

47727

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

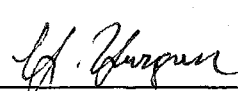
Bacillus sphaericus SUŞLARININ PAGE İLE ELDE EDİLEN HÜCRE DİŞİ
PROTEİN PROFİLLERİNE GÖRE AYIRIMI

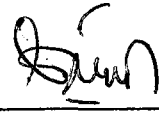
Nazime MERCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 17/10/1996 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından 85 (Seksenbeş) not takdir edilerek oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ


Prof. Dr. Şevki YAZGAN


Doç. Dr. Gülay ÖZCENGİZ

(Danışman)

YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
TEZ KURULU

***Bacillus sphaericus* SUŞLARININ PAGE İLE
ELDE EDİLEN HÜCREĞİŞİ PROTEİN
PROFİLLERİNE GÖRE AYRIMI**

Nazime MERCAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**1996
ANKARA**

**Y.Ö. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANİSTON MERKEZİ**

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Bacillus sphaericus SUŞLARININ PAGE İLE ELDE EDİLEN HÜCRE DİŞİ PROTEİN PROFİLLERİNE GÖRE AYIRIMI

Nazime MERCAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ

1996, Sayfa: 28

Jüri: Doç. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ

Prof. Dr. Şevki YAZGAN

Doç. Dr. Gülay ÖZCENGİZ

Bu çalışmada, *Bacillus sphaericus*'un 13'ü patojen ve 6'sı patojen olmayan toplam 19 suşunun gerek vejetatif ve gerekse spor evresi filtrat proteinleri Native-PAGE ve SDS-PAGE ile incelenmiş ve suşlar protein profillerine göre karşılaştırılmıştır.

Suşlar sporlanmış evrede karşılaştırıldıklarında, native-PAGE ile elde edilen filtrat protein profilleri aynı faj ve serogrupa olmalarına rağmen suşları ayırmaktadır. Diğer taraftan genel olarak, filtrat protein profillerine göre yapılan tiplendirmenin serotiplendirme ve faj tiplendirmesi ile uyumlu olduğu görülmüştür. Buna ilaveten *B. sphaericus* suşlarının ayırımında Native-PAGE analizinin daha kullanışlı olduğu anlaşılmıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: *Bacillus sphaericus*, Sivrisineklerin mikrobiyal kontrolü, Sınıflandırma, Elektroforez.

ABSTRACT

Masters Thesis

DISCRIMINATION OF *Bacillus sphaericus* STRAINS BY
EXTRACELLULAR PROTEIN PROFILES OBTAINED BY PAGE

Nazime MERCAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ

1996, Page: 28

Jury: Assoc. Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ

Prof. Dr. Şevki YAZGAN

Assoc. Prof. Dr. Gülay ÖZCENGİZ

In this study, a total of 19 strains of *Bacillus sphaericus* (13 of them pathogen, 6 of them nonpathogen) in both vegetative and sporulated stages were compared according to their filtrate protein profiles obtained by Native-PAGE and SDS-PAGE.

When the strains were compared in sporulated stage, filtrate protein profiles obtained by native-PAGE differ the strains even in each phage and serogroups. On the other hand, generally it has been seen that the typing according to filtrate protein profiles was correlated with serotyping and phage typing. In addition, it has been understood that the discrimination of *B. sphaericus* strains by Native-PAGE was more useful.

KEY WORDS: *Bacillus sphaericus*, Microbial control of mosquitoes, Classification, Electrophoresis.

TEŞEKKÜR

Bana tez konusunu veren ve yürütülmesini sağlayan danışmanım sayın Doç. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü), deneylerin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Araş. Gör. Sefa Can SAÇILIK'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) ve her türlü desteklerini eksik etmeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



2.1.3. Poliakrilamid jel elektroforez için kullanılan stok	
çözeltiler	10
2.1.3.1. Akrilamid + N,N'-metilen bis akrilamid stoğu	10
2.1.3.2. Ayırma jel tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH:8.6)	11
2.1.3.3. Yığma jel tamponu (0,5 M Tris-HCl, pH:6.8)	11
2.1.3.4. Koşturma tamponu	11
2.1.3.5. Örnek tamponu (4X)	12
2.1.3.6. Boyama çözeltisi	12
2.1.3.7. Boya çıkarıcı çözelti	12
2.1.3.8. Moleküler ağırlık standardı	13
2.2. Metodlar	13
2.2.1. Spor sayımı	13
2.2.2. Elektroforez için protein örneklerinin hazırlanması	13
2.2.3. Elektroforezin yapılışı ve değerlendirme	14
2.2.3.1. Ayırma jelin hazırlanışı	14
2.2.3.2. Yığma jelin hazırlanışı	15
2.2.3.3. Örneklerdeki protein konsantrasyonunun yarı	
kantitatif olarak tayini	15
2.2.3.4. Elektroforezin yapılışı ve boyanması	15
2.2.3.5. Molekül ağırlıklarının hesaplanması	16
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	17
KAYNAKLAR	22
ÖZGEÇMİŞ	28

