvı besiyerinde 37 °C’de, 200 rpm’de 12–16 saat inkübe edilmiştir. Gece boyunca inkübe edilen kültür 4000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmış, oluşan pelete 800 µl Çözelti I eklenerek vortekslenmiş ve karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Her biri 200 µl içerecek şekilde bu karışım 8 adet Eppendorf tüpüne bölünmüştür. Arından, tüplere taze hazırlanmış 400 µl Çözelti II eklenerek hafifçe ters çevrilmiş ve hemen buz üzerine alınmıştır. Tüm tüpler 5 dakika buzda bekletildikten sonra, her birine 300 µl Çözelti III ilave edilerek hafifçe

karıştırılmış ve tekrar buzda 10 dakika inkübe edilmiştir. 10. dakikanın sonunda tüpler 14.000 rpm’de, 4 °C’de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar yeni Eppendorf tüplerine aktarılmış, her tüpe 600 µl izopropanol eklenerek karıştırılmış ve en az 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Karışımlar, 11.000 rpm’de 30 dakika santrifüjlenmiş, süpernatantlar atılmış ve her pelet 25 µl saf su içinde çözülmüştür. Tüplerden elde edilen örnekler birleştirilerek her 100 µl’lik örneğe 10 µl RNaz (10 mg/ml) eklenmiş ve 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Elde edilen plazmidin saflaştırılması amacıyla, Macherey-Nagel firmasına ait “PCR Clean-up” kiti kullanılmıştır. Üretici firmanın önerdiği talimatlar sonucunda elde edilen plazmidler –20 °C’de saklanmıştır. İzole edilen plazmid DNA’larının konsantrasyonları ve saflık oranları, NanoDrop Lite spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir.

6.2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Plazmid izolasyonu sonrası plazmidleri görüntülemek amacıyla %0,8 agaroz jel hazırlanmıştır. Agaroz tozu, 1X TAE tamponu içerisinde çözündürülerek ısıtılmış ve oda sıcaklığına soğutulduktan sonra RedSafe (Intron) (20.000X) boyası 5 µl/100 ml oranında eklenmiştir. Jel, döküm kalıbına aktarılmış ve oda sıcaklığında polimerize olması beklenmiştir. Plazmid örnekleri TriTrack DNA yükleme boyası (6X) (Thermo Scientific) eklenerek jelin kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektroforez, 1X TAE tamponu içeren tankta 80–100 V’da, 50–60 dakika yürütülmüş ve jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir (ChemiDoc).

6.2.2.3. Rekombinant Plazmidlerin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

Rekombinant plazmidlerin (pHT315*ppk* ve pHT315*lon*) yapısal doğrulamasını sağlamak üzere restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonları uygulanmıştır. Kullanılan enzimler, firmaların önerdiği koşullar doğrultusunda seçilmiş, her enzim için uygun tampon çözeltileri ve inkübasyon sıcaklıkları dikkate alınarak reaksiyonlar hazırlanmıştır. Enzimlerin STAR aktivitesi gösterip göstermedikleri kontrol edilmiştir. Tüm kesim reaksiyonları 37 °C’de gerçekleştirilmiş, ardından agaroz jel elektroforezi (Bio-Rad) ile analiz edilmiştir. Kesilmeyen plazmidler ise kontrollü bir deneyin sağlanması amacıyla jelde karşılaştırma olması amacıyla yüklenmiştir.

6.2.2.4. Rekombinant Plazmidlerin PCR ile Doğrulanması

Rekombinant plazmidlerin varlığı ve taşıdıkları gen bölgelerinin doğrulanması amacıyla, izole edilen pHT315*ppk* ve pHT315*lon* plazmidlerinin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlarda, eritromisin direnç geni taşıyan pHT315 plazmidinin doğrulanması için *erm* genine özgü eritromisin primerleri kullanılırken, plazmidlerin içerdiği genlerin doğrulanması için *ppk* ve *lon* genlerine özgül *ppk* ve *lon* primerleri tercih edilmiştir. Kullanılan primerlere ilişkin bilgiler Tablo 6.10'da verilmiştir. PCR reaksiyonları, Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific) enzimi ile gerçekleştirilmiş olup üretici firmanın önerdiği tampon çözeltiler, enzim konsantrasyonları (Tablo 6.11) ve döngü protokollerine uygun şekilde yürütülmüştür. Primer bağlanma sıcaklıkları, *ppk* primerleri için 53 °C, *erm* ve *lon* primerleri için ise 63 °C olarak optimize edilmiştir (Tablo 6.12). PCR reaksiyonları, PCR Termal Döngüleyici (Applied Biosystems) cihazında toplam 30 döngü olarak yürütülmüştür. PCR ürünleri, %0,8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş (Bio-Rad), sonuçlar için jel görüntüleme cihazı kullanılmıştır (ChemiDoc).

Tablo 6.11: Rekombinant plazmidlerin doğrulanması için kurulan PCR reaksiyonları.

İçerik	Toplam Hacim	Toplam Hacim
dH₂O	14,25 µl	14,25 µl
10X Taq polimeraz Buffer tamponu	2,5 µl	2,5 µl
dNTP karışımı (2.5 mM)	2 µl	2 µl
İleri primer (10 µM)	1 µl	1 µl
Geri primer (10 µM)	1 µl	1 µl
MgCl₂ (25 mM)	2 µl	2 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µL)	0.25 µl	0.25 µl
Şablon DNA	pHT315<i>ppk</i>	pHT315<i>lon</i>
Son Hacim	25 µl	25 µl

Tablo 6.12: Rekombinant plazmidlerin doğrulanması için kurulan PCR döngü detayları.

Aşama	Derece	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95 °C	05:00 dakika	
Denatürasyon	95 °C	00:30 saniye	} 30 döngü
Primer Bağlanması	53-63 °C	00:30 saniye	
Uzama	72 °C	01:30 saniye	
Son uzama	72 °C	05:00 dakika	
Bekleme	4 °C	∞	

6.2.2.5. Elektrokompetan Hücrelerin Hazırlanması ve Elektroporasyon

Elektrokompetan *Bti* hücrelerin hazırlanması ve elektroporasyon işlemi, Macaluso ve Mettus (1991) protokolü temel alınarak, bazı modifikasyonlarla yürütülmüştür [Macaluso ve Mettus, 1991]. *Bti* yaban suşu, antibiyotik içermeyen LB besiyerine inoküle edilerek 37 °C’de bir gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün elde edilen kolonilerden biri, 10 ml antibiyotiksiz BHIG sıvı besiyerine inoküle edilerek 30 °C’de, 200 rpm hızında sallamalı inkübatörde 12–16 saat ön kültür olarak büyütülmüştür. Ertesi gün, 100 ml taze BHIG besiyerine 2 ml ön kültür eklenerek aynı koşullarda inkübasyon sürdürülmüştür. Yaklaşık 1 saatlik inkübasyon sonunda OD₆₀₀ değeri 0,4 seviyesine ulaştığında hücre büyümesi durdurulmuştur. Büyütülen 100 ml kültür 4.000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen hücre peletleri, 20 ml 4 °C elektroporasyon tamponu ile çözülmüş ve tekrar santrifüjlenmiştir. İkinci kez santrifüjlenen peletler, bu kez 2 ml 4 °C elektroporasyon tamponu ile çözülmüş ve 300 µl’lik alikotlar halinde Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Hazırlanan elektrokompetan hücreler –80 °C’de saklanmıştır. Elektrokompetan *Bti* hücrelerinden 0,3 ml alınarak 1 µg plazmid DNA ile karıştırılmış ve buzda soğutulmuş elektroporasyon küvetlerine aktarılmıştır. Elektroporasyon deneyi elektroporator (Gene Pulser Xcell) cihazında gerçekleştirilmiş olup, gerilim, direnç ve kapasitör değerleri Tablo 6.13’te sunulmuştur.

Tablo 6.13: Elektroporasyon deneylerinde transformantların elde edildiği deney koşulları.

Plazmid	Gerilim (V)	Direnç (Ω)	Kapasitör (μ F)
pHT315ppk	2500	200	25
pHT315lon	2500	200	25

Elektroporasyonun ardından transformantların elde edildiği hücre süspansiyonuna 600 μ l 4 °C'ye soğutulmuş antibiyotiksiz sıvı LB eklenmiş ve 37 °C'de, 200 rpm'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 100 μ l hücre süspansiyonu, seçici antibiyotik olan Ery (25 μ g/ml) içeren katı LB besiyerine yayma yöntemi kullanılarak ekilmiş ve 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün oluşan rekombinant kolonilerden birisi seçilerek antibiyotikli katı LB besiyerine (25 μ g/ml Ery) alt kültürlenmiş ve saf kültür elde edilmiştir. pHT315ppk ve pHT315lon plazmidlerini içeren kolonilerin doğruluğu plazmit izolasyonu gerçekleştirildikten sonra hem restriksiyon enzimleri ile kesilerek hem de PCR reaksiyonları gerçekleştirilerek kanıtlanmıştır.

6.2.2.6. *Bti* Suşlarından Plazmid DNA İzolasyonu

Elektroporasyon işleminin ardından oluşturulan rekombinant *Bti* suşlarından (*Bti* pHT315ppk ve *Bti* pHT315lon) plazmid DNA izolasyonu, Birnboim ve Doly (1979) tarafından tanımlanan yöntem esas alınarak, bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir [Birnboim ve Doly, 1979]. İlk olarak, bir öze dolusu alınan *Bti* kültürü, eritromisin (Ery, 25 μ g/ml) içeren 10 ml LB sıvı besiyerine inoküle edilerek 37 °C'de 200 rpm hızında 6–8 saat inkübe edilmiştir. Bu kısa süreli inkübasyonun ardından, kültürden 2 ml alınarak Ery (25 μ g/ml) içeren 100 ml LB sıvı besiyerine aktarılmış ve aynı koşullarda 12–16 saat inkübasyon sürdürülmüştür. Büyütülen 100 ml kültür 4 °C'de 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant atılarak hücre peletleri elde edilmiştir. Peletler, lizozim ve RNaz içeren Çözelti A içerisinde çözdürülmüştür. Karışım, 300 μ l'lik alikotlar halinde Eppendorf tüplerine aktarılmış ve 37 °C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından her bir tüpe taze hazırlanmış Çözelti B'den (SDS ve NaOH içeren) 400 μ l eklenmiş ve karışım buz üzerinde 7 dakika bekletilmiştir. Ardından, her bir tüpe 300 μ l 3 M Potasyum Asetat (pH=4.8) eklenmiş ve tüpler buzda 10–15 dakika bekletildikten sonra 4 °C'de 14.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst faz başka yeni Eppendorf

tüplerine aktarılmış ve her birine 600 µl fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) karışımı ilave edilerek nazıkçe karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeniden yeni bir tüpe aktarılmış, ardından 80 µl 3 M K-Asetat ve 800 µl buz soğukluğunda %100 etanol eklenerek çöktürme işlemi için -20 °C'de en az 2 saat bekletilmiştir. Çökelme sonrasında Eppendorf tüpler 4 °C'de 14.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş, oluşan pelet %70 etanol ile yıkanarak etanol buharlaştırılmıştır. Kurutulan peletler 30 µl saf su içerisinde çözülmüştür. Elde edilen plazmidlerin saflaştırılması amacıyla, Macherey-Nagel firmasına ait "PCR Clean-up" kiti kullanılmıştır. Kit protokolü üretici firmanın yönergelerine uygun olarak uygulanmıştır. Saflaştırılan plazmidler -20 °C'de saklanmış, konsantrasyon ölçümü ise NanoDrop Lite Spektrofotometre (Thermo Scientific) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyonun doğruluğu %0,8'lik agaroz jel elektroforezi (Bio-Rad) ile teyit edilmiştir.

6.2.2.7. *Bti* suşlarından Genomik DNA İzolasyonu

Bti suşlarından genomik DNA izolasyonu, Wilson (2001) tarafından tanımlanan protokolde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir [Wilson, 2001]. İlk olarak, bir öze dolusu *Bti* kültürü, 10 ml sıvı LB besiyerine inoküle edilerek 37 °C'de, 200 rpm'de, 6–8 saat inkübe edilmiştir. Ardından, bu kültürden 1 ml alınarak 50 ml taze LB sıvı besiyerine aktarılmış ve aynı koşullarda inkübasyon 12–16 saat sürdürülmüştür. Elde edilen hücre kültürü 4 °C'de, 4.000 rpm'de, 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Hücre peletleri, Tris-EDTA tamponu (pH 7.4) içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Çözeltiye lizozim (10 mg/ml) eklenmiş ve karışım 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından, karışıma 1 ml 5 M NaCl ve 1 ml CTAB/NaCl çözeltisi ilave edilerek elde edilen karışım 65 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemde sonra, toplam hacme eşdeğer miktarda kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenerek karışım 11.000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve hacim kadar fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) çözeltisi eklenerek aynı koşullarda tekrar santrifüj edilmiştir. Ardından, bir kez daha üst faz alınıp hacim kadar kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenmiş ve santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Son olarak, üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve karışıma 4 °C'ye soğutulmuş %100 etanol eklenerek DNA'nın çöktürülmesi için -20 °C'de en az 2 saat bekletilmiştir. Sonrasında tüpler 4 °C'de, 14.000 rpm'de, 30 dakika santrifüj

edilmiştir. Elde edilen genomik DNA peletleri, %70 etanol ile yıkanarak etanol buharlaştırılmış; ardından 30 µl saf su içinde çözülmüştür. Elde edilen genomik DNA örnekleri -20 °C’de saklanmış, konsantrasyon ölçümleri NanoDrop Lite Spektrofotometre (Thermo Scientific) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyonun doğruluğu, agaroz jel elektroforezi (Bio-Rad) ile doğrulanmıştır.

6.2.2.8. *Bti* Δ *ppk* Suşunun PCR ile Doğrulanması

Bti Δ *ppk* mutant suşunun genotipik doğrulaması amacıyla, *ppk* ve *apr* gen bölgelerine özgül primer setleri (Tablo 6.10) ile PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu doğrulama çalışmasında, şablon DNA olarak *Bti* yaban suş ve *Bti* Δ *ppk* suşlarına ait genomik DNA’lar kullanılmıştır. PCR protokolü, daha önce *E. coli* kaynaklı plazmitlerde uygulanan yöntemle aynı olup detaylar Bölüm 6.2.2.4’te açıklanmıştır. Reaksiyonlar, üretici firmanın önerdiği tampon sistemi, enzim konsantrasyonu ve termal döngü koşullarına uygun şekilde, Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific) kullanılarak yürütülmüştür. *ppk* primerlerinin optimum bağlanma sıcaklığı 53 °C, *apr* primerleri için ise 63 °C olarak optimize edilmiştir. PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüş, sonuçlar Bio-Rad (ChemiDoc) jel görüntüleme cihazıyla analiz edilmiştir.

6.2.3. *Bti* Δ *ppk* Suşunun Optimizasyon Çalışmaları

6.2.3.1. Büyüme Eğrisinin Oluşturulması ve Sporlanma Kapasitesinin Belirlenmesi

Bti Δ *ppk* suşunun büyüme eğrisini belirlemek amacıyla -80 °C gliserol stoğu kullanılan bakteri LB agarda 30 °C’de 12-16 saat inkübe edilmiştir. Tek koloniden alınan örnek 10 ml LB broth içerisine inoküle edilmiş ve 30 °C’de, 180 rpm’de 12–16 saat ön kültür hazırlanmıştır. Ertesi gün ön kültür OD₆₀₀ değeri spektrofotometrede ölçülmüş ve eşit hücre yoğunluğu sağlanacak şekilde 100 ml DSM besiyerine 3 biyolojik tekrar halinde inoküle edilmiştir. Referans suşu olarak *Bti* yaban suş kullanılmıştır.

Bakteri kültürleri 72 saat boyunca 30 °C’de, 180 rpm’de inkübe edilmiştir. 0., 2., 4., 6., 8., 10., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde 3 biyolojik tekrar halinde örnekler alınmıştır. Büyüme OD₆₀₀ değerleri spektrofotometrede ölçülmüştür.

Sporlanmanın kantitatif olarak değerlendirilmesi için 24., 48. ve 72. saatlerde alınan örneklerle, Schaeffer ve Fulton (1933) tarafından geliştirilen protokole göre spor

sayımı yapılmıştır. Bu yöntemde kültürlerden alınan 1 ml örnek, 80 °C’de 10 dakika ısı işlemine tabi tutulmuş ve ardından buzda soğutulmuştur. Daha sonra %0,85 NaCl kullanılarak seri dilüsyonlar hazırlanmış, elde edilen süspansiyonlar LB agara ekilmiş ve 30 °C’de 24–48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni oluşturan birimler (CFU/ml) sayılarak log₁₀ değerleri hesaplanmıştır [Schaeffer ve Fulton, 1933].

6.2.3.2. Farklı İnkübasyon Sürelerinin δ -Endotoksin Üretimine Etkisi

Farklı inkübasyon sürelerinin *Bti* Δ *ppk* suşunda δ -endotoksin üretimi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, mutant ve yaban suş DSM besiyerinde 180 rpm 30 °C’de 24, 48, 72, 96 ve 120 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından elde edilen hücrelerden δ -endotoksin izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen protein profilleri SDS-PAGE analizi ile değerlendirilmiştir.

6.2.3.3. Farklı Sıcaklık ve pH Değerlerinin δ -Endotoksin Üretimine Etkisi

Farklı sıcaklıkların *Bti* Δ *ppk* suşunun δ -endotoksin üretimi üzerindeki etkisini araştırmak için mutant ve yaban suş, 25 °C, 30 °C ve 37 °C’de 180 rpm’de DSM besiyerinde 72 saat büyütülmüş, inkübasyonun ardından elde edilen hücrelerden δ -endotoksin izolasyonu yapılmış ve SDS-PAGE analizleri ile protein profilleri değerlendirilmiştir.

Farklı pH değerlerinin δ -endotoksin üretimi üzerindeki etkisini değerlendirmeye yönelik yapılan deneylerde DSM besiyerinin başlangıç pH’sı 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olacak şekilde, HCl ve KOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Her bir pH grubunda kültürler, standart inkübasyon koşulları (30 °C, 180 rpm) altında 72 saat büyütülmüştür. δ -endotoksin izolasyonu, önceki protokollere uygun biçimde yürütülmüştür.

6.2.3.4. Farklı Karbon Kaynaklarının δ -Endotoksin Üretimine Etkisi

Bti suşlarından δ -endotoksin izolasyonu için uygulanan standart protokol referans alınarak, *Bti* Δ *ppk* ve yaban suşun DSM besiyerindeki farklı karbon kaynaklarının endotoksin üretimi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılan DSM besiyerinin içeriği,

standart formülasyona uygun şekilde hazırlanmış ancak besiyerinde karbon kaynağı olarak glikoz yerine nişasta, mannitol ve sükroz kullanılmıştır. δ -endotoksin izolasyonu, önceden anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Bu deneyde, literatürde yaygın olarak kullanılan gram/L yaklaşımı benimsenmiştir. DSM besiyerinde standart olarak 1 litre başına 5 g glikoz kullanıldığından, bu çalışmada da karşılaştırmalı analiz yapılabilmesi amacıyla diğer karbon kaynakları olan sükroz, mannitol ve nişasta, her biri litre başına 5 g olacak şekilde besiyerine eklenmiştir. Glikoz ve sükroz, %50 (w/v) stok çözeltiler halinde hazırlanmış ve 0,22 μ m membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Mannitol, 5 g olarak doğrudan DSM besiyerine eklenmiş ve otoklav ile sterilize edilmiştir. Nişasta ise 5 g olarak DSM içine ilave edilmiş, tamamen çözünmesi için sürekli karıştırılarak ısı uygulanmış, ardından otoklav ile sterilizasyonu sağlanmıştır. Tüm karbon kaynağı denemelerinde kültürler standart inkübasyon koşullarına uygun şekilde, 30 °C’de, 180 rpm çalkalama hızında ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda endotoksin izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen proteinler SDS-PAGE yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu deney setinde kullanılan karbon kaynaklarına ait detaylı bilgiler Tablo 6.14’te sunulmuştur.

Tablo 6.14: DSM besiyerinde kullanılan farklı karbon kaynaklarına ait bilgiler.

Karbon Kaynağı	Kimyasal Formül	Stok Derişim	1 L için Kullanılan Hacim	Sterilizasyon Yöntemi
Glikoz	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	%50 w/v	10 ml	0,22 μ m membran filtre
Nişasta	$C_{12}H_{22}O_{11}$	-	5 gram	Otoklav
Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	-	5 gram	Otoklav
Sükroz	$(C_6H_{10}O_5)_n$	%50 w/v	10 ml	0,22 μ m membran filtre

6.2.4. Sivrisinek Larvalarıyla Toksisite Çalışması

Bti yaban suşu ve *Bti* Δ *ppk* suşundan 72 saatlik fermantasyon süreci sonunda elde edilen endotoksin proteinlerinin biyolojik etkinliği, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen biyotest protokolü esas alınarak değerlendirilmiştir [WHO, 1999]. *Bti* suşlarından edilen proteinler 0,005, 0,01, 0,02 ve 0,04 mg/l konsantrasyonlarında hazırlanmış ve her doz grubu iki tekrarla test edilmiştir. Deneyler, 2. ve 3. evre *Culex*

pipiens larvaları ile gerçekleştirilmiş ve her konsantrasyon grubu için 10 larva kullanılmıştır. Uygulamadan sonra larvalar 6 saat boyunca izlenmiş, her saat sonunda ölü larvalar kaydedilmiştir. Ölüm oranları, her iki tekrarın ortalaması alınarak değerlendirilmiştir. Elde edilen mortalite verileri, LC_{50} ve LC_{90} değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Analiz sürecinde, dozlara karşılık gelen mortalite oranları bireysel gözlemlere dönüştürülmüş (ölü = 1, canlı = 0) ve logaritmik dönüşüm ($\log_{10}$) uygulanarak Probit regresyon modeli kurulmuştur. Model parametreleri kullanılarak, her suş için %50 ve %90 mortaliteye karşılık gelen konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Analizler boyunca Excel tabanlı hesaplamalardan yararlanılmıştır.

6.2.5. *Bti* suşlarının Fermentör Ölçeğinde Büyütülmesi

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen fermentör çalışmalarının ilk aşamasında, 5 L kapasiteli Eppendorf BioFlo 120 fermentöründe (biyoreaktör) fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Kültürler DSM besiyerinde, pH 7.0 sabit tutulacak şekilde, %20 çözülmüş oksijen (DO) seviyesi hedeflenerek ve 30 °C’de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ancak istenilen verim alınamadığı için deneylerin devamında 2 L kapasiteli Applikon biyoreaktörü kullanılmıştır.

Bti Δppk suşunun fermentasyonu laboratuvar ölçekli bir fermentörde (2 L, Applikon, Getinge, Hollanda) gerçekleştirilmiştir. Ön kültür hazırlığı, bakterinin hem katıdan sıvıya geçiş adaptasyonunu hem de besiyeri adaptasyonunu sağlamak amacıyla iki aşamalı olarak yürütülmüştür. İlk aşamada, LB agar üzerinde büyütülen *Bti* Δppk kolonilerinden steril öze yardımıyla alınan inokulum, 10 ml sıvı LB besiyerine eklenmiş ve 180 rpm’de, 30 °C’de 6 saat inkübe edilmiştir. İkinci aşamada, bu kültürden %2 oranında alınan inokulum, 100 ml DSM besiyeri içeren steril 500 ml’lik Erlenmeyer şişelerine aktarılmış ve aynı koşullarda 12–16 saat çalkalamalı inkübatörde büyütülerek ön kültür elde edilmiştir.

Fermentasyondan bir gün önce, toplam 1 L DSM besiyeri hazırlanmış ve 2 L çalışma hacmine sahip fermentöre aktarılmıştır. Besiyeri içeren fermentör, 121 °C’de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon öncesi pH probunun kalibrasyonu yapılmış, sterilizasyon sonrası pH probu iyon stabilizasyonu için gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün, tamamen soğumuş besiyerine aseptik koşullarda 20 ml %50 glikoz çözeltisi (0,22 µm filtreden geçirilerek steril edilmiş) ve 3–4 damla köpük kesici (otoklavda steril edilmiş) ilave edilmiştir. Ardından oksijen probu kalibre

edilmiş ve hazırlanan ön kültür %2 inokulum olacak şekilde 20 ml olarak aseptik şartlarda fermentör içerisine eklenerek fermentasyon başlatılmıştır. Fermentasyon 72 saat boyunca, 30 °C sıcaklıkta, 1,5 VVM (Litre hava / litre kültür hacmi / dakika) hava akışı, 200 rpm karıştırma hızı ve %20 çözülmüş oksijen (DO) seviyesi hedeflenerek yürütülmüştür. pH 8.0 değerinde sabit tutulmuş, bu amaçla baz beslemesi 3 M NaOH çözeltisi ile sağlanmış, asit beslemesi uygulanmamıştır.

6.2.5.1. Gram Boyama

Kültür homojenliğini ve kültürün kontamine olup olmadığını değerlendirmek amacıyla belirli saatlerde alınan örneklerle Madigan ve ark., (2018) tarafından tanımlanan klasik Gram boyama protokolü uygulanmıştır [Madigan vd., 2018]. Sıvı kültürden bir miktar alınan örnek ile preparat hazırlanmış, hazırlanan preparat oda sıcaklığında kurutulmuş ve ardından bek alevinden 1–2 kez geçirilerek sabitlenmiştir (fikse edilmiştir). Fiksasyon sonrasında, preparat sırasıyla; 1 dakika kristal viyole ile boyanmış ve musluk suyu ile yıkanmıştır. Ardından 1 dakika süreyle Lugol çözeltisi ile muamele edilip tekrar yıkanmıştır. Daha sonra preparatlar alkol-aseton karışımıyla kısa süre işlem görmüş ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Ardından 1 dakika süreyle safranin ile karşıt boyama yapılmıştır. Son aşamada preparatlar son kez yıkanarak açık havada kurutulmuş ve ışık mikroskobuna immersiyon yağı damlatılarak 100X objektif lens ile incelenmiştir.

6.2.5.2. Spor Sayımı

Sporlanmanın kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla, 24., 48. ve 72. saatlerde alınan örneklerle Schaeffer ve Fulton (1933) tarafından geliştirilen protokole göre spor sayımı yapılmıştır. Bu yöntemle ilişkin detaylı bilgiler “6.2.3.1. Büyüme Eğrisinin Oluşturulması ve Sporlanma Kapasitesinin Belirlenmesi” başlığı altında sunulmuştur.

6.2.5.3. Kristal Proteinlerin Coomassie Brilliant Blue ile Boyanması

24., 48. ve 72. saatlerde alınan kültür örneklerindeki kristal inklüzyon yapılarının varlığı Sharif ve Alaeddinoğlu (1988) tarafından önerilen Coomassie Brilliant Blue çözeltisinin kullanıldığı prosedür ile gerçekleştirilmiştir [Sharif ve Alaeddinoğlu, 1988]. Öncelikle kültürden alınan örnek temiz cam lamalar üzerine yayılmış ve oda sıcaklığında tamamen kuruyana kadar bekletilerek preparat hazırlanmıştır. Kuruyan

preparat, bek alevinden 1–2 kez hızlıca geçirilerek fikse edilmiştir. Fikse edilen preparat üzerine hazırlanan Coomassie Brilliant Blue boya çözeltisi damlatılmış ve yaklaşık 3 dakika süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda preparat yavaşça musluk suyu ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmış ve kuruması için açık havada bekletilmiştir. Tamamen kuruyan preparat, immersiyeon yağı damlatılarak 100X objektif lens altında ışık mikroskopunda incelenmiştir [Sharif ve Alaeddinoğlu, 1988].

6.2.6. Doğal Kaynaklardan *Bt* Benzeri Suşların İzolasyonu

6.2.6.1. Olası *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Türü Bakterilerin İzolasyonu

Bu çalışma için gerekli olan karışık böcek örnekleri İstanbul ili, Tuzla ilçesi, Göçbeyli Köyü'nden Haziran 2024 tarihinde toplanmıştır. Laboratuvara getirilen ergin ve sağlıklı böcekler steril bir kaba yerleştirilmiştir. Toplanan böcek örneklerinin %70 etanol ile yüzey dezenfeksiyonu sağlanmış ve ardından böcekler steril distile su ile durulanmıştır [Bozlağan vd., 2010].

Bt türü bakterilerin izolasyonu, Lancini ve Lorenzetti (1993) tarafından yayımlanan *Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites* kitabında açıklanan bakteri izolasyonu yönteminde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir [Lancini ve Lorenzetti, 1993]. Yüzey sterilizasyonu sağlanan böceklerden homojen bir solüsyon elde etmek üzere böcekler steril bir havana yerleştirilmiş ve ezilmiştir. Homojenize edilen böcek dokusu 10 ml steril distile su ile karıştırılıp oluşan süspansiyon steril 50 ml'lik Falkon tüpüne alınmıştır. Tüpe alınan süspansiyon oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Sporlu bir bakteri olan *Bt* türü bakterilerin sporlu olmayan bakterilerden elimine edebilmek amacıyla ısıt işlem ve %50 etanol uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple, elde edilen 10 ml süspansiyonun yarısı ısıt işlem uygulaması için, kalan yarısı ise %50 etanol uygulaması için ayrılmıştır. Deney planına dair detaylı bilgiler Tablo 6.15'te verilmiştir. Isıt işlem uygulaması için ayrılmış olan 5 ml'in yarısı 80 °C'de 10 dakika, kalan yarısı ise 80 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Diğer yandan, %50 etanol ile işlem görülmek üzere ayrılan 5 ml'in yarısı %50 etanolde (2,5 ml süspansiyon üzerine 2,5 ml etanol eklenmiştir) 1 saat, diğer yarısı ise 2 saat boyunca bekletilmiştir.

Tablo 6.15: İzolasyon deneylerinde sporlanan bakterilerin seçimi için uygulanan ön işlem koşulları.

İşlem	Toplam Miktar	Kullanılacak Miktar	Koşullar
Isıl işlem	5 ml	2,5 ml	80 °C’de 10 dakika bekletilmiştir.
		2,5 ml	80 °C’de 20 dakika bekletilmiştir.
%50 etanol uygulaması	5 ml	2,5 ml	%50 etanol 1 saat (25 °C) bekletilmiştir.
		2,5 ml	%50 etanolde 2 saat (25 °C) bekletilmiştir.

Seri olarak seyreltilen hücre süspansiyonları, sporların korunması ve vejetatif hücrelerin eliminasyonu amacıyla yapılan ön işlemler sonrasında, nalidiksik asit (25 mg/ml) ve nistatin (50 mg/ml) içeren [Gruft, 1965; Al-Obaidy, 2014] LB agar plakalarına yayılmıştır. Hazırlanan LB plakaları 30 °C’de 24–48 saat inkübe edilmiştir. İzolatlar, ilk inkübasyondan sonra TSA veya TSB besiyerinde büyütülmüştür.

6.2.6.2. Koloni Morfolojisine Dayalı Ön Seçim

TSA besiyerinde 24–48 saatlik inkübasyon sonrası oluşan koloni morfolojileri gözlemlenmiş, krem beyaz renkte, dairesel, kabarık yapılı ve düzgün kenarlı olanlar literatürde *Bacillus thuringiensis* için tanımlanan kriterlere göre seçilmiştir [Mallick vd., 2023; Zothansanga vd., 2016].

6.2.6.3. Gram Boyama

Seçilen izolatlara, Madigan ve ark., (2018) tarafından tanımlanan klasik Gram boyama protokolü uygulanmıştır [Madigan vd., 2018]. Gram boyama prosedürü için izolatlar TSA besiyerinde 30 °C’de 1 gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Uygulanan protokol “6.2.5.1. Gram Boyama” başlığı altında detaylandırılmıştır.

6.2.6.4. Spor Boyama

Schaeffer ve Fulton (1933) tarafından geliştirilen protokole göre spor boyama işlemi uygulanmıştır [Schaeffer ve Fulton, 1933]. Spor boyama için bakteri kültürleri TSA besiyerinde en az 3 gün boyunca 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra

preparatlar hazırlanmıştır: Temiz lamalar üzerine dH₂O damlatılarak bakteri kültürleri yayılmış ve hava ile kurutulduktan sonra lamalar 1–2 kez bek alevinden geçirilerek fiksasyon sağlanmıştır. Fikse edilmiş preparatlar, %5’lik malaşit yeşili çözeltisi ile tamamen kaplanarak kaynama noktasına yakın sıcaklıkta (buhar çıkışı oluşacak şekilde) 15 dakika boyunca hafif ısı altında tutulmuştur. Bu süre boyunca boya miktarında azalma gözlenirse üzerine taze boya ilavesi yapılmıştır. Isıl işlemin ardından lamalar musluk suyu altında yaklaşık 30 saniye süreyle yıkanmıştır. Ardından, zıt boyama amacıyla preparatlar %5’lik safranin çözeltisi ile 1 dakika süreyle boyanmış ve tekrar su ile yıkanarak açık havada kurutulmuştur. Boyama işlemi tamamlanan lamalar, ışık mikroskopunda immersiyon yağı damlatılarak 100X objektif lens ile incelenmiştir [Schaeffer ve Fulton, 1933].

6.2.6.5. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Loewen ve Switala (1987) tarafından bildirilen yöntem temel alınarak, izolatlarda katalaz enzimi varlığının belirlenmesi amacıyla, katalaz testi uygulanmıştır [Loewen ve Switala 1987]. Bunun için, temiz lam üzerine önceden hazırlanmış %3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılmış ve üzerine katı besiyerinde büyümüş taze bakteri kolonisi öze yardımıyla aktarılmıştır. Test sonucunda katalaz pozitif izolatlarda lam üzerinde hızlı şekilde oksijen kabarcıkları gözlenmiştir. Oksijen kabarcıkları çıkaran suşların çıkardıkları oksijen miktarları referans suşu olan *Bti* yaban suşu ile karşılaştırılmıştır [Loewen ve Switala, 1987].

6.2.6.6. Kristal İnküzyon Yapıların Coomassie Brilliant Blue ile Boyanması

Kristal inklüzyon yapılarının varlığı Sharif ve Alaeddinoğlu (1988) tarafından önerilen Coomassie Brilliant Blue çözeltisi ile boyama prosedürü ile gerçekleştirilmiştir [Sharif ve Alaeddinoğlu, 1988]. Kristal yapıların yeterince salgılanabilmesi amacıyla izolatlar LB agar besiyerinde 72 saat boyunca 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Protokole ait tüm detaylı bilgiler “6.2.5.3. Kristal Proteinlerin Coomassie Brilliant Blue ile Boyanması” başlığı altında sunulmuştur.

6.2.6.7. SDS-PAGE Analizi

İzolatlara ait spor-kristal komplekslerinden endotoksin proteinleri izole edilmiş [Donovan vd., 1988] ve SDS-PAGE analizi [Laemmli, 1970] uygulanmıştır. Protokole ait tüm detaylı bilgiler “6.2.1. *Bti* suşlarından Endotoksin İzolasyonu ve SDS-PAGE” başlığı altında sunulmuştur.

6.2.6.8. Biyolojik Aktivite Deneyleri

72 saatlik fermentasyon sürecinin sonunda elde edilen endotoksin proteinlerinin biyolojik etkinliği, Dünya Sağlık Örgütü’nün önerdiği biyotest protokolü [WHO, 1999] esas alınarak değerlendirilmiştir. Protokol detaylarına ait bilgiler Bölüm 6.2.4’te verilmiştir.

6.2.6.9. İzolatların Saklanması

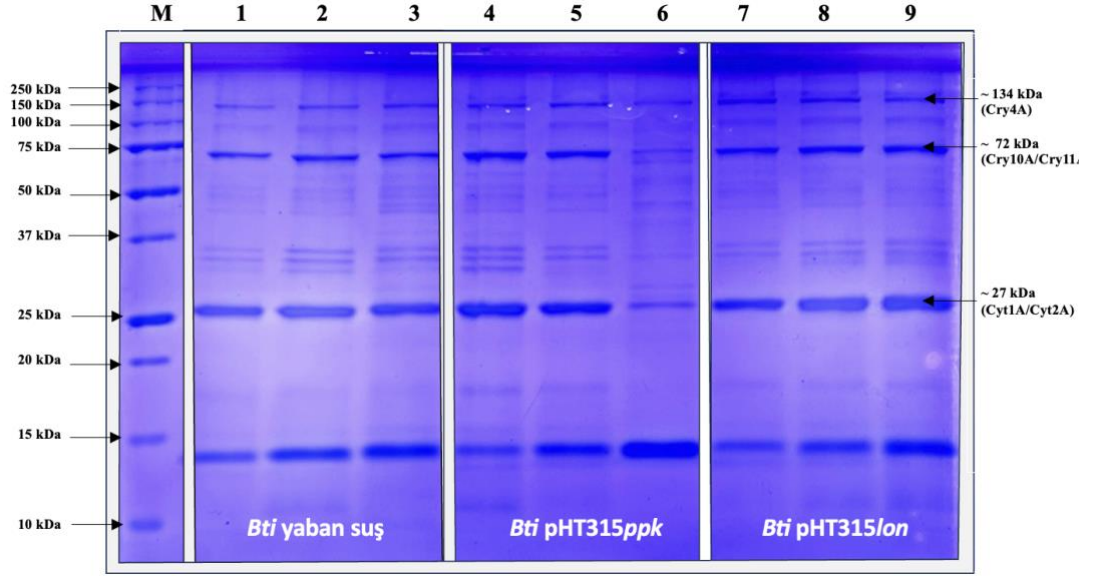
Ön-tanımlamaları yapılan izolatların uzun süreli muhafazası, %40 gliserol içeren ortamda -80 °C’de dondurularak gerçekleştirilmiştir. Bunun için, öncelikle TSB sıvı besiyerine inoküle edilen izolatlar, 30 °C’de 180 rpm’de 6 saat boyunca ön kültür olarak inkübe edilmiştir. Elde edilen bu ön kültürden %2 oranında inokulum alınarak taze TSB besiyerine aktarılmış ve aynı koşullarda 12–16 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, 500 µl %40’lık steril gliserol çözeltisi içeren Eppendorf tüplerine, gece boyunca inkübe edilmiş kültürden 500 µl ilave edilerek toplam 1 ml hacme ulaşılmıştır. Hazırlanan gliserol stokları etiketlenip -80 °C’ye kaldırılmıştır.

7. SONUÇLAR

Çalışma kapsamında öncelikle, laboratuvarımızda daha önceki çalışmaların sonucunda elde edilmiş olan yüksek üretici rekombinant suşlar ve *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) yaban suşun kristal protein üretimleri karşılaştırılmıştır. Polifosfat kinaz (*ppk*) ve Lon proteaz (*lon*) genlerini yüksek düzeyde ifade eden bu rekombinant suşlardan (*Bti* pHT315*ppk* ve *Bti* pHT315*lon*) izole edilen kristal proteinlerin SDS-PAGE analizleri Şekil 7.1’de verilmiştir. *Bti* ATCC 35646 suşuna ait protein profillerinde yaklaşık olarak 130 kDa, 80 kDa, 72 kDa, 30 kDa ve 27 kDa civarında bantlar gözlemlenmiştir. Bu bantlar sırasıyla literatürde bu suшта bulunduğu bildirilen cry4, cry10, cry11, cyt1 ve cyt2 genlerinin kodladığı δ -endotoksin proteinleri ile uyumludur. ~130 kDa civarındaki bant, Cry4A/B proteinlerine karşılık gelmekte olup, bu kristal toksinler *Bti*’nin larvasit etkisinde temel rol oynamaktadır. 72–80 kDa aralığında gözlemlenen yoğun bantlar, Cry10A ve Cry11A proteinlerinin yüksek ekspresyonuna, ayrıca 27–30 kDa aralığında gözlemlenen bantlar ise sitolitik aktivite gösteren Cyt1A ve Cyt2A proteinlerine işaret etmektedir [Ejiofor & Johnson, 2002].

Daha önce yapılmış çalışmalara göre hem *Bti* pHT315*ppk* hem de *Bti* pHT315*lon* suşunun yaban suşına göre daha fazla δ -endotoksin ürettiği bilinmektedir [Doruk vd., 2013; Barkad vd., 2021]. Ancak Şekil 7.1’de görüldüğü gibi rekombinant suşlar yüksek toksin üretim profillerini kaybetmişlerdir. Bu durumun, suşların uzun süre –80 °C’de muhafaza edilmelerine bağlı olduğu düşünüldüğünden söz konusu suşlar tez çalışması kapsamında yeniden hazırlanmıştır.

Bti pHT315*ppk* hem de *Bti* pHT315*lon* suşlar tekrar hazırlandıktan sonra çalışmaya, *ppk* geni daha önceki çalışmalarda silinmiş olan *Bti* Δppk suşu da dahil edilmiştir. Bu rekombinant suşlarla sürdürülen deneylerin yanında, çalışma kapsamında farklı türlere ait ölü böceklerden doğal *Bt* benzeri suşlar izole edilerek toksisiteleri çalışılmıştır.



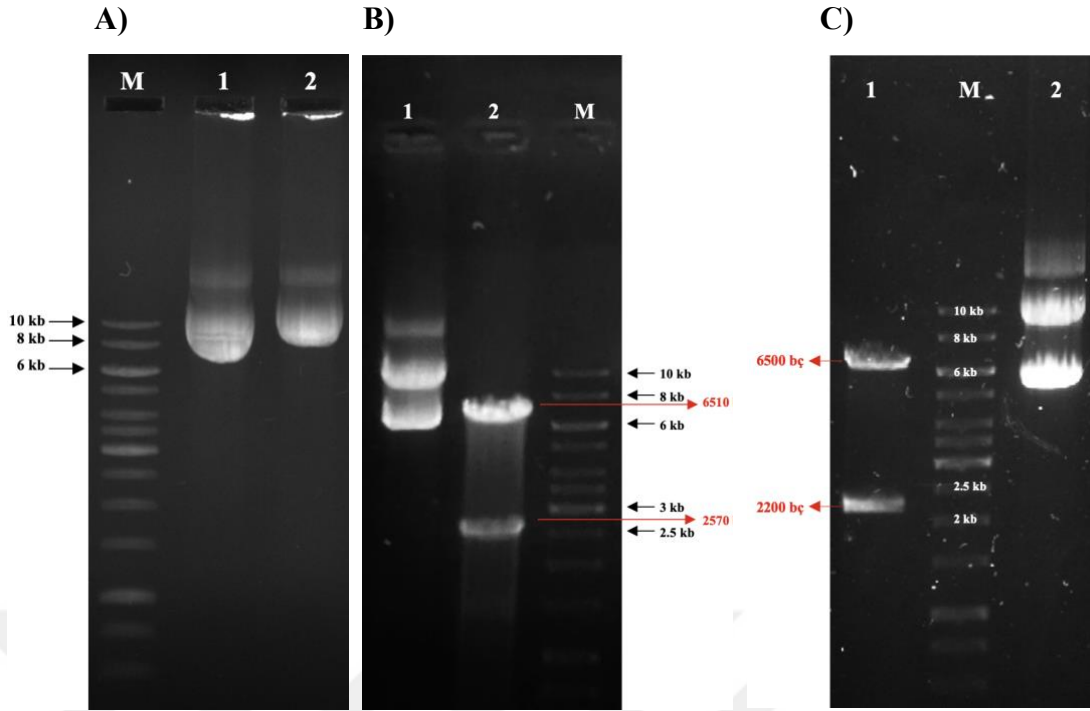
Şekil 7.1: *Bti* suşlarına ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analiz sonuçları (3 biyolojik tekrar ile). **M:** Protein marker (Thermo Scientific), **Kuyu 1–3:** *Bti* yaban suş, **Kuyu 4–6:** *Bti* pHT315ppk suşu, **Kuyu 7–9:** *Bti* pHT315lon suşu.

7.1. *Bti* pHT315ppk ve *Bti* pHT315lon Suşlarının Oluşturulması ve Doğrulanması

Daha önceki çalışmalarda oluşturulmuş rekombinant plazmidler, pHT315ppk ve pHT315lon, *E. coli* ET12567 suşları içinde –80 °C’de muhafaza edilmiştir. Bu *E. coli* suşunun metilasyon yoksunu olması, izole edilen plazmidlerin *Bacillus* restriksiyon sistemi tarafından parçalanmasını önlemesi açısından önemlidir. Suşlardan izole edilen plazmidlerin doğruluğunun gösterilmesi için restriksiyon enzim kesimi ve PCR yapılmıştır.

7.1.1. *E. coli* ET12567 Suşlarından Plazmid İzolasyonu ve Doğrulanması

pHT315ppk ve pHT315lon plazmidleri metilasyon yoksunu *E. coli* ET12567 suşlarından başarıyla izole edilmiş ve restriksiyon enzimleri ile kesilerek doğrulanmıştır. pHT315ppk plazmidinin HindIII ile kesimi sonucunda 6510 ve 2570 baz çifti, pHT315lon plazmidinin HindIII ve KpnI ile kesimi sonucunda ise 6500 ve 2200 baz çifti uzunluğunda olmak üzere, beklenen DNA fragmanları elde edilmiştir (Şekil 7.2).

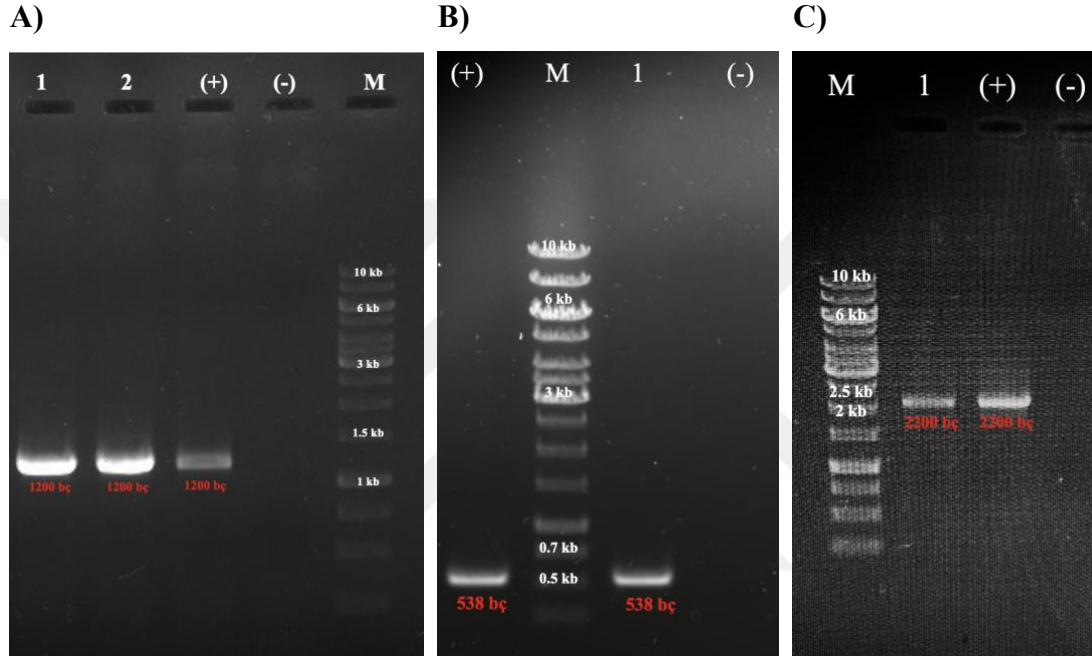


Şekil 7.2: *E. coli* ET12567 suşlarından izole edilen pHT315*ppk* ve pHT315*lon* plazmidlerinin doğrulanması. **A)** İzole edilen plazmidler. **M:** 1 kb DNA belirteci (Thermo Scientific), **Kuyu 1:** pHT315*lon* plazmid, **Kuyu 2:** pHT315*ppk* plazmid. **B)** pHT315*ppk* plazmidine ait restriksiyon kesim sonucu. **Kuyu 1:** Kesilmemiş pHT315*ppk* plazmid, **Kuyu 2:** HindIII ile kesilen pHT315*ppk* plazmid, **C)** pHT315*lon* plazmidine ait çift enzim kesim sonucu. **Kuyu 1:** HindIII ve KpnI ile kesilmiş pHT315*lon* plazmid, **Kuyu 2:** Kesilmemiş pHT315*lon* plazmid.