SİMGELER DİZİNİ

APS	Amonyum Persülfat
FAME	Yağ asiti metil esterleri
ME	Merkaptoetanol
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforez
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	Tetra Etil Metilen Diamin



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Sporlanmış <i>B. sphaericus</i> suşlarının filtrat proteinlerinin Native-PAGE analizi	17
Şekil 3.2.	Vejetatif evredeki <i>B. sphaericus</i> suşlarının filtrat proteinlerinin Native-PAGE analizi	19
Şekil 3.3.	Sporlanmış <i>B. sphaericus</i> suşlarının filtrat proteinlerinin SDS-PAGE analizi	20
Şekil 3.4.	Vejetatif evredeki <i>B. sphaericus</i> suşlarının filtrat proteinlerinin SDS-PAGE analizi	21



ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1.1. <i>B. sphaericus</i> suşlarının serogrupları	4
Tablo 1.2. DNA homolojilerine göre <i>B. sphaericus</i> suşları	5
Tablo 1.3. <i>B. sphaericus</i> suşlarının faj grupları	6
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan <i>B. sphaericus</i> suşları	9



1. GİRİŞ

1.1. *Bacillus sphaericus*'un Sivrisineklerle Mücadelede Yeri ve Önemi

Zararlılarla mücadelede çok uzun yıllardan beri kimyasal insektisitlerin kullanıldığı bilinmektedir. Her geçen gün daha çok kullanılması gereken kimyasal insektisitler, ekosistemdeki doğal dengeyi bozduğu gibi besin zincirine dahil olarak sağlığı tehdit edici boyutlara ulaşmakta ve hatta ölümlere neden olmaktadır. Zamanla insektisitlerin zararlı etkileri anlaşılmış ve bazılarının kullanımı yasaklanmıştır. Ayrıca kimyasal insektisitlerin çevreyi sürekli kirletmesi, hedef olmayan organizmalara etki göstermesi, böceklerin bunlara zamanla direnç kazanmaları, çoğunun toprak ve suda kalıcılıkları ve birikimleri nedeniyle son yıllarda biyolojik mücadele içerisinde yer alan mikrobiyal kontrol, bazı alanlarda kimyasal mücadeleye bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır.

Sivrisinekler, başta sıtma olmak üzere bazı hastalıkları taşımaları açısından oldukça önemlidir. Yukarıda açıklanan sebepler, sivrisineklerle mücadelede günümüzde kimyasal preparatlar yerine biyoinsektisitlerin kullanımını gündeme getirmiştir. Biyoinsektisitler, sivrisineklere larva evresinde etki ederek ergin evreye ulaşmalarını engellemektedirler.

Günümüzde sivrisinek larvalarında patojen iki bakteri türü mevcuttur: *Bacillus sphaericus* ve *Bacillus thuringiensis israelensis*. Bunlardan *B.t. israelensis* toz preparatlar halinde bazı ülkelerde sivrisineklerle mücadelede kullanılmaktadır. Ülkemizde de sivrisineklerle biyolojik mücadele ile ilgili çalışmalara başlanmış olup halen devam etmektedir (Boşgelmez vd. 1983, 1984, Çakmakçı vd. 1985, Bursalıoğlu ve Öner 1986, Bağcı vd. 1991, Çetinkaya et al. 1995, Çetinkaya ve Çakmakçı 1991, 1996, Cokmus and Yousten 1991, Cokmus and Elçin 1995, Elçin et al. 1995).

Sivrisineklerle mücadelede aday olan, üzerinde birçok çalışmalar yapılan ve günümüzde pratik kullanıma hazırlanan *B. sphaericus* ise bazı özellikleriyle *B.t. israelensis*'ten farklılıklar göstermektedir. İlk kez Neide (1904) tarafından tanımlanan *B. sphaericus*, saprofit bir mikroorganizma olup, sporları toprak ve sucul ortamlarda bulunur. Bakteri zorunlu aerob, yuvarlak spor oluşturan, gelişme için karbon kaynakları olarak şekerleri kullanamayan entemopatojen bir mikroorganizmadır (Russell et al. 1989).