Her ne kadar restriksiyon enzim analizleri ile plazmidler doğrulanmış olsa da plazmidlerin söz konusu genleri taşıyıp taşımadıklarını belirlemek için pHT315'e seçicilik kazandıran eritromisin direnç genine özgü *erm* primerleri ile *ppk* ve *lon* genlerine özgü *ppk* ve *lon* primerleri (Tablo 6.10) kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 7.3). Laboratuvarımızda daha önce izole edilmiş pHT315, pHT315*ppk* ve pHT315*lon* plazmitleri PCR'da pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Tablo 7.1). PCR analizleri sonucunda pHT315 vektörüne özgü *erm* primerleri ile 1200 bp, *ppk* genine özgü primerlerle 538 bp, ve *lon* genine özgü primerlerle yaklaşık 2200 bp'lik ampliconlar elde edilmiştir. Elde edilen bant boyutları, plazmitlerin ilgili genleri içerdiğini doğrulamaktadır.

Tablo 7.1: PCR analizlerinde kullanılan pozitif kontroller.

PCR Hedefi (Gen)	Kullanılan Primer	Pozitif Kontrol Plazmit	Kanıtlanan Özellik
Eritromisin direnci	Eritromisin primerleri	pHT315	<i>erm</i> geni varlığı
<i>lon</i> geni	<i>lon</i> primerleri	pHT315 <i>lon</i>	<i>lon</i> geni varlığı
<i>ppk</i> geni	<i>ppk</i> primerleri	pHT315 <i>ppk</i>	<i>ppk</i> geni varlığı



Şekil 7.3: *E. coli* ET12567 hücrelerinden izole edilen rekombinant plazmidlerin kalıp olarak kullanıldığı, farklı primer setleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. (+): Pozitif kontrol, (-): Negatif kontrol, M: 1 kb DNA belirteci (Thermo Scientific), A) *erm* primerlerinin kullanıldığı PCR reaksiyonu. **Kuyu 1:** pHT315*lon* plazmidi. **Kuyu 2:** pHT315*ppk* plazmidi, B) *ppk* primerlerinin kullanıldığı PCR reaksiyonu sonuçları. **Kuyu 1:** pHT315*ppk* plazmidi, C) *lon* primerlerinin kullanıldığı PCR reaksiyonu sonuçları. **Kuyu 1:** pHT315*lon* plazmidi.

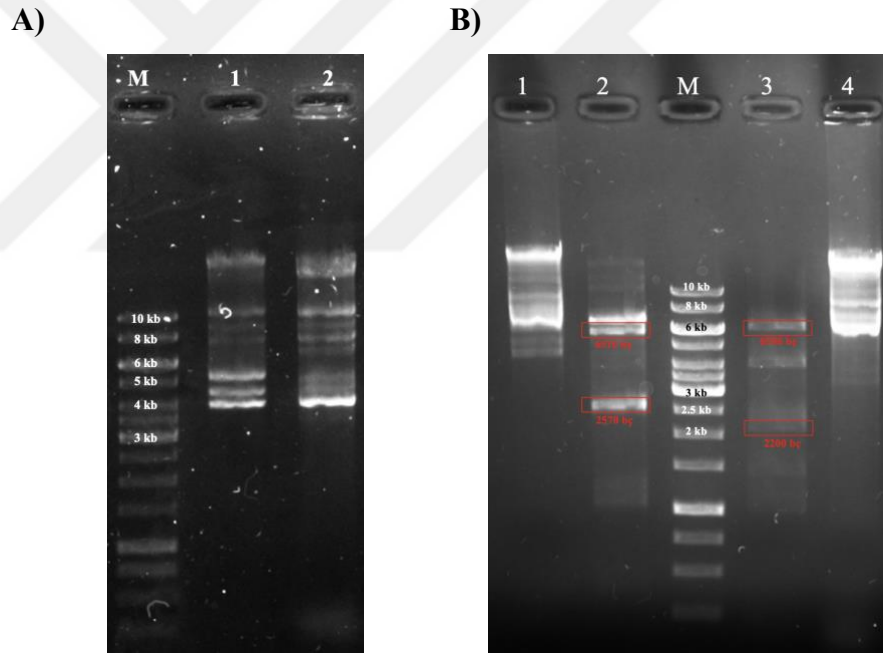
7.1.2. Rekombinant Plazmidlerin *Bti*'ye Aktarılması ve Doğrulanması

Metilasyon yoksunu *E. coli* ET12567 suşlarından elde edilen ve doğruluğu ispatlanan rekombinant plazmidler (pHT315*ppk* ve pHT315*lon*), *Bti* yaban suşuna elektroporasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Elektroporasyon sonrası elde edilen zaman sabiti değerleri Tablo 7.2'de gösterilmiştir.

Tablo 7.2: Elektroporasyon deneylerinde transformantların elde edildiği şartlar.

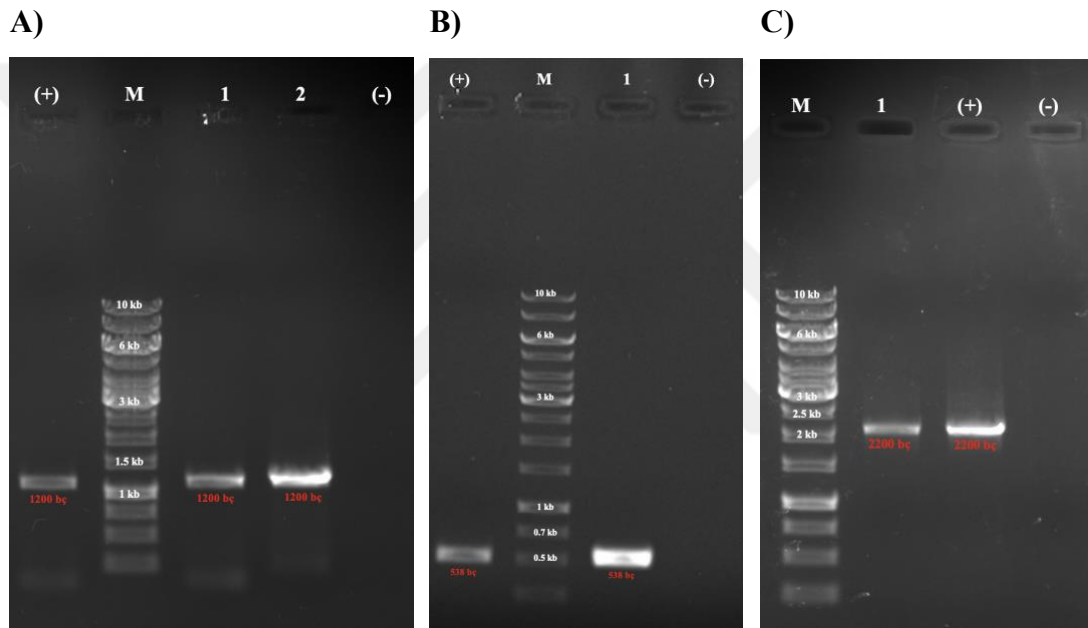
Plazmid	Gerilim (V)	Zaman Sabiti (ms)
pHT315ppk	2499	3,8
pHT315lon	2477	4,2

Elektroporasyon sonrası eritromisin (25 µg/ml) içeren besiyerinde büyüyen olası rekombinant *Bti* transformatlarından plazmidler başarıyla izole edilmiştir (Şekil 7.4). İzole edilen plazmidlerin doğrulanması amacıyla restriksiyon enzim kesimleri yapılmıştır. pHT315ppk plazmidinin HindIII ile kesimi sonucunda 6510 ve 2570 baz çifti, pHT315lon plazmidinin HindIII ve KpnI ile kesimi sonucunda ise 6500 ve 2200 baz çifti olmak üzere, beklenen DNA fragmanları elde edilmiştir (Şekil 7.4).



Şekil 7.4: *Bti* hücrelerinden elde edilen plazmidler ve bu plazmidlerin uygun restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucunda oluşan bant profillerine ait agaroz jel elektroforez görüntüleri. **A)** İzole edilen plazmidler. **M:** 1 kb DNA belirteci (Thermo Scientific), **Kuyu 1:** pHT315lon plazmidi, **Kuyu 2:** pHT315ppk plazmidi. **B)** pHT315ppk ve pHT315lon plazmitlerinin restriksiyon enzimleri ile kesim sonuçları. **Kuyu 1:** Kesilmemiş pHT315ppk plazmidi, **Kuyu 2:** HindIII ile kesilen pHT315ppk plazmidi, **Kuyu 3:** Kesilmemiş pHT315lon plazmidi, **Kuyu 4:** HindIII ve KpnI ile kesilmiş pHT315lon plazmidi.

Ek bir doğrulama yöntemi olarak, pHT315 plazmidine özgü erm primerleri, *ppk* ve *lon* genlerine özgü *ppk* ve *lon* primerleri kullanılarak üç farklı primer setiyle (Tablo 6.10) PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 7.5). Termal döngü cihazında uygulanan 30 döngülük amplifikasyon sonucunda elde edilen ampikon boyutlarının hedeflenen gen bölgeleri ile uyumlu olduğu görülmüştür. pHT315 vektörüne özgü erm primerleri ile 1200 bp, *ppk* genine özgü primerlerle 538 bp ve *lon* genine özgü primerlerle yaklaşık 2200 bp'lik ampikonlar elde edilmiştir (Şekil 7.5). Elde edilen bant boyutları, ilgili plazmitlerin hedef genleri içerdiğini doğrulamaktadır. Bu bulgular, rekombinant plazmidlerin *Bti*'ye başarılı bir şekilde aktarıldığını ispatlamıştır.

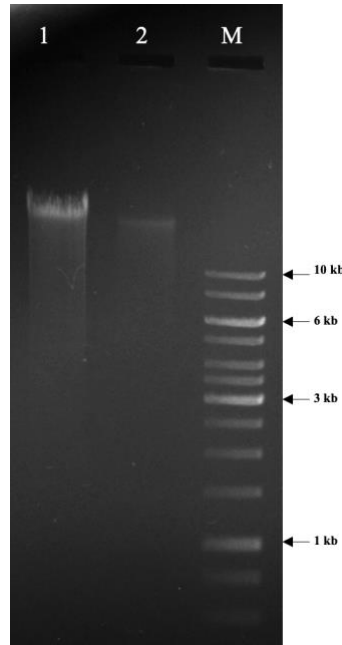


Şekil 7.5: *Bti* hücrelerinden izole edilen rekombinant plazmidlerin şablon olarak kullanıldığı, farklı primer setleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. (+): Pozitif kontrol, (-): Negatif kontrol, M: 1 kb DNA belirteci (Thermo Scientific), **A)** erm primerlerinin kullandığı PCR reaksiyonu. **Kuyu 1:** pHT315/*lon* plazmidi. **Kuyu 2:** pHT315/*ppk* plazmidi, **B)** *ppk* geni için *ppk* primerlerinin kullandığı PCR reaksiyonu sonuçları. **Kuyu 1:** pHT315/*ppk* plazmidi, **C)** *lon* geni için *lon* primerlerinin kullandığı PCR reaksiyonu sonuçları. **Kuyu 1:** pHT315/*lon* plazmidi.

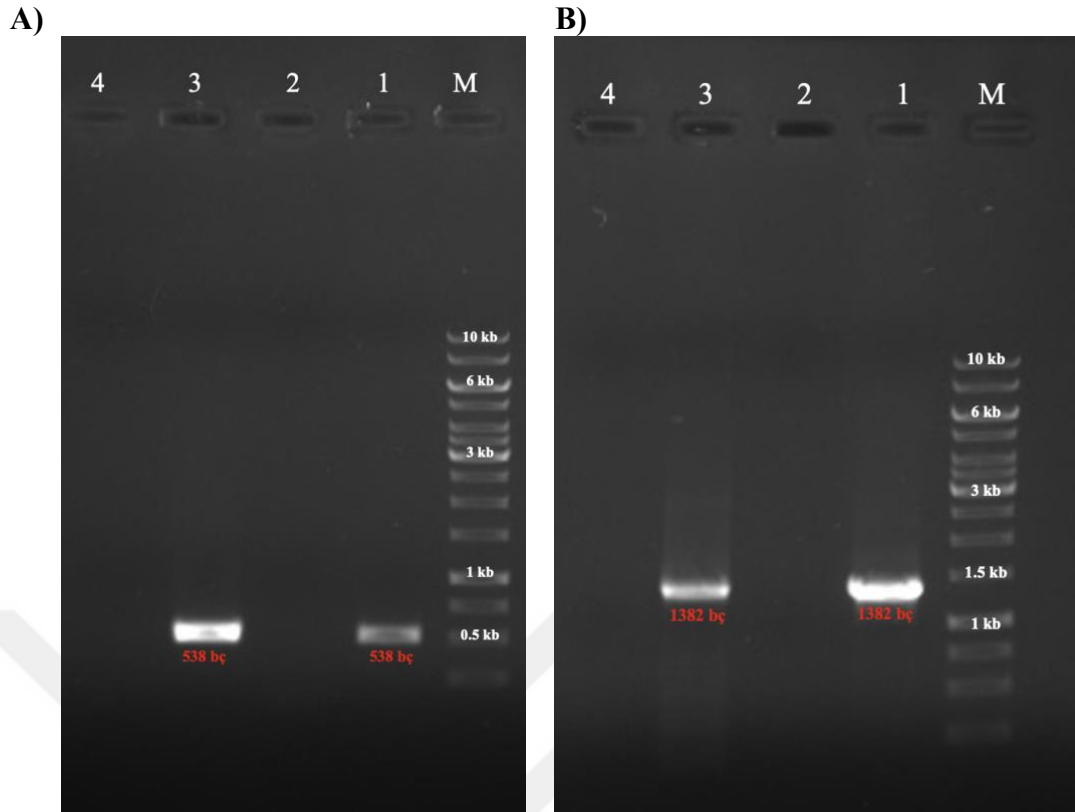
7.2. *Bti* Δppk Suşunun Doğrulanması

Daha önceki çalışmalar kapsamında hazırlanmış olan *Bti* Δppk suşunda mutasyonun korunup korunmadığının test edilmesi için *Bti* yaban suş ve *Bti* Δppk mutant suşun genomik DNA'ları izole edilmiştir (Şekil 7.6). *Bti* yaban suşunda *ppk* geninin varlığını ve *Bti* Δppk mutant suşunda *ppk* geni yerine apramisin direnç kaseti entegrasyonunu doğrulamak amacıyla apramisin ve *ppk* primer setleri ile (Tablo 6.10) PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 7.7).

Bti yaban suş genomik DNA'sı ile yapılan PCR sonucunda, *ppk* primerleri kullanıldığında beklenen büyüklükte (538 bp) spesifik bir amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. Bu sonuç, *Bti* yaban suşun genomunda *ppk* geninin doğal olarak bulunduğunu doğrulamaktadır. Aynı örnek, apramisin primerleri ile test edildiğinde ise beklendiği gibi herhangi bir amplifikasyon ürünü gözlenmemiştir. *Bti* Δppk mutant suşu *ppk* primerleri ile denendiğinde amplifikasyon ürünü alınmamış, ancak apramisin primerleriyle yapılan PCR sonucunda net bir bant (1382 bp) elde edilmiştir (Şekil 7.7). Bu bulgu, *ppk* geninin genomdan başarılı şekilde silindiğini ve yerine apramisin direnç kasetinin entegre edildiğini göstermektedir.



Şekil 7.6: *Bti* yaban suş ve *Bti* Δppk mutant suştan izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi. **Kuyu 1:** *Bti* Δppk , **Kuyu 2:** *Bti* yaban suş, **M:** 1 kb DNA belirteci (Thermo Scientific).

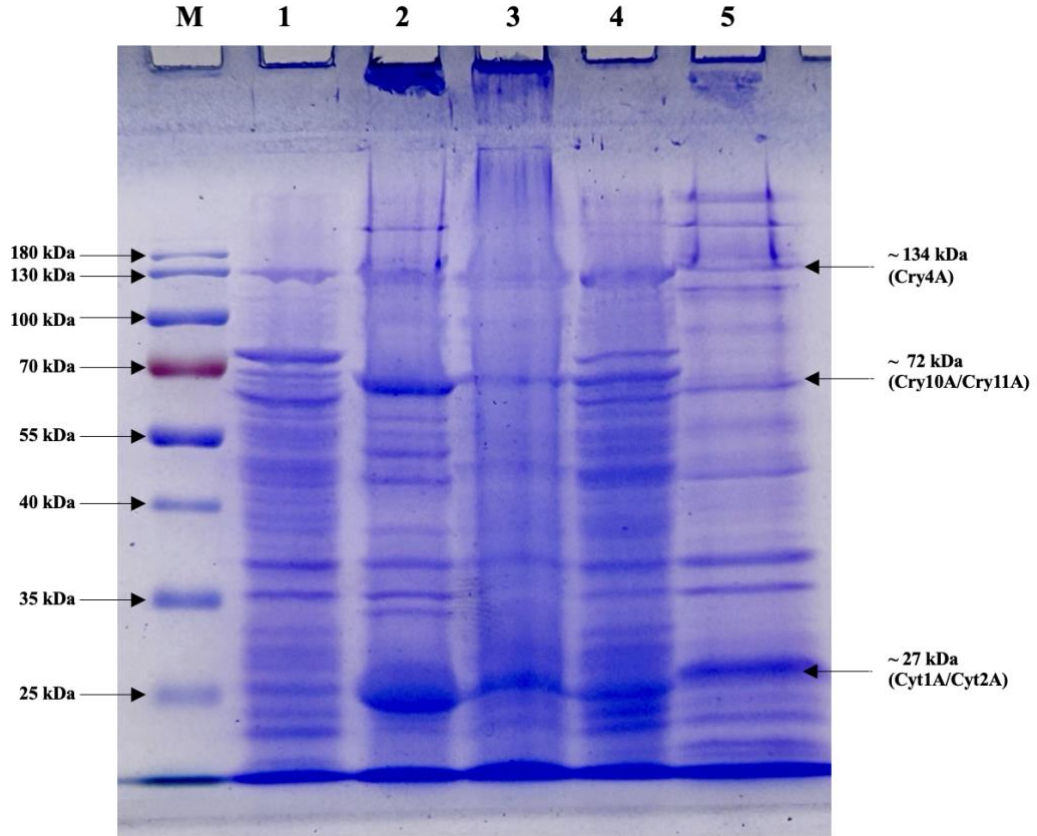


Şekil 7.7: *Bti* Δppk suşunun PCR ile doğrulanması **A)** *Bti* suşlarında *ppk* gen varlığının *ppk* ve apramisin spesifik primer çiftleri kullanılarak PCR ile gösterilmesi. **M:** 1 kb DNA belirteci (Thermo Scientific), **Kuyu 1:** *Bti* yaban suş genomik DNA + *ppk* primerleri, **Kuyu 2:** *Bti* yaban suş genomik DNA + apramisin primerleri, **Kuyu 3:** Pozitif kontrol, **Kuyu 4:** Negatif kontrol. **B)** *Bti* suşlarında *ppk* geni yerine apramisin kaseti entegrasyonunun *ppk* ve apramisin spesifik primer çiftleri kullanılarak PCR ile gösterilmesi. **Kuyu 1:** *Bti* Δppk genomik DNA + apramisin primerleri, **Kuyu 2:** *Bti* Δppk genomik DNA + *ppk* primerleri, **Kuyu 3:** Pozitif kontrol, **Kuyu 4:** Negatif kontrol.

7.3. Doğruluğu Teyit Edilen Rekombinant Suşlardan Endotoksin İzolasyonu ve SDS-PAGE

Tez kapsamında kullanılan rekombinant suşların (*Bti* pHT315*ppk*, *Bti* pHT315*lon* ve *Bti* Δppk) doğrulanmasının ardından suşların δ -endotoksin üretim seviyeleri karşılaştırılmıştır (Şekil 7.8). *Bti* yaban suşunda (Kuyu 1), yaklaşık 134 kDa (Cry4Aa), 72 kDa (Cry11Aa) ve 27 kDa (Cyt1Aa/Cyt2Ba) boyutlarında bantlar belirgin biçimde gözlenmiştir. *Bti* Δppk mutanıtı (Kuyu 2), aynı bantları daha yoğun şekilde sergilemiş ve özellikle Cry11Aa ile Cyt proteinlerinde belirgin artış gözlenmiştir. Plazmit taşıyan rekombinant suşlar *Bti* pHT315*ppk* (Kuyu 3) ve *Bti* pHT315*lon* (Kuyu 4) ile boş plazmit taşıyan kontrol suşu *Bti* pHT315 (Kuyu 5) daha zayıf bant profili ortaya

koymuştur. *Bti* pHT315*ppk* ve *Bti* pHT315*lon* suşlarının kristal protein üretimlerinin önceki çalışmalardan [Doruk vd., 2013; Barkad vd., 2021] farklı olması dikkat çekici olup olası sebepleri tezin son bölümünde tartışılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda, yaban suşa kıyasla daha yüksek düzeyde δ -endotoksin ürettiği gösterilen ve plazmit içermeyen *Bti* Δ *ppk* suşu, fermentör tabanlı üretim çalışmaları için aday olarak seçilmiştir.

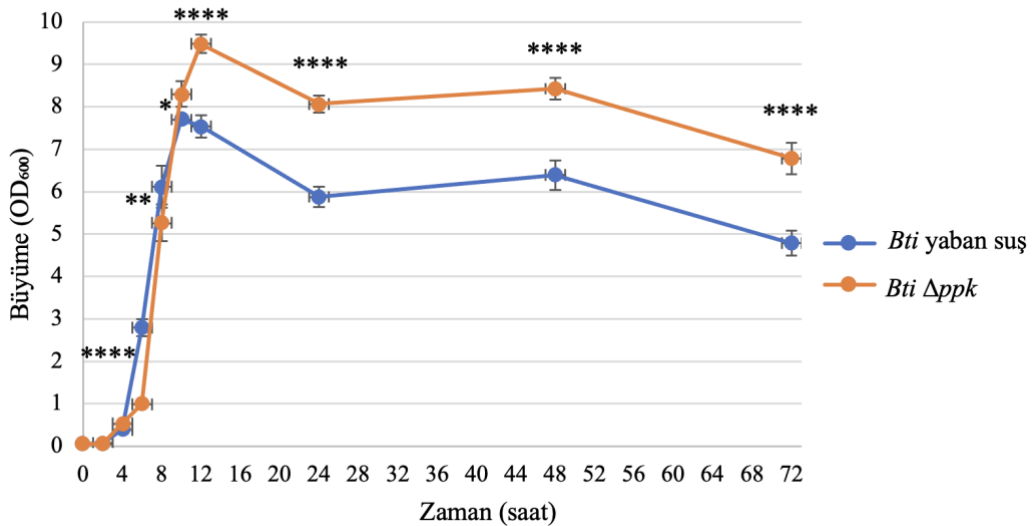


şekil 7.8: *Bti* suşlarına ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analiz sonuçları. **M:** Protein marker (Thermo Scientific), **Kuyu 1:** *Bti* yaban suş, **Kuyu 2:** *Bti* Δ *ppk*, **Kuyu 3:** *Bti* pHT315*ppk*, **Kuyu 4:** *Bti* pHT315*lon*, **Kuyu 5:** *Bti* pHT315.

7.3.1. *Bti* Δppk Suşunun DSM Besiyerindeki Büyüme Eğrisi ve Sporlanma Kapasitesi

Bti yaban suş ile *Bti* Δppk mutant suşun DSM besiyerinde büyüme eğrileri karşılaştırılmıştır (Şekil 7.9). Her iki suş da yaklaşık 6. saatte log faza ulaşmış ve 12. saat civarında maksimum büyüme düzeyine erişmiştir. *Bti* Δppk suşu, yaban suşa kıyasla daha yüksek hücre yoğunluğuna ulaşmış ve bu düzeyi fermentasyon boyunca korumuştur. İki suş arasındaki büyüme değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, 6, 8, 10, 12, 24, 48 ve 72. saatlerde anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Bu sonuçlar, *Bti* Δppk suşunun yaban suşa kıyasla daha yüksek büyüme profili sergilediğini göstermektedir.

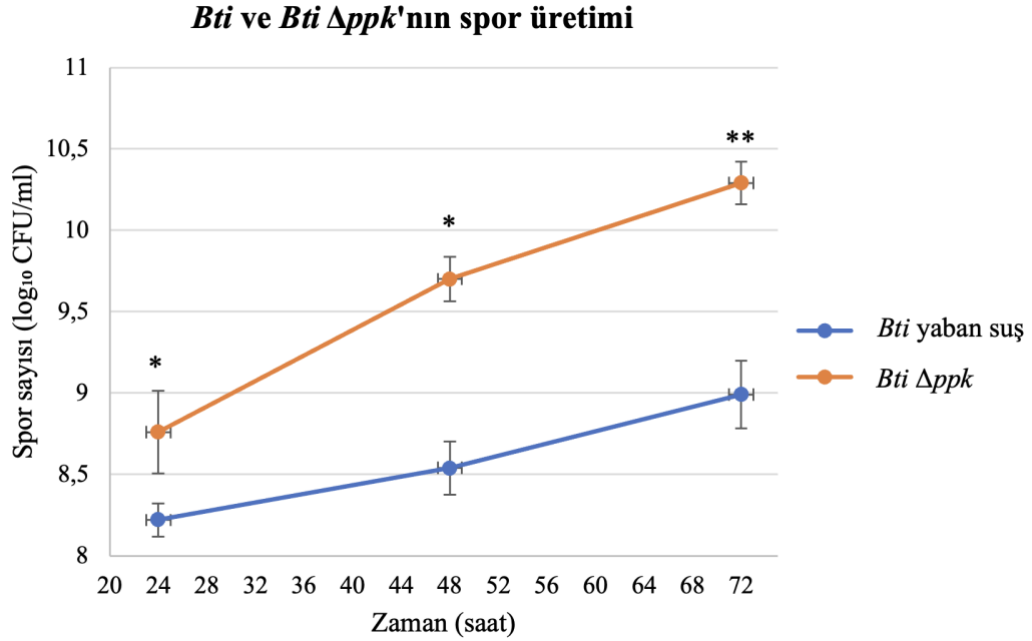
***Bti* ve *Bti* Δppk 'nın DSM besiyerinde büyüme eğrisi**



Şekil 7.9: *Bti* yaban suşu ve *Bti* Δppk suşunun DSM besiyerinde zamana bağlı büyüme eğrisi (OD₆₀₀). Her iki suşun optik yoğunluk değerleri düzenli olarak ölçülmüş ve büyüme dinamikleri karşılaştırılmıştır. Ortalama değerler $\pm$ standart sapma ile gösterilmiştir. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirilmiş olup, anlamlılık seviyeleri grafik üzerinde * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ve **** ($p < 0,0001$) ile gösterilmiştir. Anlamlı fark gözlenen zaman noktaları 6, 8, 10, 12, 24, 48 ve 72. saatlerdir.

24., 48. ve 72. saatlerde yapılan spor sayısı ölçümlerinde, *Bti* Δppk mutantının spor sayısının yaban suşa göre belirgin şekilde fazla olduğu görülmektedir (Şekil 7.10). İstatistiksel analizler, 24. saatte ($p < 0,05$), 48. saatte ($p < 0,05$) ve özellikle 72. saatte ($p < 0,01$) gözlenen farkların anlamlı olduğunu ortaya koymuştur. Aynı şartlarda daha

iyi büyüyen, daha fazla sporlanan ve daha fazla kristal protein üretebilen *Bti* Δ *appk* suşu, büyük hacimli üretim uygulamaları açısından güçlü bir aday olarak öne çıkmaktadır.



Şekil 7.10: *Bti* yaban suşu ve *Bti* Δ *appk* mutantının 24., 48. ve 72. saatlerdeki spor yoğunluklarının logaritmik (log₁₀ CFU/ml) karşılaştırması. Her veri noktası, üç biyolojik tekrarın ortalamasını ve standart sapmasını göstermektedir. *Bti* Δ *appk* mutantı tüm zaman noktalarında yaban suşa göre daha yüksek spor sayısı göstermektedir. Spor sayıları, 80 °C’de 10 dakika ısı şoku sonrası CFU/ml olarak belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, 24. saatte iki suş arasında anlamlı fark gözlenmiştir (*p < 0,05). 48. saatte fark daha da belirginleşmiş (*p < 0,05), 72. saatte ise istatistiksel anlamlılık düzeyi artarak (**p < 0,01) kaydedilmiştir.

7.3.2. *Bti* Δ *appk* Suşunun Zamana Bağlı δ -Endotoksin Üretimi

Bti ve *Bti* Δ *appk* suşlarının δ -endotoksin üretimi, DSM besiyerinde farklı inkübasyon sürelerinde (24–120 saat) SDS-PAGE yöntemiyle analiz edilmiştir (Şekil 7.11). *Bti* yaban suşunda, 24. saatte δ -endotoksin bantları diğer saatlere kıyasla daha silik gözlemlenmiştir. 48. saatte özellikle ~27 kDa bölgesinde Cyt proteinleri belirginleşmeye başlamış, ~72 kDa ve ~134 kDa’daki Cry protein bantları ise zayıf şekilde belirginleşmiştir. 72. saatte anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, 96. saatte tüm bantlar (Cry4A, Cry10A/Cry11A ve Cyt1A/Cyt2A) en yüksek yoğunluğa ulaşmış ve

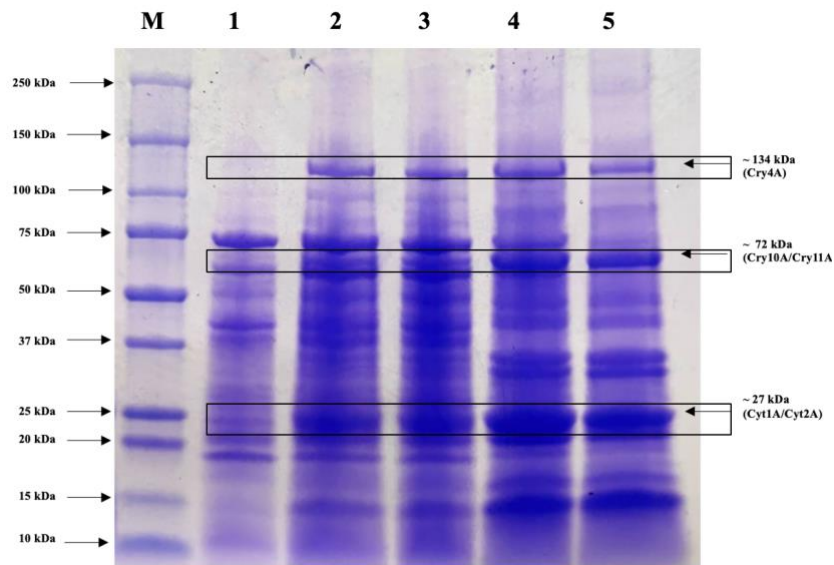
bu zaman noktası toksin üretiminin zirvesi olarak değerlendirilmiştir. 120. saatte ise Cry ve Cyt bantlarında hafif bir azalma eğilimi gözlenmiştir.

Öte yandan, *Bti* Δppk suşunda 24. saatte endotoksin bantları zayıf seviyede kalmış ve üretimin henüz başlangıç aşamasında olduğu değerlendirilmiştir. 48. saatte, özellikle ~27 kDa'daki Cyt protein bantları belirginleşmiş, ayrıca ~72 kDa ve ~134 kDa bantları da görünür hale gelmiştir. 72. saatte hem Cry hem Cyt proteinlerine ait bant yoğunlukları hafif seviyede azalmış ancak, 96. saatte tekrar en yüksek seviyeye ulaşmıştır. 120. saatte ise özellikle Cry protein bantlarında kısmi bir azalma gözlenmiştir.

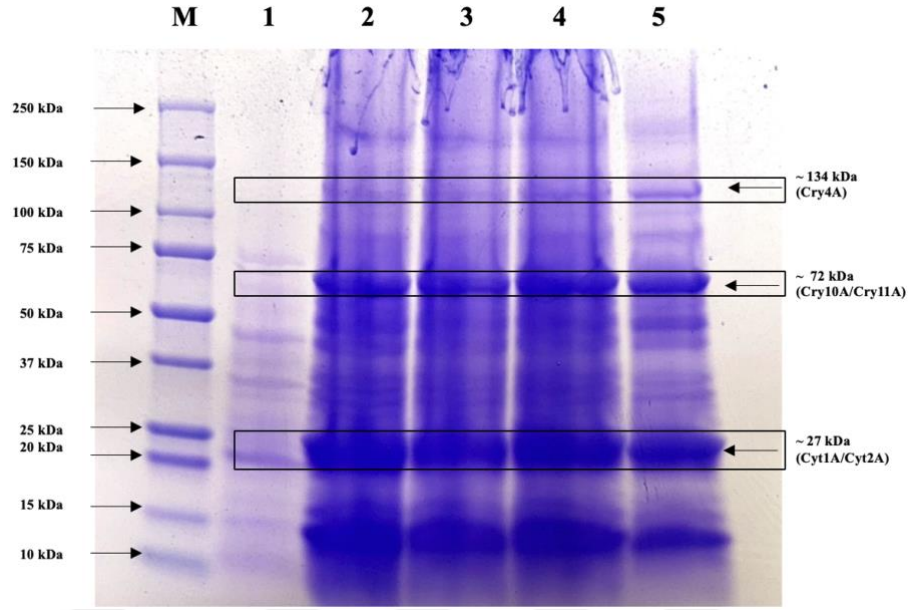
Bu bulgular doğrultusunda, *Bti* yaban suşunun δ -endotoksin üretiminin 48. saatte başladığı, 72. saatte korunduğu ve 96. saatte en yüksek düzeye ulaştığı görülmüştür. *Bti* Δppk suşunda ise δ -endotoksin üretiminin 48. saatte maksimuma ulaştığı ve bu düzeyin 48–96 saatlik zaman diliminde hemen hemen stabil kaldığı, 120. saatte ise bir miktar azaldığı görülmektedir.

Genel anlamda ise *Bti* Δppk suşunun 48–120 saatlik süre boyunca ürettiği bant yoğunluklarının *Bti* yaban suşuna göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Tez kapsamındaki çalışmaların Doruk (2013) ve Barkad (2021)'in çalışmaları ile anlamlı şekilde kıyaslanabilmesi için suşların DSM besiyerinde 72 saat inkübe edilmesine karar verilmiştir.

A)



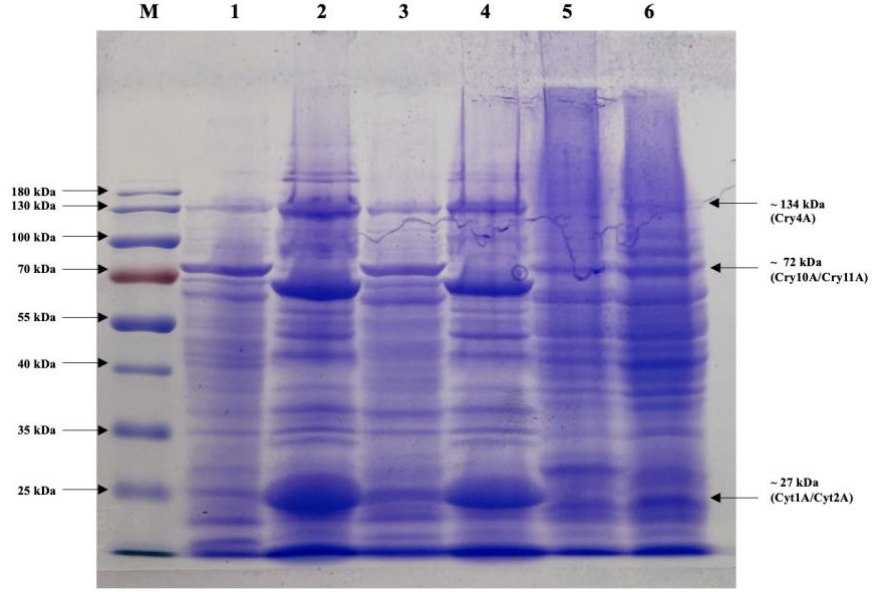
B)



Şekil 7.11: DSM besiyerinde büyütülen *Bti* suşlarının farklı inkübasyon sürelerindeki δ -endotoksin üretimine ait SDS-PAGE analizleri. **M:** Protein marker (Thermo Scientific). **A)** *Bti* yaban suşunun sırasıyla 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerindeki protein profilleri. **B)** *Bti* Δppk mutant suşunun sırasıyla 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerindeki protein profilleri.

7.3.3. *Bti* Δppk Suşunun Endotoksin Üretiminde Sıcaklığın Etkisi

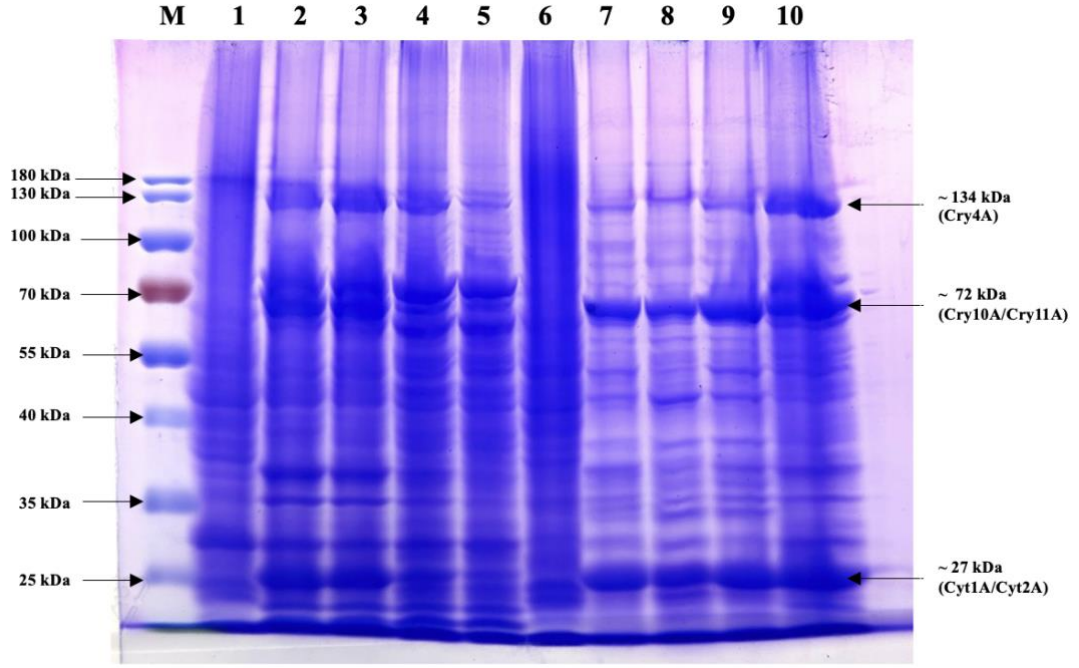
Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen *Bti* suşlarının SDS-PAGE analizleri, sıcaklığın δ -endotoksin üretimi üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 7.12). Hem yaban suş hem de *Bti* Δppk suşlarında 25 °C’de Cry4A (~134 kDa), Cry10A/Cry11A (~72 kDa) ve Cyt1A/Cyt2A (~27 kDa) bantlarının yoğun olarak görüldüğü tespit edilmiştir. 30 °C’de bant yoğunluğu 25 °C’ye kıyasla azalmış, 37 °C’de ise Cry ve Cyt proteinlerine ait bantların diğer sıcaklıklarla karşılaştırıldığında iyice zayıfladığı gözlenmiştir. Ayrıca, *Bti* Δppk suşu her üç sıcaklıkta da yaban suşa kıyasla daha yoğun bant profili sergilemiştir. Özellikle 25 °C’de *Bti* Δppk suşu en güçlü endotoksin üretim kapasitesine sahip olmuştur. Ancak kullanılan çalkalamalı inkübatörün soğutma kapasitesi yetersiz olduğundan, deneysel uygulamalarda sıcaklık stabilitesinin korunabilmesi için 30 °C çalışma sıcaklığı seçilmiştir. Ayrıca endüstriyel ölçekli fermentör uygulamalarında soğutma maliyetlerinin de göz önünde bulundurulması gerektiğinden, 30 °C’nin tercih edilmesi proses ölçeklenebilirliği açısından da uygun görülmektedir.



Şekil 7.12: Farklı sıcaklıklarda (25 °C, 30 °C ve 37 °C) DSM besiyerinde inkübe edilen *Bti* yaban suş ve *Bti* Δppk suşuna ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analizi. **M:** Protein marker (Thermo Scientific); **Kuyu 1:** *Bti* yaban suş 25 °C, **Kuyu 2:** *Bti* Δppk 25 °C, **Kuyu 3:** *Bti* yaban suş 30 °C, **Kuyu 4:** *Bti* Δppk 30 °C, **Kuyu 5:** *Bti* yaban suş 37 °C, **Kuyu 6:** *Bti* Δppk 37 °C.

7.3.4. *Bti* Δppk Suşunun Endotoksin Üretiminde pH'nın Etkisi

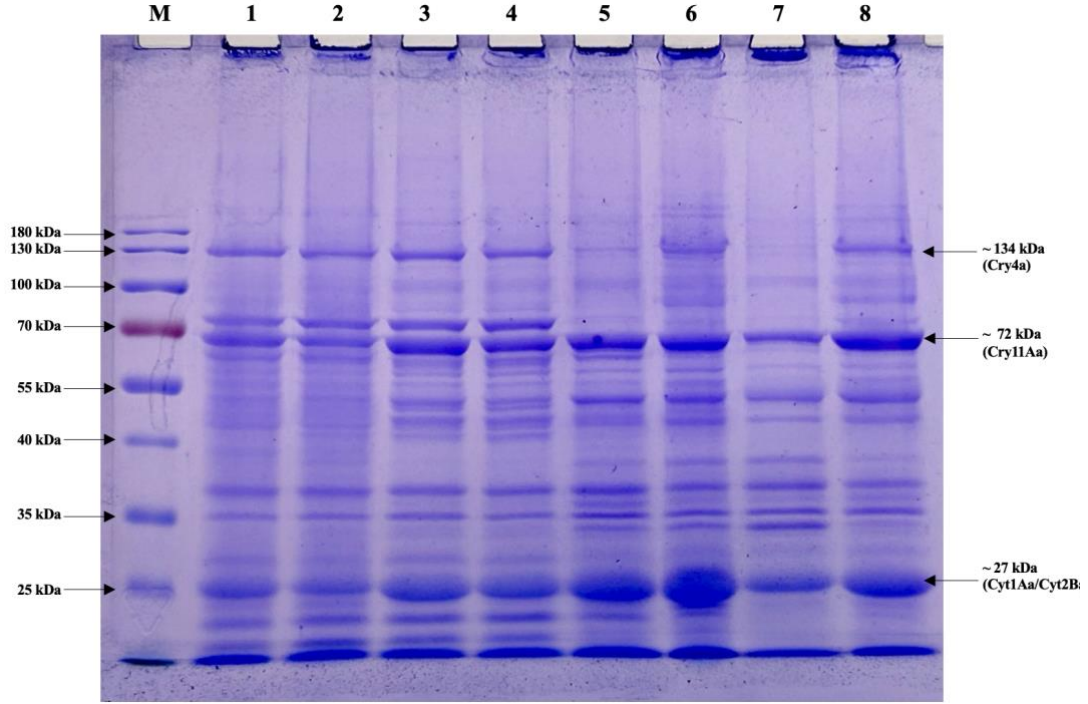
Farklı pH koşullarında *Bti* yaban suşu ve *Bti* Δppk suşunun endotoksin üretimleri SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 7.13). *Bti* yaban suşu için pH 5.0 koşulunda kristal proteinlerine özgü belirgin bantlar gözlenmezken, pH 6.0 ve 7.0 değerlerinde özellikle ~72 kDa (Cry10A/Cry11A) ve ~27 kDa (Cyt1A/Cyt2A) protein bantlarının daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. pH 8.0 ve 9.0 değerlerinde ise kristal proteinlere özgü bantların yoğunluğu azalmıştır. *Bti* Δppk suşunda ise pH 5.0 koşulunda protein bantları zayıf görülmüş, pH 6.0 ve 7.0'de orta yoğunlukta bantlar elde edilmiştir. Buna karşın pH 8.0 ve özellikle pH 9.0'da ~134 kDa (Cry4A), ~72 kDa (Cry10A/Cry11A) ve ~27 kDa (Cyt1A/Cyt2A) bantlarının yoğunluğu artmış ve yaban suşa kıyasla daha belirgin hale gelmiştir. Bu bulgular, *Bti* Δppk suşunun alkali koşullarda yaban suşa göre daha yüksek endotoksin üretim kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 7.13: Farklı pH koşullarına sahip DSM besiyerinde *Bti* yaban suş ve *Bti* Δppk suşuna ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analiz sonuçları. **M:** Protein marker (Thermo Scientific). **Kuyu 1-5:** *Bti* yaban suş. **Kuyu 1:** pH=5.0, **Kuyu 2:** pH=6.0, **Kuyu 3:** pH=7.0, **Kuyu 4:** pH=8.0, **Kuyu 5:** pH=9.0, **Kuyu 6-10:** *Bti* Δppk . **Kuyu 6:** pH=5.0, **Kuyu 7:** pH=6.0, **Kuyu 8:** pH=7.0, **Kuyu 9:** pH=8.0, **Kuyu 10:** pH=9.0.

7.3.5. *Bti* Δppk Suşunun Endotoksin Üretiminde Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

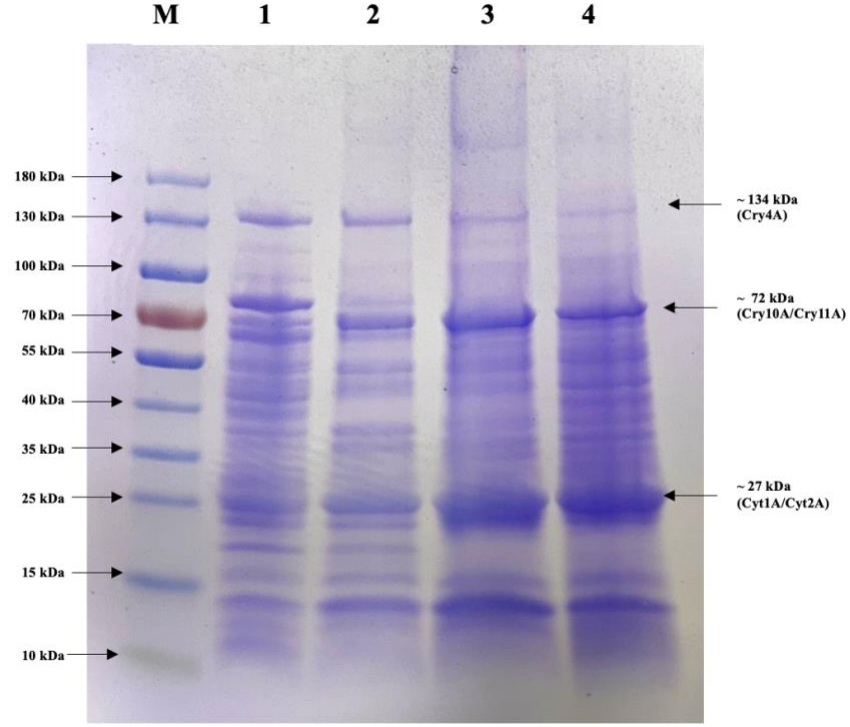
Farklı karbon kaynaklarının δ -endotoksin üretimi üzerine etkisi SDS-PAGE analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 7.14). Yaban suşta en belirgin protein bantları mannitol ve sükroz içeren besiyerlerinde gözlenmiştir. Buna karşılık *Bti* Δppk suşunda Cry4A (~134 kDa), Cry10A/Cry11A (~72 kDa) ve Cyt1A/Cyt2A (~27 kDa) protein bantları özellikle nişasta ve glikoz kullanılan besiyerlerinde daha yoğun olarak tespit edilmiştir. Öte yandan, sükroz kullanılan besiyerinde de güçlü bantlar görülmekle birlikte mannitol içeren besiyerinde düşük yoğunlukta üretim gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar, yaban suşun ve *Bti* Δppk suşunun karbon kaynağına bağlı olarak farklı endotoksin üretim profilleri sergilediğini ve optimum üretimin kullanılan karbon kaynağına göre değiştiğini göstermektedir.