B. thuringiensis'in aksine *B. sphaericus* sivrisineklere karşı patojen olmayan suşlar da içerir. Patojen suşların bazıları yüksek toksisiteye sahiptirler. Bu suşlar sporlanma sırasında toksik proteinleri içeren kristaller sentezlerler (Baumann et al. 1987, 1988). Broadwell and Baumann (1986) kristal toksin sentezinin üssel gelişme devresinin sonunda başladığını ve 7 saat sonra tamamlandığını rapor etmişlerdir.

1.2. *Bacillus sphaericus* Suşlarının Ayrımı ve Klasifikasyonu

Sivrisinek larvalarında ilk patojen *B. sphaericus* suşu ölü *Culiseta invidens* larvalarından California'da izole edilmiştir (Kellen and Meyers 1964). Daha sonra Kellen K olarak adlandırılan bu bakteri suşu ilk aktif *B. sphaericus* izolatu olarak rapor edilmiştir (Kellen et al. 1965). Daha sonra 1973'de Singer tarafından SSII-1, 1977 yılında da 1593 suşunun izole edilmesiyle buna yönelik çalışmalar yoğunlaşmış ve sırasıyla 2297 (Wickremesinghe and Mendis 1980), 2362 (=290-8) (Weiser 1984) ve IAB 59 (de Barjac et al. 1988) suşları izole edilmiştir. Şu anda teşhis edilmiş ve tanımlanmış 300'ün üzerinde suş mevcuttur. Bunların yarısı sivrisineklerde patojen olup bazıları yüksek larvisidal aktiviteye sahiptir (Thiéry and de Barjac 1989). Parasporal kristal

bulunduran *B. sphaericus* suşlarının yüksek virülense sahip olduğu ve kristallerde 42 ve 51-kDa'luk toksik proteinlerinin bulunduğu bilinmektedir (Davidson and Myers 1981).

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

İlk kez *B. thuringiensis* suşlarının ayrımında başarıyla uygulanan flagellar (H) aglutinasyon metodu *B. sphaericus* suşlarının ayrımında da kullanılmış ve buna göre *B. sphaericus* suşları farklı serotiplere ayrılmıştır (de Barjac et al. 1980). Buna göre, tanımlanan 20 H-serogruptan 3 H-serogrup patojen suşlar içermektedir. Serogrup H1a'da en düşük toksisiteye sahip Kellen K ve Kellen Q suşları yer almaktadır. Orta derecede toksik olan SSII-1, 1404 ve 1930 suşları serogrup H2'de toplanmıştır. Serogrup H5'de ise yüksek toksisiteye sahip 2362, 1593, 1593-4, 1691 ve 1881 suşları yer almaktadır.

Buna benzer bir başka çalışmada da çeşitli kaynaklardan izole edilen 54 *B. sphaericus* suşu, sivrisinek larvalarına toksisiteleri temel alınarak serolojilerine göre sınıflandırılmıştır (de Barjac et al. 1985). Bir önceki çalışmada tanımlanan serogrup H5, H5a5b ve H5a5c olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. Yine serogrup H6 da H6a6b ve H6a6c olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Bunlardan H5a5b ile H6a6c'nin vektörlerden izole edilen suşlar içerdiği, H5a5c ile H6a6b'nin ise saprofitik suşlar içerdikleri rapor edilmiştir.

Bunlardan başka dört yeni serogrup daha karakterize edilmiştir. Araştırmacılar aynı çalışmada *B. sphaericus* suşlarının *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* ve *Culex pipiens* larvaları üzerine toksisitelerini de çalışmışlar ve suşların *C. pipiens*'e daha etkili olduklarını bulmuşlardır. *B. sphaericus* suşlarını toksisite-lerindeki azalışa göre H5a5b → H25 → H2 → H1a → H26a26b şeklinde sınıflandırmışlardır.

B. sphaericus suşlarının en son haliyle serogrupları Tablo 1.1'de verilmiştir (Yousten, A.A. (Virginia) ile mektupla haberleşme 1996).

Tablo 1.1. *B. sphaericus* suşlarının serogrupları.