Şekil 7.14: Farklı karbon kaynakları içeren DSM besiyerinde *Bti* yaban suşu ve *Bti* Δppk suşuna ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analizi. **M:** Protein marker (Thermo Scientific). **Kuyu 1:** *Bti* yaban suş (glukoz), **Kuyu 2:** *Bti* yaban suş (nişasta), **Kuyu 3:** *Bti* yaban suşu (mannitol), **Kuyu 4:** *Bti* yaban suşu (sükröz), **Kuyu 5:** *Bti* Δppk (glukoz), **Kuyu 6:** *Bti* Δppk (nişasta), **Kuyu 7:** *Bti* Δppk (mannitol), **Kuyu 8:** *Bti* Δppk (sükröz).

7.3.6. Optimum Koşullarda Endotoksin Üretimi

Bti yaban ve *Bti* Δppk suşlarının normal (DSM besiyeri pH: 6.8, glukoz, 30 °C, 72 saat) ve optimum koşullardaki δ -endotoksin üretimleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 7.15). *Bti* yaban suşunda, optimum koşullar (pH 7, mannitol, 30 °C, 72 saat) altında üretilen protein bantlarının normal koşullara kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür. Özellikle ~72 kDa (Cry10A/Cry11A) ve ~27 kDa (Cyt proteinleri) bantlarındaki artış belirgindir. *Bti* Δppk suşunda ise optimum koşullar (pH 9, nişasta, 30 °C, 72 saat) altında protein bant yoğunlukları normal koşullardan çok da farklı bulunmamıştır. Bu özellikle ~134 kDa (Cry4A) ve ~72 kDa (Cry11A/Cry10A) bantlarında net bir şekilde gözlenmiştir.



Şekil 7.15: *Bti* yaban ve *Bti* Δppk suşlarının normal ve optimum koşullardaki δ -endotoksin üretimlerinin SDS-PAGE analizi. **M:** Protein marker (Thermo Scientific). **Kuyu 1:** *Bti* yaban suş (normal koşullar), **Kuyu 2:** *Bti* yaban suş (optimum koşullar; pH 7, mannitol), **Kuyu 3:** *Bti* Δppk suş (normal koşullar), **Kuyu 4:** *Bti* Δppk suş (optimum koşullar; pH 9, nişasta).

7.3.7. Biyolojik Aktivite Deneyleri

Bti yaban ve *Bti* Δppk suşlarının 2. ve 3. evre *Culex pipens* cinsi sivrisinek larvaları üzerinde gerçekleştirilen biyolojik analizleri sonucunda, hem *Bti* Δppk mutant suşunun hem de *Bti* yaban suşun larvalar üzerinde doz ve zamana bağlı olarak artan bir öldürücülük etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 7.3). 6 saat boyunca gözlemlenen bu çalışmada 6. saatin sonunda bütün larvaların öldüğü, bu sebeple LC_{50} ve LC_{90} değerlerinin hesaplanabilmesi için 2. saat verilerinin kullanılmasının daha doğru olacağına karar verilmiştir (Tablo 7.4).

Tablo 7.3: *Bti* yaban suşun ve *Bti* Δ ppk suşlarının larva mortalitesi % ölüm oranları (Ortalama $\pm$ SD).

Suş	Konsant rasyon (mg/l)	1. Saat	2. Saat	3. Saat	4. Saat	5. Saat	6. Saat
<i>Bti</i> yaban suş	0,005	0,0 $\pm$ 0,0	25,0 $\pm$ 7,1	70,0 $\pm$ 14,1	75,0 $\pm$ 7,1	90,0 $\pm$ 14,1	95,0 $\pm$ 7,1
<i>Bti</i> yaban suş	0,01	10,0 $\pm$ 14,1	35,0 $\pm$ 7,1	75,0 $\pm$ 7,1	90,0 $\pm$ 14,1	95,0 $\pm$ 7,1	100,0 $\pm$ 0,0
<i>Bti</i> yaban suş	0,02	20,0 $\pm$ 14,1	45,0 $\pm$ 7,1	85,0 $\pm$ 7,1	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
<i>Bti</i> yaban suş	0,04	20,0 $\pm$ 0,0	95,0 $\pm$ 7,1	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
<i>Bti</i> Δ ppk	0,005	10,0 $\pm$ 14,1	40,0 $\pm$ 14,1	55,0 $\pm$ 7,1	70,0 $\pm$ 0,0	90,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
<i>Bti</i> Δ ppk	0,01	20,0 $\pm$ 14,1	70,0 $\pm$ 0,0	85,0 $\pm$ 21,2	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
<i>Bti</i> Δ ppk	0,02	40,0 $\pm$ 0,0	80,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
<i>Bti</i> Δ ppk	0,04	65,0 $\pm$ 21,2	85,0 $\pm$ 7,1	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0

Tablo 7.4: *Bti* yaban suşun ve *Bti* Δ ppk suşlarının 2. saatteki LC₅₀ ve LC₉₀ sonuçları (Ortalama $\pm$ SD).

Saat	Suş	LC ₅₀ (ng/ml)	LC ₉₀ (ng/ml)
2. saat	<i>Bti</i> Δ ppk	5,9 $\pm$ 2,0	45,8 $\pm$ 22,8
2.saat	<i>Bti</i> yaban suş	13,9 $\pm$ 2,3	56,8 $\pm$ 20,6

Bti yaban suşu ve *Bti* Δ ppk mutantının larvasidal aktiviteleri probit analizi ile değerlendirilmiş ve LC₅₀ ile LC₉₀ değerleri 2. saat verilerine göre hesaplanmıştır. 2. saatte *Bti* yaban suşu için LC₅₀ değeri 13,9 $\pm$ 2,3 ng/ml, LC₉₀ değeri ise 56,8 $\pm$ 20,6 ng/ml olarak bulunmuştur. Aynı zaman noktasında *Bti* Δ ppk suşu için LC₅₀ değeri 5,9 $\pm$ 2,0 ng/ml olup LC₉₀ değeri 45,8 $\pm$ 22,8 ng/ml olarak belirlenmiştir.

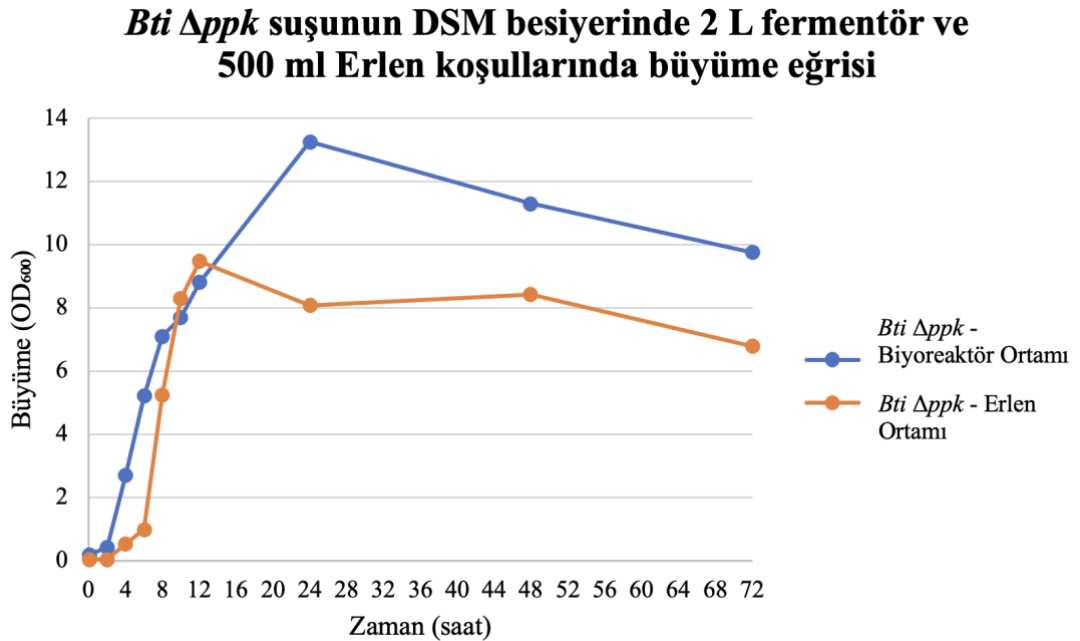
7.4. *Bti* Suşlarının Fermentör Ölçeğinde Büyütülmesi

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen fermentör çalışmalarının ilk aşamasında, 5 L kapasiteli Eppendorf BioFlo 120 fermentöründe (biyoreaktör) deneyler gerçekleştirilmiştir. Ancak oksijen kontrolünün manuel olarak yapılması, süreç boyunca DO seviyelerinde dalgalanmalara yol açmış ve bu durum kültürün log fazda kısa süre kalarak hızlıca durağan faza geçmesine neden olmuştur. Gram boyama ve

kristal boyama sonuçları ile desteklenen verilerde, sporulasyonun geç başlamasına rağmen 72. saate gelindiğinde dahi serbest spor oluşumu gözlenmemiş, ayrıca kristal protein oluşumu da yeterli düzeye ulaşmamıştır. Bu sonuçlar, değişkenlerin, özellikle oksijen konsantrasyonunun kontrolündeki yetersizliğin kültürün büyümesini ve sporulasyon verimini sınırladığını düşündürmektedir. Bu nedenle sonraki aşamalarda, proses parametrelerinin daha iyi kontrol edilebildiği Applikon (Getinge, Hollanda) fermentörü kullanılarak yeni fermentasyon çalışmaları planlanmıştır.

7.4.1. *Bti Δppk* Suşunun Fermentörde Büyütülmesi

Bti Δppk suşunun Erlen ve fermentör şartlarındaki büyümesi karşılaştırılmıştır (Şekil 7.16). Fermentör koşullarında rekombinant suş, tipik bir bakteriyel büyüme eğrisi sergilemiştir. Erlen ve 2 L fermentör koşullarında elde edilen büyüme eğrileri karşılaştırıldığında, Erlen ortamında büyümenin daha hızlı başladığı ve 12. saate OD₆₀₀ değerinin ~9 seviyesine ulaştığı görülmektedir. Ancak fermentör ortamında büyüme daha yavaş başlamasına rağmen 24. saate OD₆₀₀ ≈ 13,2 ile Erlen ortamına kıyasla daha yüksek değerlere ulaşmış ve bu seviyeyi daha uzun süre korumuştur.



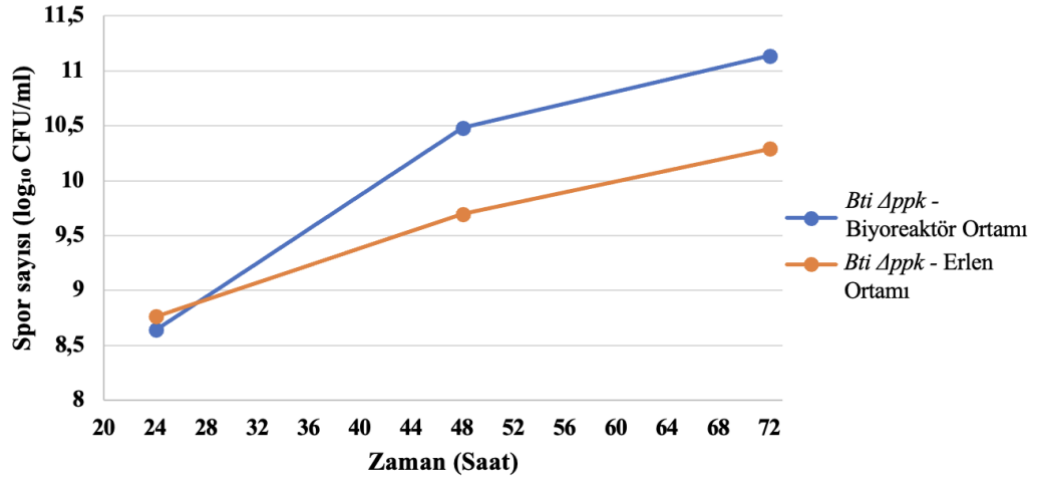
Şekil 7.16: *Bti Δppk* suşunun 0–72 saat arası 2 L biyoreaktör ve 500 ml Erlen'de büyüme eğrisi. **Mavi Renk:** Kültür DSM besiyerinde, 2 L'lik Applikon fermentörde (Getinge, Hollanda) 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. **Turuncu Renk:** Kültür DSM besiyerinde Erlen'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

7.4.2. *Bti* Δ *ppk* Suşunun Fermentörde Spor ve Canlı Hücre Sayımı

Bti Δ *ppk* suşunun DSM besiyerinde Erlen ve 2 L fermentör koşullarında spor üretimi incelendiğinde (Şekil 7.17), her iki ortamda da 24. saatten itibaren spor sayısının düzenli olarak arttığı, ancak fermentör koşullarında artışın daha dik olduğu görülmektedir. 48. saatte ise Erlen ortamına göre belirgin şekilde daha yüksek spor üretimi sağlandığı dikkat çekmektedir. Bu durum 72. saatte korunmuş olup fermentör koşullarında elde edilen spor sayısı Erlen ortamındakine kıyasla daha yüksek kalmıştır.

2 L fermentörde gerçekleştirilen fermentasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde alınan örneklerle spor sayısı (Şekil 7.17) ile canlı hücre sayısı (Tablo 7.5) belirlenmiş, hücrelerin morfolojik görüntüsü ise Gram boyama (Şekil 7.18) sonrası incelenmiştir. Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde *Bti* Δ *ppk* suşunun beklenen büyüme ve sporulasyon profilini sergilediği görülmektedir. 24. saatte hücrelerin çoğu vejetatif formda bulunurken (Şekil 7.18, 24. saat) spor sayısı nispeten düşük, canlı hücre sayısı yüksektir. 48. saatte OD₆₀₀ değerinin maksimuma ulaştığı (Şekil 7.16) ve Gram boyamanın çoğunlukla uzun, aktif bölünen hücreleri gösterdiği görülmüş, spor sayısında logaritmik artış ve canlı hücre sayısında da zirve gözlenmiştir. 72. saatte hücre morfolojisi belirgin şekilde değişmiş, kristal proteinler ve sporlar mikroskopik olarak görünür hale gelmiş (Şekil 7.18, 72. saat), spor sayısı maksimuma ulaşmış (Şekil 7.17) ve buna paralel olarak canlı hücre sayısı bir düşüş sergilemiştir. Bu eğilim, vejetatif hücrelerin büyük kısmının spor formuna geçtiğini ve popülasyonda metabolik olarak aktif hücrelerin oranının azaldığını göstermektedir. Mikroskopik görüntüler (Şekil 7.18), fermentör koşullarında büyüyen kültürün homojenliğini, mikrobiyal saflığı, kontaminasyondan uzak olduğunu göstermektedir.

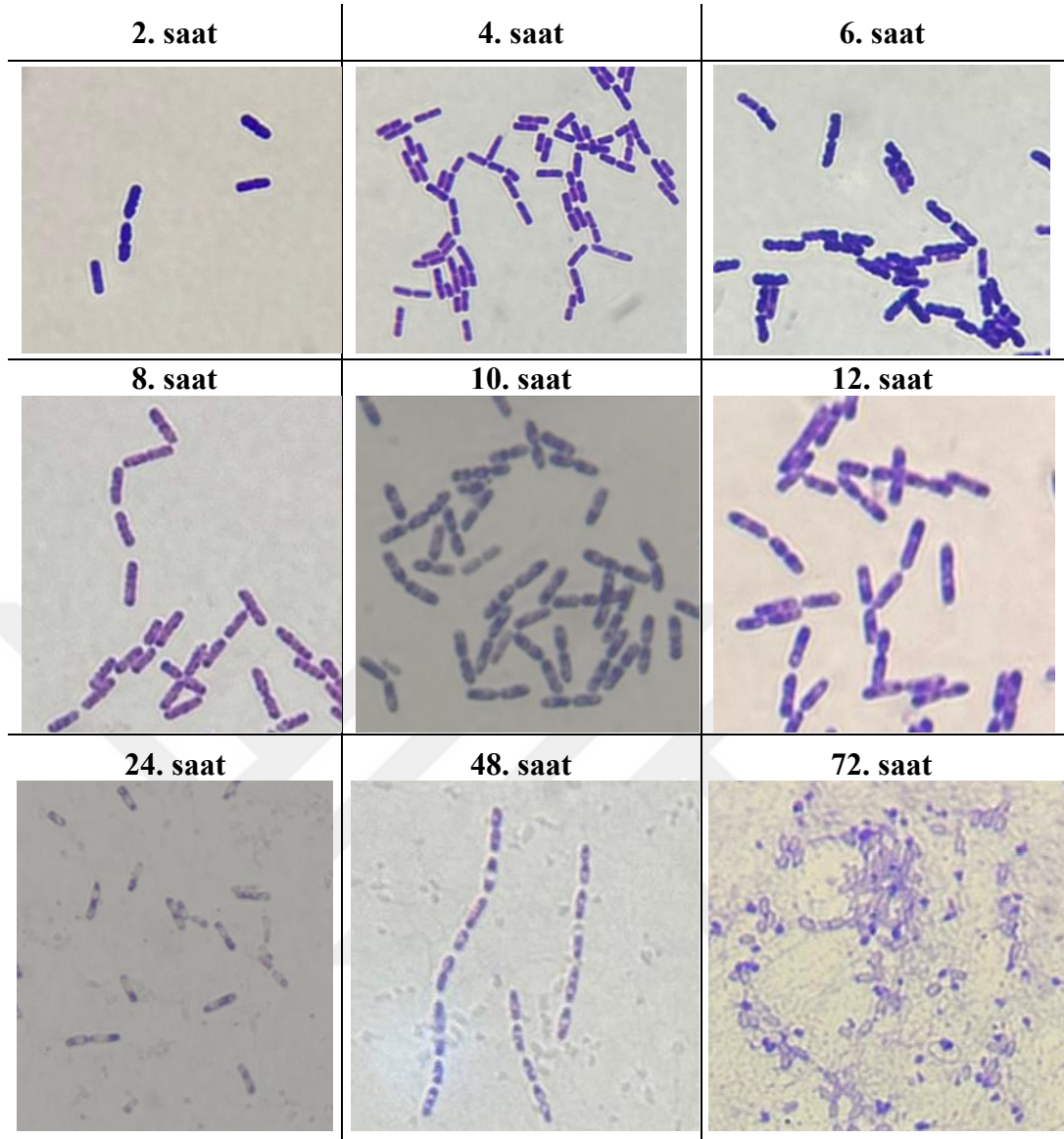
***Bti* Δppk suşunun DSM besiyerinde 2 L biyoreaktör ve 500 ml Erlen koşullarında spor üretimi (log CFU/ml)**



Şekil 7.17: *Bti* Δppk suşunun DSM besiyerinde sporlanma kapasitesi. **Mavi Renkli Eğri:** 2 L biyoreaktörde spor üretimi (log₁₀ CFU/ml). **Turuncu Renkli Eğri:** 500 ml Erlen'de spor üretimi (log₁₀ CFU/ml). Kültürler 30 °C'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Tablo 7.5: Fermentör koşullarında büyüyen *Bti* Δppk suşunun canlı hücre sayımı sonuçları.

Zaman (Saat)	Canlı Hücre Sayımı (CFU/ml)	log ₁₀ (CFU/mL)
24	$1,0 \times 10^{10}$	10,00
48	$4,23 \times 10^{10}$	10,63
72	$1,0 \times 10^9$	9,00

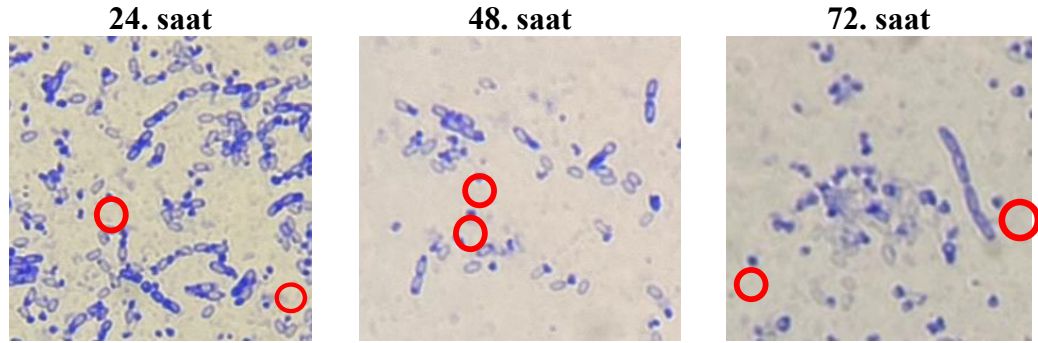


Şekil 7.18: Fermentör koşulları altında büyüyen *Bti Δppk* suşunun Gram boyama sonucunun 100X objektif kullanılarak ışık mikroskobu altındaki görüntüleri.

7.4.3. *Bti Δppk* Suşunun Fermentörde Kristal Protein Üretimi

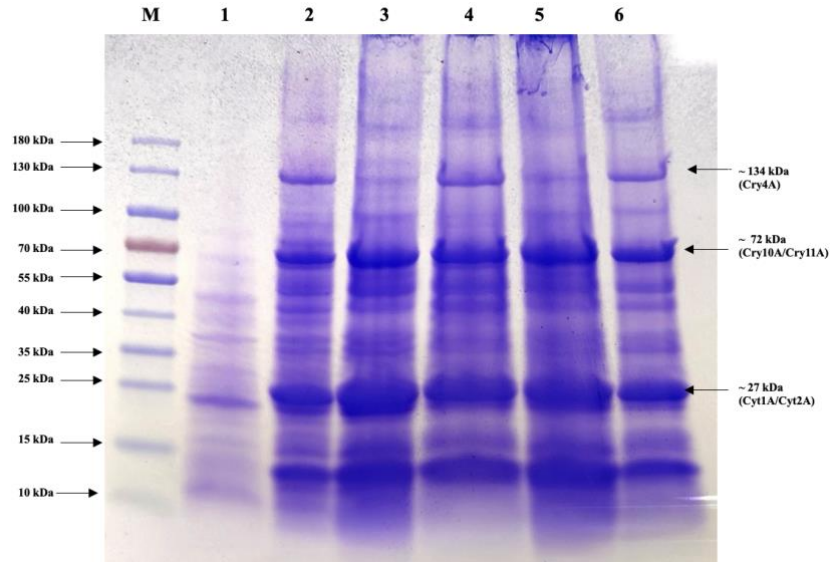
Bti Δppk suşunun fermentör koşullarında 24., 48. ve 72. saatlerde alınan örnekleri ışık mikroskobu altında incelendiğinde, zamanla kristal protein yapılarının oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 7.19). Özellikle 48. ve 72. saatlerde kırmızı çemberlerle işaretlenen amorf yapılar, bu suşun karakteristik δ -endotoksin kristallerine işaret etmektedir. Bu bulgu, suşun sporlaşma fazına geçişle birlikte insektisidal kristal protein üretmeye başladığını göstermektedir. Böylece mikroskobik incelemeler, elde edilen OD ve CFU

verileriyle uyumlu olarak, 24. saatten sonra başlayan durağan fazda kristal oluşumunun başladığını doğrulamaktadır.



Şekil 7.19: Fermentör koşullarında DSM besiyerinde büyütülen *Bti Δppk* suşunun kristal boyama sonuçları. Kültürlerden alınan örnekler 24., 48. ve 72. saatlerde ışık mikroskobu altında (100X objektif) incelenmiştir. Kırmızı çemberler içinde amorf yapıda gözlenen muhtemel δ -endotoksin kristalleri işaretlenmiştir.

Fermentasyon boyunca 24., 48. ve 72. saatlerde alınan örneklerden endotoksin proteinleri izole edilmiş ve bu örnekler aynı suşun Erlen düzeyindeki endotoksin proteinleri ile karşılaştırmalı olarak SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 7.20).



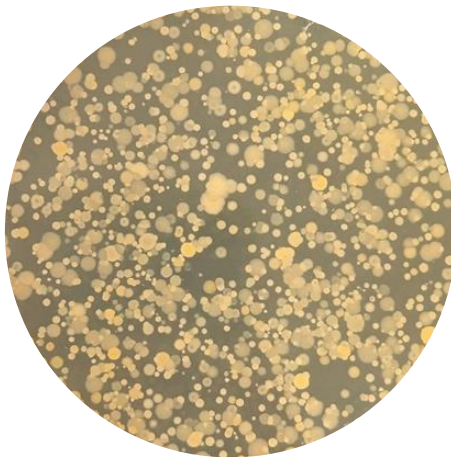
Şekil 7.20: *Bti Δppk* suşunun 24, 48 ve 72. saatlerde Erlen ve biyoreaktör koşullarında üretilmiş protein profillerinin SDS-PAGE analizi. **M:** Protein marker (Thermo Scientific). **Kuyu 1:** *Bti Δppk* 24. saat erlen kültürü, **Kuyu 2:** *Bti Δppk* 24. saat fermentör kültürü, **Kuyu 3:** *Bti Δppk* 48. saat Erlen kültürü, **Kuyu 4:** *Bti Δppk* 48. saat fermentör kültürü, **Kuyu 5:** *Bti Δppk* 72. saat Erlen kültürü, **Kuyu 6:** *Bti Δppk* 72. saat fermentör kültürü.

Elde edilen SDS-PAGE sonuçlarına göre 24. saatte Erlen kültürü örnekleri zayıf Cry ve Cyt protein bantları sergilerken fermentör koşullarında bu bantlar daha kalın ve belirgindir. 48. saatte Erlen kültür örneklerindeki Cry ve Cyt protein bantları maksimum seviyeye ulaşırken 48. saatte fermentör örneklerindeki bantların bir önceki saate göre daha yoğun hale geldiği, ancak Erlen seviyesine ulaşamadığı gözlemlenmiştir. 72. saatte fermentör örneklerinde bant yoğunluklarında hafif bir azalış gözlemlenmiştir, ancak bu saatin Erlen düzeyindeki Cry ve Cyt protein bantlarının seviyesine ulaşamamıştır. Bu sonuçlar, fermentör ortamında ileri optimizasyon çalışmalarının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

7.5. Ölü Böceklerden Olası *Bt* Suşlarının İzolasyonu

Tez çalışması kapsamında elimizde var olan rekombinant suşların analizleri devam ederken kristal protein üretebilen doğal suşların izolasyonu ile ilgili deneyler yürütülmüştür. Bunun için farklı türlere ait ölü böcek örnekleri toplanmış ve bu örneklerden *Bt* benzeri bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonucunda elde edilen süspansiyonlar seri dilüsyonlar halinde nalidiksik asit (25 mg/ml) ve nistatin (50 mg/ml) içeren besiyerlerine ekilmiş ve oda sıcaklığında 48 saat boyunca büyümeye bırakılmıştır. 48. saatin sonunda elde edilen bakteri kültürlerinin koloni morfolojileri Şekil 7.21’de sunulmuştur.

A)



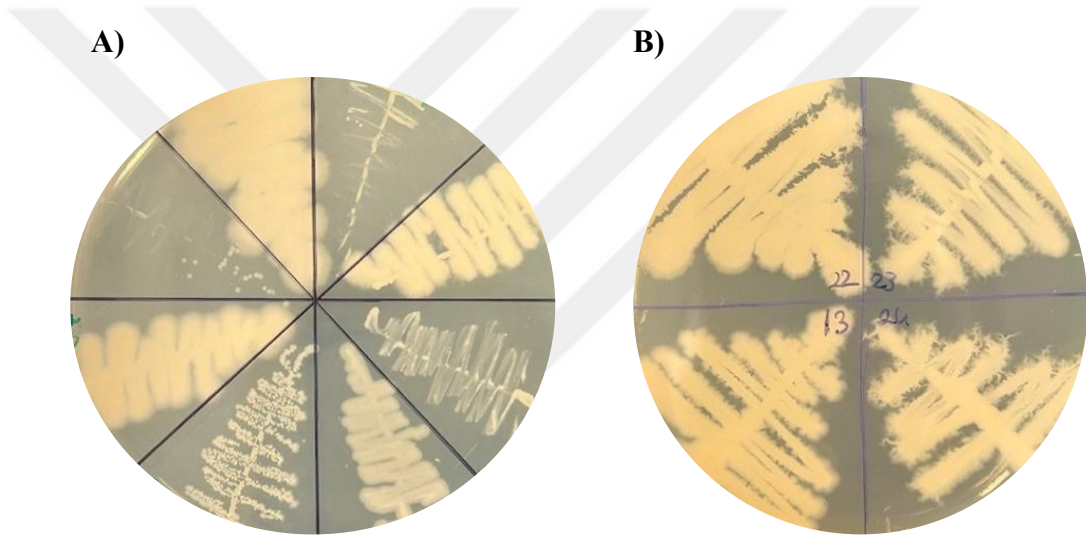
B)



Şekil 7.21: Böcek örneklerinden izole edilen bakteri kültürlerinin antibiyotik içeren besiyerine ekiminden sonra elde edilen koloni görüntüleri. **A)** Etanol ön işlemine tabi tutulan örnekten elde edilen kültür. **B)** Isıl işlem uygulanan süspansiyondan elde edilen kültür.

7.5.1. Koloni Morfolojisine Dayalı Ön Seçim

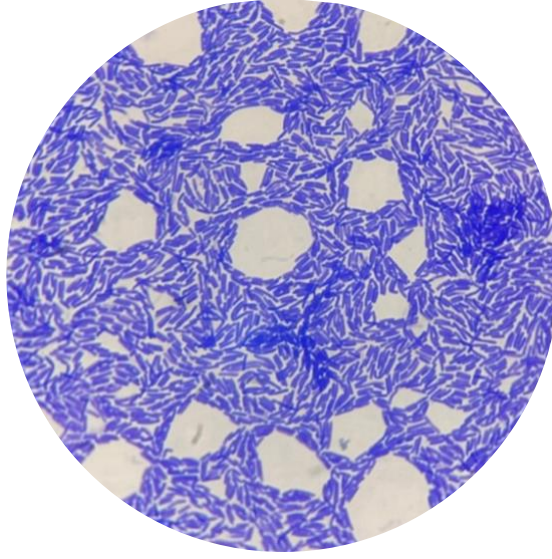
Elde edilen bakteri kültürlerinden öncelikle koloni morfolojisine dayalı bir ön seçme işlemi literatürde *Bt* için tanımlanan kriterlere göre düz beyaz ve kenarları düzenli/düzensiz olarak tanımlanan koloniler seçilmiştir [Zothansanga vd., 2016; Mallick vd., 2023]. İlk tarama sonrası büyüme karakteristikleri *Bt* suşlarına en çok benzeyen 48 izolat seçilmiş ve bu izolatlar, sekiz bölgeye ayrılmış Petri kaplarında alt kültürleme yapılarak yeniden değerlendirilmiştir. Bu ikinci değerlendirme aşamasında koloni morfolojisi ve gelişim hızı göz önünde bulundurularak toplam izolat sayısı 24'e düşürülmüştür. Örnek olarak bazı izolatların morfolojik görüntüsü Şekil 7.22'de sunulmuştur.



Şekil 7.22: A) İlk alt kültürleme sonuçlarına örnek olarak paylaşılan suşlar. B) Morfolojik olarak *Bt*'ye benzeyen 24 izolatın ikinci alt kültürleme sonuçlarına örnek olarak paylaşılan suşlar.

7.5.2. Gram Boyama

Gram boyama sonrasında elde edilen mikroskopik görüntüler değerlendirilmiş ve incelenen 24 suşun tamamının Gram pozitif olduğu belirlenmiştir. Örnek teşkil etmesi amacıyla bu suşlardan birine ait mikroskopik görüntü Şekil 7.23'te sunulmuştur. İncelenen 24 suş arasında çubuk morfolojisi göstermeyip kok formunda gözlemlenen 4 suş çalışma kapsamı dışında bırakılmıştır. Ayrıca alt kültürleme sonrası üreme göstermeyen 12 suş elenmiştir. Böylece, morfolojik ve kültürel özellikleri uygun bulunan toplam 8 suş ile sonraki analizler sürdürülmüştür. Bu suşların katı besiyeri üzerindeki koloni morfolojilerine ilişkin detaylar Tablo 7.6'da sunulmaktadır.



Şekil 7.23: Gram pozitif, çubuk morfolojisine sahip olan bakterilerden bir tanesinin Gram boyama sonucu (İzolat #16).

Tablo 7.6: Katı besiyeri üzerindeki koloni morfolojileri.

İzolat	Koloni Morfolojisi
#1	Beyaz, düz, yuvarlak, kızarmış yumurta (fried egg), düzgün kenarlı
#4	Beyaz, düz, yuvarlak, kızarmış yumurta (fried egg), rizoid (kök benzeri uzantılı) yapılı
#5	Beyaz, düz, yuvarlak, düzgün kenarlı
#6B	Açık beyaz, düz, yuvarlak, düzgün kenarlı
#7	Beyaz, düz, düzgün kenarlı
#9	Açık beyaz, düz, düzgün kenarlı
#16	Beyaz, düz, düzgün/rizoid yapılı
#19	Beyaz, düz, düzgün kenarlı

7.5.3. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

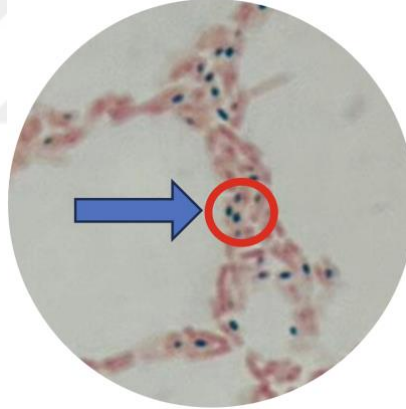
Katalaz testi sonucunda oksijen kabarcıkları çıkaran suşlar çıkardıkları oksijen miktarlarına göre karşılaştırmalı olarak Tablo 7.7’de verilmiştir. Katalaz testi sonucu 8 suşun hepsi katalaz pozitif olarak raporlanmıştır. Pozitif kontrol olarak *Bti* yaban suş kullanılmıştır.

Tablo 7.7: Katalaz testi sonuçları.

#1: +	#7: +
#4: ++	#9: +
#5: +	#16: +
#6B: +	#19: ++
Az (+), Normal (++)	Pozitif Kontrol: +

7.5.4. Spor Boyama

Malaşit yeşili ile yapılan boyama sonucunda 8 izolattan 5'nin sporlandığı görülmüştür. Örnek olarak izolatlardan bir tanesinin boyama sonucu Şekil 7.24'te verilmiştir. İzolatların sporlanma durumlarına ait detaylı değerlendirmeler Tablo 7.8'de verilmiştir.



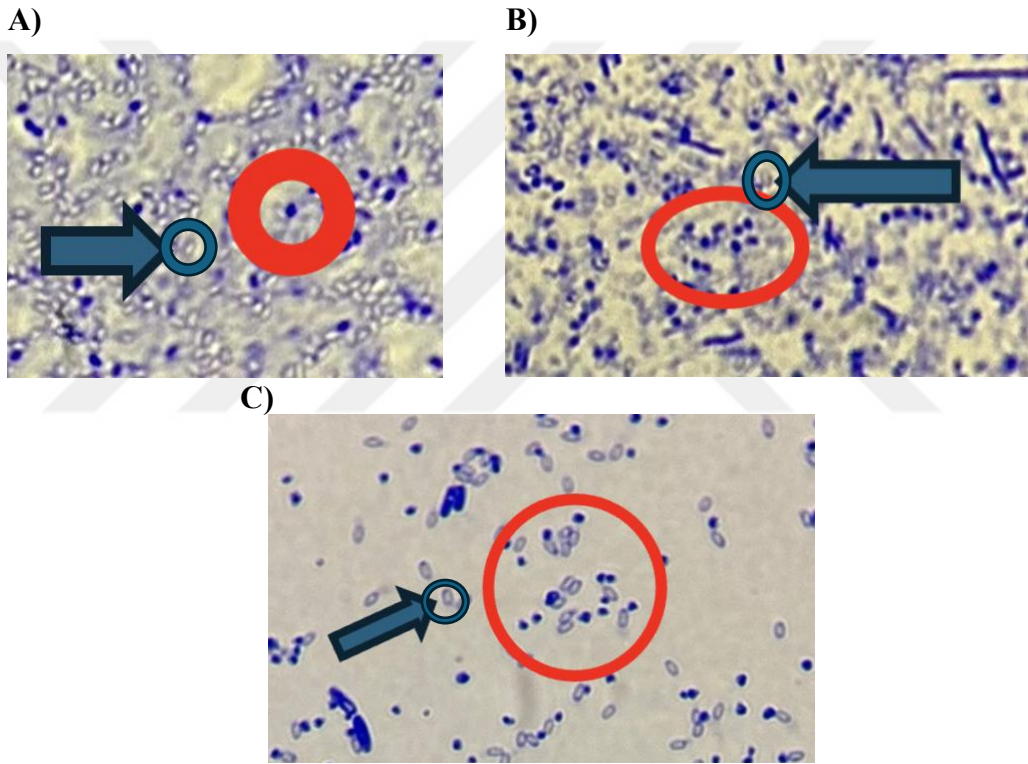
Şekil 7.24: İzolat #19'in spor boyama sonucu. 100X objektif kullanılarak ışık mikroskobu altında gözlenen sporlar kırmızı çember içerisine alınmış, mavi ok ile gösterilmiştir.

Tablo 7.8: Spor boyama sonuçları.

#1: Spor pozitif	#7: Spor negatif
#4: Spor pozitif	#9: Spor pozitif
#5: Spor negatif	#16: Spor pozitif
#6B: Spor negatif	#19: Spor pozitif

7.5.5. Kristal Proteinlerin Boyanması

İzole edilen 8 suşun kristal protein üretim potansiyelini belirlemek amacıyla, suşlar üç gün boyunca DSM besiyerinde inkübe edilmiş ve ardından kristal boyaması yapılmıştır (Şekil 7.25). Mikroskop analizleri sonucunda izolatların sahip oldukları kristal yapılar iki ana grupta sınıflandırılmıştır: Bipiramidal/piramidal yapıda kristaller ve ovoid/amorf yapıda kristaller. İzolatların ürettiği kristal proteinlerin yapılarına ait detaylı değerlendirmeler Tablo 7.9’da sunulmuştur. Ayrıca, referans olarak kullanılan *Bti* yaban suşunun aynı koşullar altında oluşturduğu spor-kristal yapıları karşılaştırma amacıyla Şekil 7.25’te gösterilmiştir.



Şekil 7.25: DSM besiyerinde 72 saatlik inkübasyon sonrası oluşan spor-kristal yapılarının 100X objektif kullanılarak ışık mikroskobu altındaki görüntüleri. **A)** Bipiramidal yapıda olan kristaller (İzolat #7), **B)** Ovoid veya amorf yapıda olan kristaller (İzolat #19), **C)** Referans suşu *Bti* yaban suşuna ait amorf ve piramidal yapıdaki kristal yapıları. Kristal yapılar kırmızı daire içerisine alınmış, spor yapıları mavi ok ve mavi çember içerisinde gösterilmiştir.

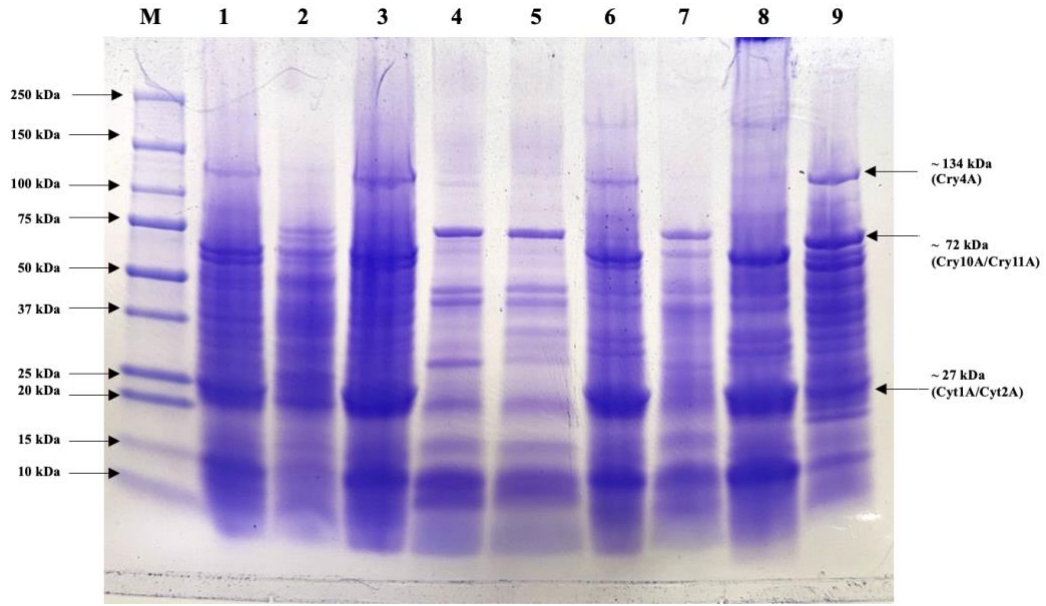
Tablo 7.9: Kristal proteinlerin yapıları.

#1: Bipiramidal, amorf (şekilsiz)	#7: Ovoid, amorf
#4: Bipiramidal, amorf	#9: Çubuk, amorf
#5: Bipiramidal, amorf, çubuk	#16: Bipiramidal, amorf, çubuk
#6B: Bipiramidal, piramidal, amorf	#19: Bipiramidal, amorf

7.5.6. SDS-PAGE Analizi

DSM besiyerinde 72 saat büyütülen izolatlara ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analiz sonuçları Şekil 7.26’da verilmiştir. Referans suşu olarak *Bti* yaban suşu kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına göre, bazı izolatlarda ~134 kDa (Cry4A), ~72 kDa (Cry10A/Cry11A) ve ~27 kDa (Cyt1A/Cyt2A) bantları referans suşla benzer şekilde gözlemlenmiştir. Özellikle İzolat #5 (Kuyu 3), İzolat #9 (Kuyu 6) ve İzolat #19 (Kuyu 8)’de Cry ve Cyt protein bantlarının yoğunluğu, *Bti* yaban suşundan yüksek düzeyde bulunmuştur. Bu izolatların δ -endotoksin üretim kapasitelerinin yüksek olduğu ve biyoinsektisidal potansiyel açısından öne çıktığı belirlenmiştir.

Buna karşılık, bazı izolatlarda bant yoğunlukları zayıf veya eksik gözlenmiştir. Örneğin İzolat #6B (Kuyu 4), İzolat #7 (Kuyu 5) ve İzolat #16 (Kuyu 7)’de Cry ve Cyt protein bantlarının belirgin olmadığı ve farklı bant profillerinin tespit edildiği görülmüştür. Bu durum, söz konusu izolatların sınırlı δ -endotoksin üretim kapasitesine sahip olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 7.26: DSM besiyerinde 72 saat büyütülen izolatlara ait kristal proteinlerin SDS-PAGE analiz sonuçları. **M:** Protein marker (Thermo Scientific), **Kuyu 1:** İzolat #1, **Kuyu 2:** İzolat #4, **Kuyu 3:** İzolat #5, **Kuyu 4:** İzolat #6B, **Kuyu 5:** İzolat #7, **Kuyu 6:** İzolat #9, **Kuyu 7:** İzolat #16, **Kuyu 8:** İzolat #19, **Kuyu 9:** *Bti* yaban suş.

7.5.7. Biyolojik Aktivite Deneyleri

Deneylerde, 2. ve 3. evre *Culex pipiens* sivrisinek larvaları kullanılmış, pozitif kontrol olarak *Bti* yaban suş kullanılmıştır. Gerçekleştirilen biyotestler sonucunda #1, #4, #5, #9 ve #19 numaralı izolatların *Culex pipiens* larvaları üzerinde öldürücü etki gösterdiği, diğer izolatların ise herhangi bir toksik etki oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Bu suşlar için LC₅₀ değerleri hesaplanmamış, bir ön çalışma olarak suşların yalnızca toksisiteleri değerlendirilmiştir.

7.5.8. Olası *Bt* İzolatları İçin Genel Değerlendirme

Böceklerden izole edilen bakteri suşlarına çok aşamalı bir ön eleme ve karakterizasyon analizleri uygulanmıştır. Öncelikle koloni morfolojilerine dayalı ön seçim gerçekleştirilmiş, daha sonra Gram boyama ile hücre morfolojisi belirlenmiş ve katalaz aktivitesi değerlendirilmiştir. Bu analizler doğrultusunda seçilen suşların δ -endotoksin kristallerinin varlığını tespit etmek amacıyla Coomassie Brilliant Blue boyaması yapılmış ve kristal inklüzyon yapısına sahip olanlar belirlenmiştir. Ardından, protein profillerinin değerlendirilmesi amacıyla SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Son olarak, seçilen suşların biyolojik etkinlikleri değerlendirilmiştir.

Seçilen 8 izolatın Gram pozitif olduğu, katalaz aktivitesine sahip oldukları, bazı izolatların spor oluşturduğu ve 2. evre *Culex pipiens* larvaları üzerinde öldürücü etki gösterdiği tespit edilmiştir.



8. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, laboratuvarımızda daha önce oluşturulmuş rekombinant *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) suşlarının δ -endotoksin üretim potansiyelleri karşılaştırılarak, endüstriyel üretim için en uygun suş seçilmiş, kültür koşulları optimize edilmiş ve fermentör koşullarında toksin üretimi gerçekleştirilmiştir. Böylelikle ilgili suşun endüstriyel uygulamalara yönelik üretim potansiyeli de ortaya konmuştur. Ayrıca çalışma kapsamında, ölü böcek örneklerinden izole edilen *B. thuringiensis* benzeri suşlar koloni morfolojisi, kristal yapıları, toksin üretim kapasiteleri, sivrisinek öldürücü etkileri açısından incelenmiş ve etkili biyoinsektisidlerin geliştirilmesi için umut vadeden izolatlar elde edilmiştir.

Çalışmaya, Doruk (2013) ve Barkad (2021) tarafından oluşturulan *Bti* pHT315ppk ve *Bti* pHT315lon rekombinant suşların -80 °C'deki gliserol stoklarıyla başlanmıştır [Doruk vd., 2013; Barkad vd., 2021]. Bu suşlar kullanılarak gerçekleştirilen endotoksin izolasyonu sonrasında yapılan SDS-PAGE analizlerinde sonuçlar Doruk (2013) ve Barkad (2021) tarafından gerçekleştirilen SDS-PAGE analizleri ile tutarlılık göstermemiştir [Doruk vd., 2013; Barkad vd., 2021]. Bu durumun, suşların uzun süre -80 °C'de saklanmasından kaynaklanan biyolojik aktivite kaybına bağlı olabileceği değerlendirilmiştir. Literatürde yapılan çeşitli çalışmalar, bakteriyel suşların -80 °C'de uzun süreli olarak gliserol içerisinde stoklanmasının, plazmid stabilitesi açısından her zaman güvenli olmayabileceğini göstermektedir. Örneğin, Sheppard ve ark. (2016) nematodlara karşı toksik Cry proteinlerini kodlayan büyük bir plazmidi taşıyan *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) suşunun -80 °C'de gliserol içerisinde saklandıktan sonra, plazmidi hızla kaybettiğini bildirmiştir [Sheppard vd., 2016]. Benzer şekilde, Marston ve ark. (2005) da -80 °C gliserol içerisinde saklanan *Bacillus anthracis* suşlarının virülans plazmidlerini kaybettiklerini tespit etmiştir [Marston vd., 2005]. Bu çalışmalar, -80 °C gliserol stoklar kullanılarak kültürlen suşlarda plazmid kaybı yaşanmasının biyolojik olarak beklenebilir bir durum olduğunu gösterdiğinden, tez çalışması kapsamında *Bti* pHT315ppk ve *Bti* pHT315lon suşları yeniden oluşturulmuş ve çalışmaya ppk geni olmayan *Bti* Δ ppk mutant suşu da dahil edilmiştir.

Bti pHT315ppk, *Bti* pHT315lon ve *Bti* Δ ppk suşlarının toksin üretimleri özellikle Cry4A (~134 kDa), Cry11A (~72 kDa) ve Cyt1A/Cyt2A (~27 kDa) kristal proteinlerine odaklanarak karşılaştırılmıştır. *Bti* Δ ppk mutanti, yaban suşa kıyasla bu

toksinleri daha yoğun şekilde üretmiş, özellikle Cry11A ve Cyt proteinlerinde belirgin bir artış sergilemiştir. Bu sonuçlar, *Bti Δppk* mutantının endotoksin üretim kapasitesinde anlamlı bir artışa işaret etmektedir. Buna karşın, yeniden oluşturulan plazmit taşıyan rekombinant suşlar (*Bti* pHT315*ppk* ve *Bti* pHT315*lon*) daha zayıf profil sergilemiş, özellikle Cry proteinlerinin yoğunluğu düşmüştür. Bu suşlarda gözlenen düşük bant yoğunluğu, plazmid stabilitesine bağlı olarak endotoksin genlerinin etkin şekilde ifade edilememesi ya da toksin genlerini taşıyan plazmidin kaybedilmesi ile açıklanabilir [Bentley ve Kompala, 1989; Sarrafzadeh vd., 2007].