Serogrup	Suşlar
H1a	Kellen K, Kellen Q
H2a2b	SSII-1, 1883, 1404, 1885-1896, TG65
H3	IAB 881, LP1-G, LP7-A, LP12-AS, LP14-8, LP20-E
H5a5b	1593, 2362, 1691, 1881, 2013-6, 2117-2, 2500, 2501, 2317-3, BSE18, S2, TG148, TG229, TG258, JI21, JI42, JI167
H6	IAB 59, IAB 460, IAB 467, IAB 471, IAB 477-2, IAB 611, IAB 620.1, IAB 482.1, IAB 482.2, IAB 763, IAB 769.1, IAB 769.2, IAB 774, IAB 871
H9	2314-2
H9a9c	31-2, 34-2
H25	2297, TG365, TG393
H26a26b	2315, 2173
H27	2115
H47	2118
H48ab	IAB 872

B. sphaericus suşları, DNA homolojilerine göre de sınıflandırılmıştır (Krych et al. 1980). Buna göre toplam beş homoloji grup tanımlanmıştır. Tanımlanan homoloji grup II de homoloji grup IIA ve homoloji grup IIB olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. IIA, sadece patojen suşlar içermektedir. DNA homolojisine göre *B. sphaericus*'un heterojen bir tür olduğu da anlaşılmıştır. Tablo 1.2'de DNA homoloji grupları ve bulundurdıkları suşlar görülmektedir.

Tablo 1.2. DNA homolojilerine göre *B. sphaericus* suşları.

DNA homoloji grubu	Mevcut suşlar
I	ATCC 14577, ATCC 10208, NRS 967, NCTC 9602
IIA	1593, SSII-1, 1404-924B, Kellen K, Kellen Q, 1881, 1691
IIB	ATCC 7055, ATCC 7054, ATCC 12300, NRS 718, NRS 1191, NRS 1196, ATCC 7063, NRS 1194, NRS 1200, NRS 1192, NRS 156
III	NRS 592, ATCC 12123, P1, NRS 800, NRS 1692, NRS 593, NRS 1195, NRS 1193, NRS 1197, NRS 1187, NRS 1023, NRRLB 4297, NRS 810, NRS 719, ATCC 4525, ATCC 4978, NRS 1223
IV	NRS 400, NRS 717, NRS 1529, ATCC 13805, ATCC 245, NRS 1090, NRS 1693, NRS 1307
V	NRS 1198, NRS 1199, NRS 1184
Gruplanmamış suşlar	1537-4B, NRS 1186, NRRL B1876, NRS 1089, NRS 1533, NRS 250, NRS 1611, NRRLB183, NRS 344, NRS 1188, NRS 1694, NRS 1691, NRS 349, NRS 341, NRS 1513, NRS 1514

Patojen *B. sphaericus* suşlarını birbirinden ayırmada kullanılan bir diğer metod ise bakteriyofaj tiplendirmesidir. Faj tiplendirmesinde *B. sphaericus* suşları, değişik suşlara özgü fajlarla reaksiyon verip vermemelerine göre sınıflandırılmışlardır. Tablo 1.3'de bakteriyofaj grupları ve mevcut suşlar görülmektedir (Yousten, A.A. (Virginia) ile mektupla haberleşme 1996).

Tablo 1.3. *B. sphaericus* suşlarının faj grupları.

Faj grup	Mevcut suşlar
1	Kellen K, Kellen Q
2	SSII-1, 1404, 1883, 1885-1896, TG65, JI50
3	1593, 2362, 1691, 1881, 2013-6, 2117-2, 2500, 2501, CIB Nig14, CIB Nig16, CIB Nig17, CIB Nig19, CIB Gua6, BSE 18, S2, JL60, TG148, TG229, TG258, TG177, TG263, TG111, TG395, TG197, TG174, TG140, RS1A, RS1B, RS2A, RS2B, RS10, RS13, JI21, JI42, JI68, JI167, TS-1, 1509, 8301, IAB 59, IAB 460, IAB 467, IAB 471, IAB 477-2, IAB 611, IAB 620.1, IAB 482.1, IAB 482.2, IAB 763, IAB 769.1, IAB 769.2, IAB 774, IAB 872
4	2297, TG365, TG393
6	2115
8	31, 34, LP1-G, LP7-A, LP12-AS, LP14-8, LP20-E

Bir diğer çalışmada ise Frachon et al. (1991) gaz kromatografisi tekniğiyle yağ asiti metil esterleri (FAME) ve numerik analizlerine göre *B. sphaericus* suşlarını incelemişlerdir. Buna göre *B. sphaericus* suşları, A ve B olmak üzere iki ana kümeye ayrılmaktadır. Toksik suşların tümü A kümesinde toplanmıştır. Toksik olmayan suşlar B kümesinde veya atipik *B. sphaericus* suşları içerisinde yer almaktadır. Ayrıca *B. thuringiensis*'in 6 suşunun A ve B kümesiyle yakınlık gösterdiği de bulunmuştur.