Kristal proteinlerin karşılaştırıldığı SDS-PAGE jellerinde *Bti Δppk* suşunun hem yaban suşa göre hem de diğer rekombinant suşlara göre daha yüksek düzeyde δ -endotoksin ürettiği gözlenmiştir. Low ve ark., (2023) ile Atkinson (2010) *Bacillus* hücrelerinde poliP metabolizmasının düzenlenmesinin endotoksin üretimi üzerinde pozitif etkiler oluşturabileceğini vurgulamıştır [Low vd., 2023; Atkinson, 2010]. Yeşilirmak ve ark. (2018) tarafından yürütülen proteomik analiz çalışmasında, *ppk* geninin silindiği *Bacillus thuringiensis* mutantlarında kristal protein sentezinde artış olduğu rapor edilmiştir [Yeşilirmak vd., 2018].

Plazmit taşıyan rekombinant suşların endüstriyel ölçekli üretim açısından uygun olmaması, ayrıca genetik stabilitesinin daha fazla olması sebebiyle büyük ölçekli fermentasyon süreçleri için *Bti Δppk* suşu seçilmiştir. Öncelikle, *Bti Δppk* suşunun büyümesi ve sporlanma kapasitesi yaban suşla karşılaştırılmış, ardından DSM besiyerinde δ -endotoksin üretimi üzerinde sıcaklık, pH ve farklı karbon kaynaklarının etkilerini belirlemeye yönelik optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bti Δppk suşunun yaban suşa kıyasla daha yüksek hücre yoğunluğuna ulaştığı ve bu seviyeyi daha uzun süre koruyabildiği gösterilmiştir. Bu sonuç, sadece endotoksin üretim kapasitesi açısından değil, aynı zamanda hücre çoğalması ve kültür stabilitesi bakımından da *Bti Δppk* suşunun avantajlı bir suş olduğunu göstermektedir. Ayrıca, sporlanma verileri bu avantajı pekiştirir niteliktedir. *Bti Δppk* suşu, fermentasyonun örnek alınan her saatinde (24., 48. ve 72. saatlerde) yaban suşa kıyasla anlamlı derecede daha yüksek sayıda spor üretmiştir. Sporulasyonun Cry proteinlerinin sentezinde tetikleyici rol oynadığı ve spor üretiminin endotoksin birikimi ile paralellik gösterdiği daha önce de belirtilmiştir [Aronson, 2002]. Dolayısıyla, bu mutant suş yalnızca genetik modifikasyonla endotoksin üretimi artırılmış bir varyant olarak değil,

aynı zamanda biyokütle ve spor oluşumu açısından da endüstriyel biyopestisit üretimi için potansiyel bir aday olarak değerlendirilebilir.

Zamana bağlı SDS-PAGE analizleri, *Bti* Δppk suşunun δ -endotoksin üretiminin 48. saatte başlayıp maksimum değere ulaştığını, 72. saatte hafif bir azalış ile δ -endotoksin üretimine devam ettiğini ve 96. saate kadar bu düzeyde sürdüğünü göstermektedir. 120. saatte ise bant yoğunluğunda kısmi bir düşüş gözlenmiştir. Bu bulgular, 48 saatlik fermentasyonun endotoksin üretimi açısından optimum süre olduğunu ortaya koymuştur. Liu ve Tzeng (2000) tarafından yapılan çalışmada, *B. thuringiensis* suşlarında sporulasyon ve toksin üretiminin log faz sonrasında hızlandığı ve bu üretimin zamanla değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir [Liu ve Tzeng, 2000]. Dolayısıyla, *Bti* Δppk suşunda gözlenen erken ve güçlü üretim profili, bu suşun biyopestisit üretimi için zaman verimliliği açısından önemli avantajlar sunduğunu göstermektedir. Tez çalışması kapsamında, laboratuvarımızda gerçekleştirilen önceki deneyler ile karşılaştırmalı analizlerin yapılabilmesi amacıyla, *Bti* suşlarının inkübasyon süresinin 72 saat olmasına karar verilmiştir.

Farklı sıcaklıklarda yürütülen SDS-PAGE analizleri, sıcaklığın endotoksin üretimini doğrudan etkilediğini göstermektedir. Hem yaban sušta hem de *Bti* Δppk mutantında 25 °C'de en yüksek bant yoğunluğu elde edilmiş, özellikle Cry ve Cyt proteinleri bu sıcaklıkta daha belirgin gözlenmiştir. 30 °C'de bant yoğunluğu azalmış, 37 °C'de ise endotoksin bantları oldukça zayıflamıştır. Literatürde de benzer şekilde, düşük sıcaklık koşullarında *B. thuringiensis* suşlarının daha verimli kristal protein üretimi gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Örneğin Afkhami ve ark., (1993) yapmış olduğu çalışmada, *Bacillus thuringiensis* (*B.t.* 81) suşunun 25 °C'de en yüksek, 42 °C'de ise en düşük kristal protein üretimi gözlenmiştir [Afkhami vd., 1993]. Ancak endüstriyel fermentör uygulamalarında 25 °C'nin soğutma maliyetlerini artıracığı göz önüne alındığında, 30 °C'nin hem üretim verimliliği hem de maliyet açısından daha uygun olduğu söylenebilir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında 30 °C optimum sıcaklık olarak seçilmiştir.

Farklı pH değerlerinde yapılan SDS-PAGE analizleri, ortamın asidik ya da alkali olmasının *Bti* suşlarının δ -endotoksin üretim kapasiteleri üzerinde belirleyici olduğunu göstermektedir. *Bti* yaban suşu optimum üretimi pH 6.0–7.0 aralığında gösterirken, *Bti* Δppk mutant suşu özellikle pH 8.0 ve 9.0 koşullarında daha yüksek üretim

sergilemiştir. Bu durum, *Bti Δppk* suşunun alkali ortamlarda endotoksin üretiminde yaban suşuna göre daha avantajlı olduğunu göstermektedir.

Fermentasyon ortamında *Bt*'nin vejetatif büyüme evresinde karbon kaynaklarının (örneğin glikoz, nişasta) hızla tüketilmesiyle organik asitler (örneğin asetat, laktat, pirüvat vb.) oluşmakta ve bu da ortamın pH'sında düşüşe yol açmaktadır. Sporlanma evresine geçildiğinde ise protein ve amino asitlerin yıkımı, amonyak ve bazik bileşiklerin salınımını beraberinde getirerek ortam pH'sının yükselmesine ve ortamın bazikleşmesine sebep olmaktadır [Choe vd., 2022; Molina-Peñate vd., 2023; Sharma vd., 2022]. Dolayısıyla, hücrel faz değişimi pH'nın yönünü belirleyen faktörlerden biri olarak kabul edilebilir, ancak bu mekanizma tek başına tüm pH değişimini açıklamaktan uzaktır. Ortam bileşimi (örneğin C/N oranı, karbon ve azot kaynakları), çözülmüş oksijen düzeyi (aerasyon/karıştırma durumu), sıcaklık gibi proses parametreleri de pH dinamiği üzerinde belirleyici rol oynamaktadır [Malairuang vd., 2022].

Literatürde, pH değişimlerinin *Bt*'nin sporulasyon ve kristal protein sentezini önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir. İçgen ve Özcengiz (2002), farklı pH koşullarında kristal protein biyosentezinin düzenlenebileceğini ve pH 6.8–7.0 civarının çoğu *Bt* suşu için optimum aralık olduğunu belirtmiştir [İçgen ve Özcengiz, 2002]. Ancak *Bti Δppk* gibi mutant suşlarda bu optimum aralığın kayabileceği ve alkali pH'ların daha verimli üretime olanak tanıyabileceği bu çalışmanın çıktılarından biridir. Dolayısıyla *Bti Δppk* suşunun alkali ortamlarda yaban suşa kıyasla daha yüksek endotoksin üretmesi, bu suşu büyük ölçekli üretim için daha avantajlı bir aday haline getirdiği düşünülebilir.

Farklı karbon kaynaklarının δ -endotoksin üretimine etkisi değerlendirildiğinde, yaban suşun mannitol ve sükroz içeren ortamlarda daha belirgin protein bantları sergilediği, buna karşılık *Bti Δppk* mutantının özellikle glikoz ve nişasta içeren ortamlarda daha yoğun Cry ve Cyt protein üretimi gerçekleştirdiği görülmüştür. Karbon kaynaklarına yönelik literatür taramasında, İçgen ve ark. (2002) ile Özkan ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmalar, sükroz ve laktoz gibi karbon kaynaklarının toksin üretimini teşvik ettiğini; glikoz gibi daha kolay metabolize edilebilen şekerlerin ise çoğunlukla hücre büyümesini desteklediğini ancak toksin üretimini sınırlayabildiğini ortaya koymuştur

[İçgen vd., 2002; Özkan vd., 2003]. Ancak bu çalışmalarda mannitolün kullanımına dair veri bulunmamaktadır.

Literatürde yalnızca sınırlı sayıda çalışma, mannitolü *Bti* ile ilişkilendirmiştir. Örneğin Kaur ve ark. (2006) bazı *Bti* izolatlarının mannitolü karbon kaynağı olarak fermente edebildiğini ve bu koşullarda toksin üretimi gerçekleştirdiğini belirtmiştir [Kaur vd., 2006]. Rabha ve ark. (2017) ise toprak kökenli *Bti* suşlarının karakterizasyonunda mannitol içeren besiyeri kullanmıştır [Rabha vd., 2017]. Ancak bu çalışmalar genellikle izolasyon ve tanımlama odaklıdır, doğrudan endotoksin optimizasyonuna yönelik değildir.

Deneyssel gözlemler, mannitolün teknik açıdan avantajlı bir karbon kaynağı olduğunu göstermiştir. Glikoz ve sükroz, otoklavlama sırasında karamelize olma riski nedeniyle filtre edilerek ortama eklenmek zorunda olduğundan endüstriyel ölçekli uygulamalarda pratik değildir. Öte yandan mannitol, doğrudan ortam bileşenleriyle birlikte otoklavlanabilir, kolay çözünür ve kullanım kolaylığı sağlar. Tez kapsamında kullanmış olduğumuz nişasta, *Bti* Δppk suşunda toksin üretimini artırmış olsa da düşük çözünürlükte ve yüksek ısıda uzun süreli karıştırılarak çözünmüş olduğundan üretim süreçlerinde kullanımı uygun bulunmamıştır. Kullanılan karbon kaynakları arasında mannitol yalnızca toksin üretimini teşvik etmesi yönünden değil, aynı zamanda endüstriyel uygulanabilirlik açısından da öne çıkmaktadır. Fakat, mannitolün bu çalışmada kullanılan diğer karbon kaynaklarına kıyasla daha yüksek maliyetli olması, endüstriyel ölçekte uygulanabilirliğini sınırlamaktadır. Dolayısıyla, hem ekonomik açıdan daha uygun hem de üretim süreçlerinde kolay hazırlanabilir karbon kaynaklarının belirlenebilmesi için ilave çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Optimizasyon çalışmalarının ardından, yaban suş ve *Bti* Δppk suşunun 2. ve 3. evre *Culex pipens* larvaları üzerindeki larvasidal toksisitesi LC_{50} ve LC_{90} değerleri cinsinden belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, *Bti* Δppk mutantının erken saatlerde (2. saat) daha düşük LC_{50} ve LC_{90} değerleriyle mortalite sağladığı görülmüştür. Çalışmamızda 2. saatte *Bti* yaban suşu için belirlenen LC_{50} değeri $13,9 \pm 2,3$ ng/ml olup Lahkim-Tsrör ve ark. (1983) tarafından rapor edilen 10 ng/ml LC_{50} değerine oldukça yakın bulunmuştur [Lahkim-Tsrör vd., 1983]. Aynı zaman noktasında *Bti* Δppk suşu için LC_{50} değeri $5,9 \pm 2,0$ ng/ml olarak belirlenmiş ve yaban suşa kıyasla daha düşük değer elde edilmiştir. Bu durum *Bti* Δppk suşunun yaban suşa

göre daha yüksek larvasidal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Mutant suş, uygulamanın erken süreçlerinde larvaları etkili bir şekilde öldürmüştür. Clark ve ark. (2005), CryIVB toksininin bağırsağın apikal membranında delikler ve vezikül benzeri şişkinlikler oluşturarak dakikalar–saatler ölçeğinde hızlı hücre hasarına yol açtığını göstermiştir [Clark vd., 2005]. *Bti* Δ *ppk* suşunun da yaban suşa kıyasla kısa zamanda larva ölümünü başlatan hızlı etki mekanizmasına sahip olduğu önerilmektedir.

Larvasidal aktivite deneylerinin ardından, öncelikle *Bti* yaban suşu ile 5 L kapasiteli Eppendorf BioFlo-120 biyoreaktörde DSM besiyerinde 72 saatlik üretimi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan gaz Linde TS.2.1.05 standardında tanımlanan sentetik kuru hava olup, oksijen manuel olarak sağlandığından çözünmüş oksijen düzeyi süreç boyunca dalgalanmıştır. Bu durum, özellikle fermentasyonun son evrelerinde kontrolsüz oksijen artışına yol açmış ve süreç boyunca düşük çözünmüş oksijen seviyeleri gözlenmiştir.

Literatürde oksijen konsantrasyonunun *Bt* sporulasyonu ve δ -endotoksin üretimi üzerinde önemli etkileri olduğu, yüksek ve düşük DO seviyelerinin her ikisinin de metabolik süreçleri baskılayabileceği bildirilmiştir [Bonniolo vd., 2012; Sarrafzadeh vd., 2014; Ghribi vd., 2007; Konz vd., 1998]. Ayrıca pH değişimleri ve ara metabolit birikiminin sporulasyon geçişlerinde belirleyici olduğu bilinmektedir [Benoit vd., 1990]. Çalışmamızda gözlenen yetersiz spor oluşumu ve üretim verimliliği, büyük ölçüde oksijen kontrolünün sağlanamamasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle fermentör deneyleri, daha kontrollü oksijen ve pH regülasyonu sağlayan Applikon (Geringe, Hollanda) fermentörü kullanılarak tekrarlanmıştır. Fermentör koşullarında *Bti* Δ *ppk* suşunun büyüme eğrisi, spor üretim potansiyeli ve Cry/Cyt toksin sentez profilleri çalışılmış ve değerler Erlen'de elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. *Bti* Δ *ppk* suşunun büyüme eğrileri incelendiğinde, flask ortamında OD₆₀₀ değeri hızlı bir şekilde artarak 12. saatte ~9,2'ye ulaşırken, fermentör ortamında büyüme daha yavaş başlamış ancak 24. saatte ~13,2 OD₆₀₀ ile daha yüksek seviyelere ulaşmıştır. Bu sonuç, literatürdeki çalışmalar ile benzerlik göstermekte olup fermentör ortamındaki kontrollü aerasyon sayesinde daha yoğun ve sürdürülebilir hücre büyümesinin mümkün olduğunu ortaya koymaktadır [Elsayed vd., 2014].

Spor sayımı sonuçları da bu durumu destekler niteliktedir. Fermentör ortamında spor sayısı 48. saatte $3,0 \times 10^{10}$ CFU/ml, 72. saatte ise $1,37 \times 10^{11}$ CFU/ml'e ulaşılmıştır.

Buna karşılık, Erlen ortamında aynı zaman noktalarında spor sayıları daha düşüktür. Literatürde, sporulasyonun log faz sonrasında hızlandığı ve 48–72. saatler arasında en yüksek seviyelere ulaştığı bildirilmektedir [Liu ve Tzeng, 2000; Benoit vd., 1990]. Awad ve ark. (2015) Erlen ve fermentör ortamlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, fermentörde daha kısa sürede büyümenin tamamlandığını ve spor üretiminin belirgin şekilde arttığını göstermişlerdir [Awad vd., 2015].

SDS-PAGE analizleri, 24. saatte fermentör örneklerinde Cry ve Cyt bantlarının belirgin hale gelmesi, bu koşullarda kristal protein üretiminin erken başladığını göstermektedir. 48. saatte fermentör örneklerinde bant yoğunlukları artmaya devam etmiş ancak flask düzeyinde gözlenen maksimum seviyelere ulaşmamıştır. 72. saatte ise bant yoğunluklarında hafif bir azalma görülmüş olsa da, üretimin devam ettiği ancak Erlen örneklerindeki seviyeye ulaşmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, kontrollü oksijen transferi ve pH regülasyonunun δ -endotoksin sentezini desteklediğini, ancak maksimum verim için daha ileri optimizasyon çalışmalarına (ör. aerasyon hızının artırılması, fed-batch stratejileri) ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır [Boniolo vd., 2012; Sarrafzadeh vd., 2014; Ghribi vd., 2007].

Bti ATCC 35646 yaban suşu, yurt dışı menşeli olması nedeniyle yerli üretimde etik ve yasal sınırlamalara tabidir [Rajendran, 2021; Li vd., 2017]. Bu suştan türetilen *Bti* Δppk suşunun endüstriyel ölçekte biyoinsektisid olarak üretilme potansiyeli güçlü olmakla beraber toksik etkisi artırılmış kombine ürünler elde etmek amacıyla bu tez çalışmasında, yerli *Bt* suşlarının elde edilmesine yönelik izolasyon çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

Çeşitli böcek örneklerinden toplam 48 *Bt* benzeri izolat elde edilmiştir. Yapılan ön değerlendirmeler sonucunda bu sayı 21'e düşmüş ve bu suşların morfolojik karakteristikleri, Gram boyama özellikleri, sporlanma kapasiteleri, katalaz aktiviteleri ve kristal protein yapıları incelenmiştir. Suşların bir kısmı +4 °C'de agar plaklarında uzun süre saklandığında büyüme yeteneklerini kaybetmiş, bazıları ise kontaminasyon nedeniyle elenmiştir. Sonuç olarak bu sayı 8'e düşmüş ve bu suşlar karakterize edilmiştir.

Literatürde yapılan farklı çalışmalar, *Bt* suşlarının koloni morfolojilerinin genellikle beyaz veya krem renkli, yuvarlak, düz ya da düzensiz kenarlı ve zaman zaman rizoid veya kızarmış yumurta benzeri yapılarda olabileceğini ortaya koymuştur [Çetinkaya,

2002; El-kersh vd., 2011; Kaviyapriya vd., 2019; Navya vd., 2022]. Bu çalışmada elde edilen 8 doğal izolatin değerlendirilmesi de bu bulgularla uyumlu olup izolatların tamamının düz yüzey morfolojisine sahip olduğu, önemli bir kısmının düzgün kenarlı, bir kısmının ise rizoid yapılı olduğu belirlenmiştir.

Çeşitli araştırmalar, *Bt* suşlarının kristal yapılarının bipiramidal, küresel, ovoid, küboidal, piramidal ve amorf gibi farklı morfolojilerde olabileceğini göstermektedir [Çetinkaya, 2002; El-kersh vd., 2011; Navya vd., 2022]. Bu çalışmada analiz edilen izolatların kristal yapıları literatür ile benzerlik göstermiş ve bipiramidal, amorf (şekilsiz), çubuk, piramidal ve ovoid olmak üzere beş ana sınıf altında toplanmıştır.

Kristal proteinlerin varlığı biyolojik aktivite için gerekli olmakla birlikte tek başına belirleyici değildir. Bazı araştırmalarda kristal yapılar tespit edilmesine rağmen sivrisinekler üzerinde larvasidal etki gözlenmediği bildirilmiştir [Al Bouq vd., 2010; El-kersh vd., 2011]. Bu çalışmada da kristal yapı barındırmasına rağmen biyolojik etki göstermeyen suşların varlığı dikkat çekmiştir. Bu bulgu, *Bt* suşlarının biyolojik etkinliklerinin alt türler arasında farklılık gösterebileceğini ve yalnızca morfolojik gözlemlere dayalı sınıflandırmaların yeterli olmayabileceğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma böcek kökenli yerli *Bt* benzeri suşların morfolojik, biyokimyasal ve biyolojik açıdan çeşitlilik sergilediğini ortaya koymuştur. Bazı izolatların *Culex pipiens* larvaları üzerinde öldürücü etki göstermesi, bu suşların potansiyel biyoinsektisit olarak değer görebileceğine işaret etmektedir. Bu bulgu, ileride yapılacak moleküler karakterizasyon ve geniş ölçekli biyolojik etkinlik testleri için temel oluşturmaktadır.

Tez çalışmasında elde edilen bulgular, sadece *Bti Δppk* suşunun yüksek δ -endotoksin üretim potansiyelini ortaya koymamış aynı zamanda bu suşun büyük hacimde üretimine yönelik kritik bilgiler sağlamıştır. Ayrıca biyoinsektisid olarak kullanılabilecek yeni suşların izole edildiği bu çalışmanın sonuçları, etkili biyopestisidlerin ya da karışımların hazırlanabilmesi için potansiyel taşımaktadır. İleride yapılacak çalışmalarla, erlen düzeyinde aerasyon hızının ve farklı karbon kaynaklarının kullanımını içeren optimizasyon süreçleriyle hem *Bti Δppk* hem de yeni izolatların üretim verimliliğinin artırılması önerilmektedir. Elde edilen verilerin fed-batch veya sürekli kültür gibi gelişmiş uygulamalarda denenmesi ile yüksek verim elde edilebilir. Ayrıca endüstriyel ölçekte üretime uygun maliyetli süreçlerin geliştirilmesi

amacıyla organik atık bazlı besiyeri formülasyonlarının test edilmesi sürdürülebilirlik kapsamında değerlendirilebilir. Yüksek üretici suşlarla, yüksek verimlikle elde edilecek ürünlerin sprey kurutma veya dondurarak kurutma (freeze-drying) yöntemleriyle hazırlanarak sivrisinek larvaları üzerindeki toksisitesi test edilebilir ve bu formülasyonların farklı koşullarda (sıcaklık, nem vb.) ve farklı ambalajlarda stabiliteleri incelenebilir.



KAYNAKLAR

- Afkhami, P., Özcengiz, G., & Alaeddinoglu, N. G., (1993). Production of the lepidoptera-specific crystal protein by a local isolate of *Bacillus thuringiensis* (B.t.81). *Biotechnology Letters*, 15(12), 1253–1258.
- Aguirre-Zapata, E., Morales, H., di Sciascio, F., & Amicarelli, A. N., (2020). Optimal growth rate control strategy for δ -endotoxins production. In *Proceedings of the 27^o Congreso Argentino de Control Automático*, Buenos Aires, Argentina.
- Al Bouq, D. A., Khyami-Horani, H., & Khleifat, K. M., (2010). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syria. *African Journal of Biotechnology*, 9(9), 1285–1292.
- Al-Obaidy, O. M., (2014). Isolation and characterization of *Bacillus* spp. with antagonistic activities for biological control. *Journal of Education Science*, 23(1), 70–73.
- Allenby, N. E. E., O'Connor, N., Prágai, Z., Ward, A. C., Wipat, A., & Harwood, C. R., (2005). Genome-wide transcriptional analysis of the phosphate starvation stimulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187(23), 8063–8080.
- Ammounneh, H., Harba, M., Idris, E., & Makee, H., (2011). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(4), 421–431.
- Angus, T. A., (1953). Studies of *Bacillus* spp. pathogenic for silkworm. *Progress Report, Forest Biology Division, Canada Department of Science Service*, 9, 6.
- Arantes, O., & Lereclus, D., (1991). Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*, 108(1), 115–119.
- Aronson, A., (2002). Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(3), 417–425.
- Aronson, A., Beckman, W., & Dunn, P., (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological Reviews*, 50(1), 1–24.
- Ash, C., Farrow, J. A., Dorsch, M., Stackebrandt, E., & Collins, M. D., (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 343–346.

Atkinson, D. J., (2010). *Stress response and inorganic poly-phosphate in the Bacillus cereus group bacteria*. University of Bath, Department of Biology and Biochemistry, England.