Elektroforezle de desteklenen bir çalışmada da *B. sphaericus* suşlarının gruplandırılmasında bakteriyosin aktivitelerinin de kullanılabileceği bildirilmiştir (Cokmus and Yousten 1993). Buna göre DNA homoloji gruplarındaki suşlar arasında bakteriyosin profillerinde çeşitlilik gözlenmiştir. Örneğin bu çalışmada H5a5b'ye ait suşların benzer bakteriyosin aktivitesi gösterdiği ve Poliakrilamid jeldeki bakteriyosin bandının benzer olduğu tesbit edilmiştir.

1.3. Protein Profillerinin Bakteri Sistematüğinde Kullanımı

Proteinlerin amino asit dizilişleri, serolojik özellikleri ve protein profillerinin sistematikte önemli bir yeri vardır. Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) değişik mikroorganizmaların protein profillerine göre karakterizasyonu ve sınıflandırılmasında kullanılmıştır (Bruce and Jordens 1991, Qhobela et al. 1991). Qhobela et al. (1991) tarafından yapılan bir çalışmada *Xanthomonas campestris* grubuna dahil bakteriler SDS-PAGE ile elde edilen membran protein profillerine göre karşılaştırılmışlardır. Buna göre *X. campestris* pv. *helcicola* izolatlarında görülen ortak üç protein, bunları *X. campestris* grubuna dahil diğer bakterilerden ayırmaktadır.

Lewis et al. (1987) *B. sphaericus*'un bazı patojen ve patojen olmayan suşlarının hücre duvarı ve yüzey tabaka proteinlerini yapısal, biyokimyasal ve serolojik metodlarla test etmişlerdir. Yüzey proteinlerin peptid haritaları ve serolojik analizleriyle patojen suşlar 8 ayrı grupta toplanmaktadır. Bu gruplar, flagellar antijen serotiplendirmesi ve bakteriyofaj tiplendirmesiyle elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

B. sphaericus suşları SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profillerine göre de karşılaştırılmışlardır (Cokmus and Yousten 1994). NY broth ve

NYSM brothda geliştirilen hücrelerden elde edilen vejetatif hücre ve spor protein profillerine göre suşların karakterizasyonu yapılmıştır.

1.4. Amaç

Bu çalışmada, *B. sphaericus*'un sivrisinek larvalarında değişik virulense sahip 13 adet patojen ve 6 adet patojen olmayan toplam 19 suşunun vejetatif hücre ve spor evresinde SDS-PAGE ve Native-PAGE ile elde edilen filtrat protein profillerine göre tiplendirilmeleri hedeflenmiştir.



2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyaller

2.1.1. *Bacillus sphaericus* izolatları

Araştırmada kullanılan *B. sphaericus*'un patojen ve patojen olmayan 19 suşu Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür stoklarından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan bu suşlar Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan *B. sphaericus* suşları.

Patojen suşlar	Patojen olmayan suşlar
Kellen Q, SSII-1, 1883, 1404, 2362, 1593, 1881, 2297, IAB 59, IAB 460 IAB 467, 31-2, 34-2	ATCC 14577, NCTC 9602 ATCC 7055, NRS 592 NRS 400, NRS 1198

2.1.2. Kullanılan besiyerleri

2.1.2.1. Nutrient broth + Yeast ekstrakt ortamı (NY Broth)

Nutrient Broth (Oxoid)	8.0 gr
Yeast Ekstrakt (Oxoid)	0.5 gr

Hazırlanışı: Maddeler damıtık suda süspanse edilerek eritilir. Hacim 1 lt'ye tamamlanır. Tüplere, ya da erlenmayerlere taksim edilir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

2.1.2.2. Nutrient broth + Yeast ekstrakt + Tuz ortamı (NYSM Broth)

Nutrient Broth	8.0 gr
Yeast Ekstrakt	0.5 gr
CaCl_2	7.0×10^{-4} M
MnCl_2	5.0×10^{-5} M
MgCl_2	1.0×10^{-3} M

Hazırlanışı: Maddeler damıtık suda süspanse edilir. Hacim 1 lt'ye tamamlanır, eritilir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

2.1.2.3. Nutrient agar + Yeast ekstrakt + Tuz ortamı (NYSM agar)

Nutrient Agar (Difco)	23.0 gr
Yeast Ekstrakt	0.5 gr
CaCl_2	7.0×10^{-4} M
MnCl_2	5.0×10^{-5} M
MgCl_2	1.0×10^{-3} M

Hazırlanışı: Maddeler damıtık suda süspanse edilir. Hacim 1 lt'ye tamamlanır, eritilir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

2.1.3. Poliakrilamid jel elektroforez için kullanılan stok çözeltiler

Elektroforez işlemi Laemmli (1970)'ye göre yapılmıştır.

2.1.3.1. Akrilamid + N, N' - metilen bis akrilamid stoğu

Akrilamid (Merck)	28.8 gr
Bis akrilamid (Merck)	1.2 gr

Maddeler tartılıp 75 ml distile su içerisinde çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlanır. Whatman No: 1 filtre kağıdından süzülerek renkli cam şişede +4°C'de saklanır.

2.1.3.2. Ayırma jel tamponu (1.5 M Tris-HCl, pH: 8.6)

Gerekli miktarda Trizma base tartılır, suda çözüldükten sonra 6 N HCl ile pH 8.6'ya ayarlanır ve son hacime tamamlandıktan sonra Whatman No: 1 filtre kağıdından süzülür ve +4°C'de saklanır. SDS-PAGE için % 0,4 oranında SDS ilave edilir.

2.1.3.3. Yığma jel tamponu (0,5 M Tris-HCl, pH: 6.8)

Gerekli miktarda Trizma base tartılır, suda çözüldükten sonra 6 N HCl ile pH 6.8'e ayarlanır ve son hacme tamamlandıktan sonra Whatman No: 1 filtre kağıdından süzülür ve +4°C'de saklanır. SDS-PAGE için % 0.4 oranında SDS ilave edilir.

2.1.3.4. Koşturma tamponu

Trizma-Base	1.21 gr
Glisin (Merck)	5.76 gr

Maddeler 1000 ml distile suda çözülür. SDS-PAGE için % 0,1 oranında SDS ilave edilir.

2.1.3.5. Örnek tamponu (4x)

0.5 M Tris-HCl pH = 6.8	5.12 ml
Gliserol	8.00 ml
Distile su	7.00 ml
Bromofenol blue	Çok az kristal
	20.12 ml

SDS-PAGE için örnek tamponuna 2.0 gr SDS, 4.0 ml 2- β ME ilave edilir. Distile su miktarı ise 3.0 ml'ye düşürülür. Işıktan korunarak oda sıcaklığında saklanır.

2.1.3.6. Boyama çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue	1.5 gr.
İzopropil Alkol	250.0 ml
Asetik asit	100.0 ml
Damıtık Su	650.0 ml

Boya çözüldükten sonra Whatman No: 1 filtre kağıdından süzülür ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanır.

2.1.3.7. Boya çıkarıcı çözelti

250 ml isopropilalkol, 100 ml glasiyal asetik asit ve 650 ml distile su karıştırılarak hazırlanan çözelti oda sıcaklığında renkli cam şişede saklanır.

2.1.3.8. Moleküler ağırlık standardı

Proteinlerin moleköl ağırlıklarını hesaplamak için protein standardı olarak Sigma kiti kullanıldı. Markerda bulunan proteinler ve moleköl ağırlıkları sırasıyla şöyledir:

29.000 D	Karbonik anhidraz
45.000 D	Yumurta albumini
66.000 D	Sığır serum albumini
97.400 D	Fosforilaz b
116.000 D	β -Galaktosidaz
205.000 D	Miyozin

2.2. Metodlar

2.2.1. Spor sayımı

Bakteri süspansiyonu öncelikle 80°C'de 12 dakika bekletilerek vejetatif formlar öldürüldü. Daha sonra 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} ve 10^{-10} oranında steril distile su ile seri seyreltmeler yapıldı. Her bir seyreltmeden steril petrilere 0.1 ml bakteri süspansiyonu kondu. Üzerine steril NYSM agar dökülerek bakteri süspansiyonu ile besiyerinin karışması sağlandı ve 30°C'de 24 saat inkübe edildi. 30-300 arası koloni bulunduran petri kutuları dikkate alınıp sayımlar yapılarak ml'deki spor sayısı hesaplandı.