Awad, H. M., Abd Malek, R., Othman, N. Z., Elmarzugi, N., Leng, O. M., Ramli, S., Aziz, R., & El-Enshasy, H. A., (2015). Bioprocess development for enhanced spore production in shake flask and pilot scale bioreactors of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in submerged culture. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 10(1, Ver. II), 103–108.

Barkad, M. A., Bayraktar, A., Doruk, T., & Tunca, S., (2021). Effect of Lon protease overexpression on endotoxin production and stress resistance in *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology*, 78(9), 3483–3493.

Becker, N., (2000). Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In Charles, J. F., Delécluse, A., & Roux, C. N. L. (Eds.), *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*. Springer, Dordrecht.

Ben-Dov E., (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins*, 6(4), 1222–1243.

Benoit, T. G., Wilson, G. R., & Baugh, C. L., (1990). Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Letters in Applied Microbiology*, 10, 15–18.

Bentley, W. E., & Kompala, D. S., (1989). A novel structured kinetic modeling approach for the analysis of plasmid instability in recombinant bacterial cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(1), 49–61.

Berliner, E., (1911). Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe. *Zeitschrift für Gesamte Getreidewesen*, 3, 63.

Berliner E., (1915). Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n.sp. *Journal of Applied Entomology*, 2, 29.

Birnboim H.C., Doly J., (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*, 7(6), 1513–1523.

Boniolo F.S., Rodrigues R.C., Prata A.M.R., Lopez M.L., Jacinto T., Silveira M.M., Berbert-Molina M.A., (2012). Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ -endotoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 625–636.

Bozlağan İ., Ayvaz A., Öztürk F., Açık L., Akbulut M., Yılmaz S., (2010). Detection of the cry1 gene in *Bacillus thuringiensis* isolates from agricultural fields and their bioactivity against two stored product moth larvae. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34(2), Article 6.

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, 248–254.

Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R., (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41(2), 323–342.

Bravo A., Gill S. S., Soberón M., (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423–435.

Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S. S., Soberón M., (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 423–431.

Bulla L. A. Jr., Bechtel D. B., Kramer K. J., Shethna Y. I., (1980). Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Critical Reviews in Microbiology*, 8, 147–203.

Çetinkaya, F. T., (2002), “Isolation of *Bacillus thuringiensis* and investigation of its crystal protein genes”, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Bölümü.

Chen, M. L., & Tsen, H. Y., (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and gyrB gene-based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 912–919.

Choe, S. G., Maeng, H. R., Pak, S. J., & U, S. N., (2022). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using penicillin fermentation waste matter and application in agriculture. *Journal of Natural Pesticide Research*, 2, 100012.

Clark, T. M., Hutchinson, M. J., Huegel, K. L., Moffett, S. B., & Moffett, D. F., (2005). Additional morphological and physiological heterogeneity within the midgut of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) revealed by histology, electrophysiology, and effects of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Tissue and Cell*, 37(6), 457–468.

Crickmore, N., Bone, E. J., Williams, J. A., & Ellar, D. J., (1995). Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 131, 249–254.

Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., & Dean, D. H., (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 807–813.

Crickmore, N., Berry, C., Panneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T. R., & Bonning, B. C., (2020). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107438.

- Dadaşoğlu, F., & Dadaşoğlu, E., (2016). Isolation and identification of entomopathogenic bacteria from some species of *Curculionidae* familia harmful to leguminous forage plants. *Turkish Journal of Science*, 1(1), 20–27.
- de Barjac, H., (1990). Characterization and prospective view of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In de Barjac, H., & Sutherland, D. J. (Eds.), *Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies*. Springer, Dordrecht.
- 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.
- Deng, C., Peng, Q., Song, F., & Lereclus, D., (2014). Regulation of *cry* gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins (Basel)*, 6(7), 2194–2209.
- Donovan, W. P., Dankocsik, C. C., Gilbert, M. P., Gawron-Burke, M. C., Groat, R. G., & Carlton, B. C., (1988). Amino acid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein: An insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Journal of Biological Chemistry*, 263(1), 561–567.
- Doruk, T., (2013), “*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*’in biyoinsektisid (endotoksin) üretme kapasitesinin artırılması amacıyla fosfat metabolizmasının değiştirilmesi”, Doktora tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- Doruk, T., Avican, U., Camci, I. Y., & Gedik, S. T., (2013). Overexpression of polyphosphate kinase gene (*ppk*) increases bioinsecticide production by *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Research*, 168(4), 199–203.
- Ejiofor, A. O., & Johnson, K. A. (2002). Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against mosquito larvae in Nigeria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(3), 641–646.
- Ejiofor, A. O., & Johnson, T. (2002). Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in South Central United States. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(4), 284–290.
- El-Kersh, T. A., (2011). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11(8).
- Elsayed, E. A., Othman, N. Z., Malek, R., Awad, H. M., Wu, K., Aziz, R., Wadaan, M. A., & El Enshasy, H. A., (2014). Bioprocess development for high cell mass and endospore production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in semi-industrial scale. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(4), 2773–2783.
- Eski, A., Demir, İ., & Demirbağ, Z., (2017). A new biopesticide from a local *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Xd3) against alder leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(95).

- Eski, A., Demir, İ., Güllü, M., & Demirbağ, Z., (2018). Biodiversity and pathogenicity of bacteria associated with the gut microbiota of beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Microbial Pathogenesis*, 121, 350–358.
- Federici, B. A., Park, H.-W., Bideshi, D. K., Wirth, M. C., & Johnson, J. J., (2003). Recombinant bacteria for mosquito control. *Journal of Experimental Biology*, 206(21), 3877–3885.
- Federici, B. A., Park, H.-W., & Bideshi, D. K., (2010). Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. *Open Toxinology Journal*, 3, 83–100.
- Fillinger, U., & Lindsay, S. W., (2006). Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya. *Tropical Medicine & International Health*, 11(11), 1629–1642.
- García-Suárez, R., Verduzco-Rosas, L. A., & Ibarra, J. E., (2021). Isolation and characterization of two highly insecticidal, endophytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 97.
- Georghiou, G. P., & Wirth, M. C., (1997). Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1095–1101.
- Ghribi, D., Zouari, N., Trabelsi, H., & Jaoua, S., (2007). Improvement of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin production by overcoming carbon catabolite repression through adequate control of aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 614–622.
- Gonzalez, J. M. Jr., Brown, B. J., & Carlton, B. C., (1982). Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 79, 6951–6955.
- Green M. R., Sambrook J., (2012), “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gruft, H., (1965). Nalidixic acid as a decontaminant in Löwenstein-Jensen medium. *Journal of Bacteriology*, 90(3), 829–829.
- Gur, E., (2013). The Lon AAA+ protease. *Protein Science*, 22(6), 733–744.
- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T., & Chater, K. F., (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100, 1541–1546.
- Gustchina, A., Li, M., Andrianova, A. G., Kudzhaev, A. M., Lountos, G. T., Sekula, B., Cherry, S., Tropea, J. E., Smirnov, I. V., Wlodawer, A., & Rotanova, T. V., (2022).

Unique structural fold of LonBA protease from *Bacillus subtilis*, a member of a newly identified subfamily of Lon proteases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11425.

Hannay, C. L., (1953). Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. *Nature*, 172, 1004.

Hannay, C. L., & Fitz-James, P., (1955). The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Canadian Journal of Microbiology*, 1(5), 694–710.

Höfte, H., & Whiteley, H. R., (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53(2), 242–255.

Husz, B. (1928). *Bacillus thuringiensis* Berl., a bacterium pathogenic to corn borer larvae. *International Corn Borer Investigation Scientific Report*, 1, 191–193.

Ibarra, J. E., & Federici, B. A., (1986). Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Bacteriology*, 165, 527–533.

İçgen, Y., İçgen, B., & Özçengiz, G., (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. *Research in Microbiology*, 153(9), 599–604.

Kaur, P., Joshi N., Brar K. S. (2006)., Morphological and biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates including mannitol fermentation capabilities. *J. Biol. Control*, 20(2): 191-195.

Katı, H., Katı, A., Uğraş, S., & Yılmaz, H., (2017). *Xyleborinus saxesenii* (Coleoptera: Curculionidae)’den izole edilen bakterilerin tanımlanması. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi (The Black Sea Journal of Sciences)*, 7(1), 85–101.

Kaviyapriya, M., Lone, R., Balakrishnan, N., Rajesh, S., & Ramalakshmi, A., (2019). Cloning and characterization of insecticidal *cry/vip* genes from an indigenous *Bacillus thuringiensis* isolate T29 and evaluation of its toxicity to maize fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(3), 1314–1321.

Kilpatrick, A. M., & Randolph, S. E., (2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *The Lancet*, 380(9857), 1946–1955.

Kim, M. H., Kragl, F. J., Thompson, R. G., & Ouellette, G. D., (2011). Oxygen mass transfer coefficient (kLa') consideration for scale-up fermentation systems at the biotechnology laboratory. U.S. Army Edgewood Chemical Biological Center (ECBC-TR-846), U.S. Army Research, Development and Engineering Command.

Kirthika, P., Lloren, K. K. S., Jawalagatti, V., & Lee, J. H., (2023). Structure, substrate specificity and role of Lon protease in bacterial pathogenesis and survival. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3422.

Konz, J. O., King, J., & Cooney, C. L., (1998). Effects of oxygen on recombinant protein expression. *Biotechnology Progress*, 14, 393–409.

Kough, J., (2008). The safety of *Bacillus thuringiensis* for human consumption. *Journal of New Seeds*, 9(4), 264–278.

Kumar, L. R., Ndao, A., Valero, J., & Tyagi, R. D., (2019). Production of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide formulation using starch industry wastewater (SIW) as substrate: A techno-economic evaluation. *Bioresource Technology*, 289, 121603.

Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

Lacey, L. A., (2007). *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(2 Suppl), 133–163.

Lahkim-Tsrer, L., Pascar-Gluzman, C., Margalit, J., & Barak, Z., (1983). Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, serovar H14 in *Aedes aegypti*: Histopathological studies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41(1), 104–116.

Lancini, G., & Lorenzetti, R., (1993). Antibiotics and Bioactive Microbial Metabolites. In: *Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites*. Springer, Boston, MA.

Laurence, D., Payne, J., & Keane, T. M., (2011). The synergistic action of Cyt1Aa with Cry toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(1), 1–10.

Lee, H., Halverson, S., & Ezinwa, N., (2018). Mosquito-borne diseases. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 45(3), 393–407.

Lee, I., & Suzuki, C. K., (2008). Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease: Lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1784(5), 727–735.

Li, L., Chen, Z., & Yu, Z., (2017). Mass production, application and market development of *Bacillus thuringiensis* biopesticides in China. In *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus* (pp. 185–212).

Lidén, G., (2002). Understanding the bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24(5), 273–279.

Liu, B. L., & Tzeng, Y. M., (2000). Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(1), 11–17.

Liu, W., & Hulett, F. M., (1997). *Bacillus subtilis* PhoP binds to the phoB tandem promoter exclusively within the phosphate starvation-inducible promoter. *Journal of Bacteriology*, 179(20), 6302–6310.

- Loewen, P. C., & Switala, J., (1987). Multiple catalases in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 169(7), 3601–3607.
- Low, Y. Y., Chin, G. J. W. L., Joseph, C. G., & Rodrigues, K. F., (2023). The effect of simulated copper stress on genes associated with the metabolism of polyphosphates and polyhydroxyalkanoates in *Bacillus thuringiensis* Y1. *Malaysian Journal of Microbiology*, 19(6), Special Issue.
- Macaluso, A., & Mettus, A. M., (1991). Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* requires nonmethylated plasmid DNA. *Journal of Bacteriology*, 173(3), 1353–1356.
- MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H., & MacNeil, T., (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 111, 61–68.
- Madigan M. T., Bender K. S., Buckley D. H., et al., (2018), “Brock Biology of Microorganisms”, 15th Edition, Pearson.
- Maeda, M., Mizuki, E., Hara, M., Tanaka, R., Akao, T., Yamashita, S., & Ohba, M., (2001). Isolation of *Bacillus thuringiensis* from intertidal brackish sediments in mangroves. *Microbiological Research*, 156(2), 195–198.
- Mahdinia, E., Cekmecelioglu, D., & Demirci, A., (2019). Bioreactor scale-up. In A. Berenjian (Ed.), *Essentials in Fermentation Technology* (pp. 213–236). Springer.
- Malairuang, K., Nutarat, P., Werapan, B., Komwijit, S., Trakulnaleamsai, C., Phosrithong, N., Rungrod, A., Promdonkoy, B., & Prathumpai, W. (2022). Physical factors affecting the scale-up of vegetative insecticidal protein (Vip3A) production by *Bacillus thuringiensis* Bt294. *Biotechnology Reports*, 35, e00785.
- Mallick, S., Shinde, P. S., & Bidwai, S. P. (2023). Isolation, characterization and evaluation of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* from different locations of Marathwada region, Maharashtra. *The Pharma Innovation Journal*, 12(9S), 243–250.
- Margalit, J., & Dean, D., (1985). The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B.t.i.). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1(1), 1–7.
- Margalith, Y., & Ben-Dov, E., (2000). Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. In J. E. Rechcigl & N. A. Rechcigl (Eds.), *Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection* (pp. 243–263). Lewis Publishers, Boca Raton.
- Marston, C. K., Hoffmaster, A. R., Wilson, K. E., Bragg, S. L., Plikaytis, B., Brachman, P., Johnson, S., Kaufmann, A. F., & Popovic, T., (2005). Effects of long-term storage on plasmid stability in *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 7778–7782.

- Masri, M. M. M., & Ariff, A. B., (2020). Effect of different fermentation strategies on *Bacillus thuringiensis* cultivation and its toxicity towards the bagworm, *Metisa plana* Walker (Lepidoptera: Psychidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(2), 1–8.
- Mattes, O., (1927). Parasitare krankheiten der mehlmotenlarven und versuche über ihre verwendbarkeit als biologisches bekämpfungsmittel. *Gesellschaft Natur Marburg Schrift*, 381.
- Molina-Peñate, E., Arenòs, N., & Sánchez, A., (2023). *Bacillus thuringiensis* production through solid-state fermentation using organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) enzymatic hydrolysate. *Waste and Biomass Valorization*, 14, 1433–1445.
- Navya, R., Balasubramani, V., Raveendran, M., & Murugan, M., (2022). Characterization of indigenous *Bacillus thuringiensis* isolate RM11 toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1), 1–10.
- Nicholson W. L., Setlow P., (1990), “Sporulation, Germination and Outgrowth”. In: Harwood C. R., Cutting S. M., (Eds.), “Molecular Biological Methods for Bacillus”, Wiley, Chichester, pp. 391–450.
- Ogawa, N., Tzeng, C. M., Fraley, C. D., & Kornberg, A., (2000). Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *Journal of Bacteriology*, 182(23), 6687–6693.
- Ouattara, H. D., Samagaci, L., Ahoussi, J.-M., Ouattara, H. G., & Niamké, S., (2025). Maize flour, an alternative cryoprotectant for freeze-drying *Bacillus thuringiensis* for cocoa fermentation in Côte d’Ivoire. *International Journal of Advanced Research*, 13(2), 45–53.
- Özkan, M., Dilek, F. B., Yetiş, Ü., & Özcengiz, G., (2003). Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. *Research in Microbiology*, 154(1), 49–53.
- Paciello, L., & Parascandola, P., (2020). Determination of volumetric oxygen transfer coefficient to evaluate the maximum performance of lab fermenters. *Chemical Engineering Transactions*, 79, 73–78.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325.
- Peter G., (1984), “Plant Pests and Their Control”, Fenemore, London.
- Powers, E. M., (1968). Method for obtaining free bacterial spores of *Bacillus subtilis* var. *niger*. *Applied Microbiology*, 16(1), 180–181.
- Prabakaran, G., & Balaraman, K., (2006). Development of a cost-effective medium for the production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biocontrol Science and Technology*, 16(5–6), 505–508.

Prabakaran, G., & Hoti, S. L., (2008). Optimization of spray-drying conditions for the large-scale preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* after downstream processing. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(1), 103–107.

Rabha, M., Sharma, S., Acharjee, S., & Sarmah, B. K., (2017). Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains native to Assam soil of North East India. *3 Biotech*, 7(5), 303.

Rabinovitch L., Vivoni A. M., Machado V., Knaak N., Berlitz D. L., Polanczyk R. A., Fiuza L. M., (2017), “*Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects”. In: Fiuza L. M., et al. (Eds.), “*Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*”, Springer International Publishing AG, pp. 1–16.

Rajendran, T. P., (2021). Ethics and safety concerns. In *Microbial Approaches for Insect Pest Management* (pp. 413–428). Springer.

Rao, N. N., & Kornberg, A., (1996). Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178(5), 1394–1400.

Rao, N. N., Gómez-García, M. R., & Kornberg, A., (2009). Inorganic polyphosphate: Essential for growth and survival. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 605–647.

Rashid, M. H., & Kornberg, A., (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4885–4890.

Richardson, C. S., Upadhyay, D., Mandjiny, S., & Holmes, L., (2020). Effect of environmental factors on growth kinetics of biocontrol agent *Bacillus thuringiensis* bacterium using 2 L and 5 L A+ Sartorius Stedim Biostat® fermentation systems. *European Journal of Agriculture and Food Sciences*, 2(6), 1–6.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Santana, M. A., Moccia, C. C., & Gillis, A. E., (2008). *Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), 357–358.

Sarrafzadeh, M. H., Bigey, F., Capariccio, B., Mehrnia, M.-R., Guiraud, J. P., & Navarro, J. M., (2007). Simple indicators of plasmid loss during fermentation of *Bacillus thuringiensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1052–1058.

Sarrafzadeh, M. H., Schorr-Galindo, S., La, H. J., Oh, H. M., (2014). Aeration effects on metabolic events during sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Microbiology*, 52(7), 597–603.

Schaeffer, A. B., & Fulton, M. D., (1933). A simplified method of staining endospores. *Science*, 77(1990), 194–194.

Schnepf, H. E., & Whiteley, H. R., (1981). Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 78, 2893–2897.

Sezen, K., Muratoglu, H., Nalcacioglu, R., Mert, D., Demirbağ, Z., & Katı, H., (2010). Highly pathogenic *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* from European shot-hole borer, *Xyleborus dispar* (Coleoptera: Scolytidae). *New Zealand Journal of Forestry Science*, 40, 77–84.

Sharif, F. A., & Alaeddinoğlu, N. G., (1988). A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Industrial Microbiology*, 3(4), 227–229.

Shelton, A. M., Zhao, J. Z., & Roush, R. T., (2002). Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. *Annual Review of Entomology*, 47, 845–881.

Sheppard, A. E., Nakad, R., Saebelfeld, M., Masche, A. C., Dierking, K., & Schulenburg, H., (2016). High instability of a nematocidal Cry toxin plasmid in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133, 34–40.

Shi X., Rao N. N., Kornberg A., (2004). Inorganic Polyphosphate in *Bacillus cereus*: Motility, Biofilm Formation, and Sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101(49), 17061–17065.

Shigetane, I., (1901). On a new type of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sansi Kaiho*, 114, 1–5.

Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S. K., & Kulshrestha, S., (2022). Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. *Fermentation*, 8(11), 589.

Soberón, M., Gill, S. S., & Bravo, A., (2009). Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(8), 1337–1349.

Soccol, C. R., Pollom, T. E. V., Fendrich, R. C., Prochmann, F. A., Mohan, R., Blaskowski, M. M. M., Melo, A. L. A., Carvalho, C. J. B., & Thomaz-Soccol, V., (2009). Development of a low-cost bioprocess for endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* intended for biological control of *Aedes aegypti*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(Special Issue), 121–130.

Sonenshein, A. L., (1989). Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 561–566.

Stragier, P., & Losick, R., (1996). Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics*, 30, 297–324.

- Thao, N. K. N., Do, T. L., Dinh, T. N. M., Pham, T. H., & Nguyen, H. M. (2021). Solid fermentation of *Bacillus thuringiensis*: Method development. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 37(4), 75–81.
- Tilquin, M., Paris, M., Reynaud, S., Despres, L., Ravanel, P., Geremia, R. A., & Gury, J., (2008). Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) in mosquito natural habitats. *PLoS ONE*, 3(8), e3432.
- Uwamahoro, M. C., Massicotte, R., Hurtubise, Y., Gagné-Bourque, F., Mafu, A. A., & Yahia, L., (2018). Evaluating the sporicidal activity of disinfectants against *Clostridium difficile* and *Bacillus amyloliquefaciens* spores using improved methods based on ASTM E2197-11. *Frontiers in Public Health*, 6, 18.
- Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J. L., (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(1), 1–12.
- Vidyarthi, A. S., Desrosiers, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R., (2000). Foam control in biopesticide production from sewage sludge. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25(2), 86–92.
- Villafañá-Rojas, J., Gutiérrez, E., & de la Torre, M., (1996). Primary separation of the entomopathogenic products of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Progress*, 12(3), 309–313.
- Vouk, V., & Klas, Z., (1931). Conditions influencing the growth of the insecticidal fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sort. *International Corn Borer Investigation Scientific Report*, 4, 24–45.
- Wang, B., Kes, M. B. M. J., van den Berg van Saparoea, A. C. H., Dugar, G., Luirink, J., & Hamoen, L. W., (2024). Inactivation of the conserved protease LonA increases production of xylanase and amylase in *Bacillus subtilis*. *Research Square*, preprint.
- Ward, O. P., (2019). Proteases. In *Comprehensive Biotechnology* (3rd ed., pp. 604–615). Elsevier.
- Weill M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A., Berticat C., Pasteur N., Philips A., Fort P., Raymond M., (2003). Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 423(6936), 136–137.
- Wilson, K., (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. In F. M. Ausubel et al. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (Section 2.4, pp. 2.4.1–2.4.5). John Wiley & Sons, Inc.
- Wirth, M. C., Georgiou, G. P., & Federici, B. A., (1997). CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94, 10536–10540.

Wirth, M. C., Walton, W. E., & Federici, B. A., (2000). Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* restores toxicity of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 37, 401–407.

Wlodawer, A., Sekula, B., Gustchina, A., & Rotanova, T. V., (2022). Structure and the mode of activity of Lon proteases from diverse organisms. *Journal of Molecular Biology*, 434(7), 167504.

World Health Organization, (1999). The world health report 1999: Making a difference. World Health Organization, Geneva.

Wu, D., & Chang, F. N., (1985). Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. *FEBS Letters*, 190, 232–236.

Yeşilirmak, F., Doruk, T., Yılmaz, Ş., & Gedik, S. T., (2018). Comparative proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* wild-type and two mutant strains disturbed in polyphosphate homeostasis. *Turkish Journal of Biology*, 42(1), Article 9.

Yezza, A., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y., (2006). Bioconversion of wastewater sludge and wastewater into *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. *Bioresource Technology*, 97(18), 2124–2130.

Yik, L. Y., Chin, G. J. W. L., Joseph, C. G., & Rodrigues, K. F., (2023). The effect of simulated copper stress on genes associated with the metabolism of polyphosphates and polyhydroxyalkanoates in *Bacillus thuringiensis* Y1. *Malaysian Journal of Microbiology*, 19(6), Special Issue.

Zafar, A. U., Qadeer, M. A., & Riazuddin, S., (2003). Studies on the production of spore crystal by *Bacillus thuringiensis* CAMB 3-023 in the stirred fermentor. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 46(4), 242–245.

Zhang, H., Ishige, K., & Kornberg, A., (2002). A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99(26), 16678–16683.

Zhang, X., Zhou, X., Yang, Y., Chang, J., Qu, Q., & Niu, Y., (2024). Effects of spray drying on the content of crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* and the protection by organic and inorganic auxiliaries. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 47, 1123–1135.

Zothansanga, R., Senthilkumar, N., & Gurusubramanian, G., (2016). Diversity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from shifting cultivation (Jhum) habitat. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 133–140.

ÖZGEÇMİŞ

Eylül GÜVEN DALKÜREK, 2022 yılında İstanbul Okan Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden lisans eğitimini tamamlamıştır. Ardından Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başlamış olup, Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK danışmanlığında yüksek lisans tez çalışmalarını sürdürmektedir.



TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR

Guven Dalkurek, E., Tunca S., Yılmaz H. (2024), “Large Scale Production of Insecticide by Recombinant *Bacillus thuringiensis* Strains”, 8th GTU Graduate Research Symposium, Gebze Technical University, Kocaeli, 30–31 May. (Oral Presentation)