2.2.2. Elektroforez için protein örneklerinin hazırlanması

B. sphaericus suşları NYSM agar besiyerinde (Myers and Yousten 1978) çizgi ekim yapılarak 30°C'de 2 gün inkübe edildi. Tek koloni düşürülerek saflaştırılan suşlardan stoklar hazırlandı. Tek koloniden NYSM broth ve NY brotha inoküle edilen suşlar üçer gün arayla pasaj yapılarak 30°C'de

geliştirildi. Erlenlerde çalkalamalı su banyosunda 30°C’de inkübasyona bırakıldı. Suşlar NYSM brothda sporlanıncaya kadar bekletildi. Bunun için aralıklarla faz-kontrast ışık mikroskopunda preparat hazırlanarak incelendi. NY brothda ise vejetatif formlar dikkate alındı. Daha sonra bakteri kültürleri 15.000 devir/dakika’da 3 dakika santrifüj edildi. Pelet kısmı atılıp supernatant kısmı 0.45 µm çaplı filtreden geçirildi. Filtreden geçirilerek elde edilen bu kısım vejetatif evre filtratı ve spor evresi filtratı olarak tanımlandı. Her suş, temiz ependorf tüplere alınarak -50°C’de deep-freeze’de saklandı. Daha sonra örnekler freeze-dry ile kurutuldu ve başlangıç hacmine göre 15 kat az hacimde damıtık su içerisinde tekrar çözülerek örnekler konsantre hale getirildi. Bu örneklerden 3 hacim, Native PAGE veya SDS-PAGE örnek tamponundan da 1 hacim alınarak karıştırıldı. SDS-PAGE için, bu örnekler 5 dakika kaynatılmıştır.

2.2.3. Elektroforezin yapılışı ve değerlendirme

2.2.3.1. Ayırma jelin hazırlanışı

Akrilamid/Bisakrilamid (% 30’luk).....	5.78 ml
Distile su	7.13 ml
1,5 M Tris-HCl pH = 8.6	4.33 ml
APS (Merck).....	86.70 µl
TEMED (Sigma).....	8.16 µl

Maddeler 0.75 mm aralığa sahip iki cam arasına dökülür, üst kısım doymuş bütanol ile kaplanarak hava ile teması önlenir ve polimerize olması için beklenir. SDS-PAGE için SDS’li ayırma jel tamponu kullanılır.

2.2.3.2. Yığıma jelin hazırlanışı

Akrilamid/Bisakrilamid (% 30'luk).....	0.82 ml
Distile su	2.93 ml
0,5 M Tris-HCl pH = 6.8	1.25 ml
APS (Merck)	30.00 µl
TEMED (Sigma).....	5.00 µl

Bu karışım, polimerize olan ayırma jelin üzerindeki bütanol distile su ile yıkandıktan sonra ve tarak yerleştirildikten sonra dökülür. Polimerizasyondan sonra tarak çıkarılır ve çukurluklar koşturma tamponu ile doldurulduktan sonra tanka sabitlenir. SDS-PAGE için SDS'li yığıma jel tamponu kullanılır.

2.2.3.3. Örneklerdeki protein konsantrasyonunun yarı kantitatif olarak tayini

Bunun için spot test kullanılmıştır (Esen 1978). Hazırlanan protein ekstratlarından şerit halinde kesilen Whatman No.1 kağıdına 2,5-5 µl emdirilir. Kurutulduktan sonra 10 dakika boyama solusyonunda bekletilir. Daha sonra su ile yıkanır. Boyanma derecesine göre örneklerin eşit miktarda yüklenmesi sağlanır.

2.2.3.4. Elektroforezin yapılışı ve jellerin boyanması

Proteinler Native-PAGE'de 30 mA'de 465-500 V'ta, SDS-PAGE'de ise 35 mA'de yaklaşık 400 V'ta ortalama 2-4 saat koşturulur. Elektroforez bittikten sonra jeller, Coomassie Brilliant Blue R-250 içinde 24 saat bekletilerek boyanır. Daha sonra boya çıkarıcı solüsyonda bırakılarak jellerin zemininde

bulunan boyanın çıkması sağlanır. Son olarak % 7'lik asetik asit içerisinde saklanan jeller, ışıklı beyaz bir tabla üzerine konarak karanlık bir odada fotoğrafları çekilir.

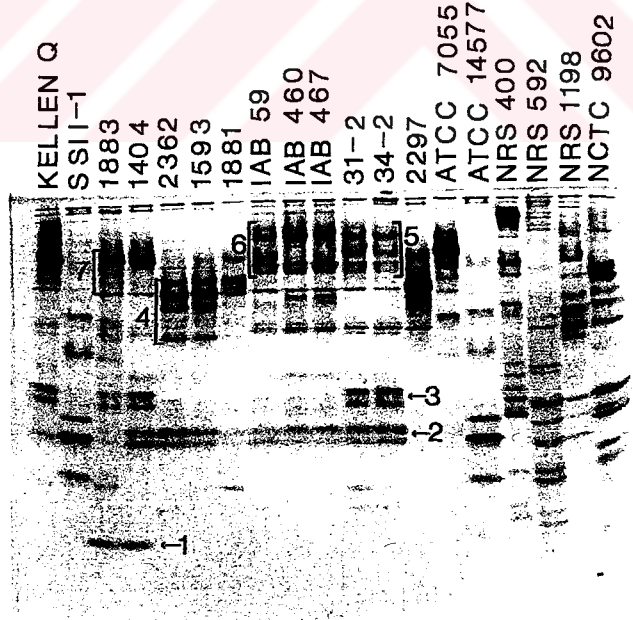
2.2.3.5. Molekl ağırlıklarının hesaplanması

Ayırma jelde proteinin koğtuğu mesafenin izleme boyasının bulunduğu mesafeye oranı bize R_f değerini verir. Molekl ağırlıklarını bildiğimiz standart proteinlerin herbirinin R_f değeri bulunur. Yarı logaritmik kağıtta R_f değeri apsise, proteinlerin molekl ağırlıkları da ordinata konarak bir doğru çizilir. Daha sonra molekl ağırlığı hesaplanacak proteinin R_f değeri bu grafiğe yerleğtirilerek proteinin molekl ağırlığı hesaplanır.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bakteri kültürleri NYSM Broth'da tamamen sporlanıncaya kadar geliştirildiklerinde süspansiyonlardaki bakteri spor konsantrasyonu $2-3 \times 10^{10}$ spor/ml olarak tayin edilmiştir. NY Broth'da ise bu süre içerisinde herhangi bir spor oluşumu görülmemiştir. Aşağıda, gerek vejetatif evrede (NY Broth'da) gerekse sporlanma evresinde (NYSM Broth'da) *B. sphaericus* suşlarının filtrat proteinlerinin Native-PAGE ve SDS-PAGE analizleri görülmektedir.

Şekil 3.1'de NYSM Broth'da tamamen sporlanmış *B. sphaericus*'un patojen ve patojen olmayan suşlarının filtrat proteinlerinin Native-PAGE protein profilleri görülmektedir. Patojen olmayan suşlar, patojen olanlarla bazı ortak protein bandlarına sahip olmalarına rağmen kendi aralarında bir ortak profil

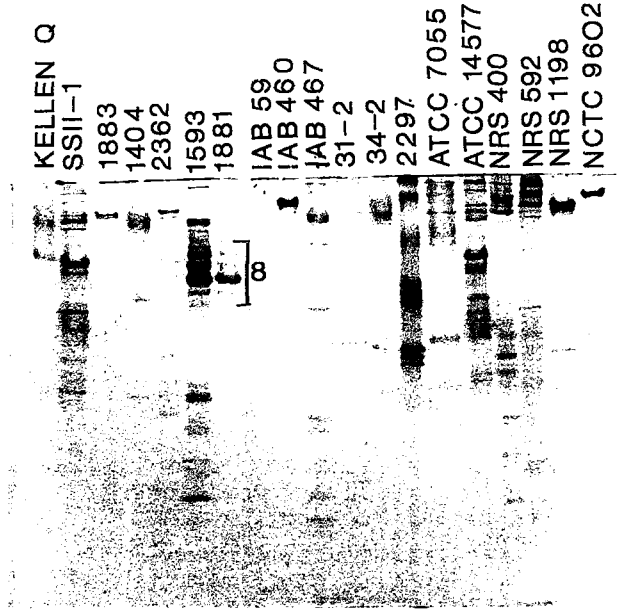


Şekil 3.1. Sporlanmış *B. sphaericus* suşlarının filtrat proteinlerinin Native-PAGE analizi.

göstermemişlerdir (Suşlar ATCC 7055, ATCC 14577, NRS 400, NRS 592, NRS 1198 ve NCTC 9602). Buna karşılık patojen suşlar arasında numaralar ile belirtilen bazı proteinler yönünden grupların ortaya çıktığı şekilden görülmektedir. Aynı serogrup ve faj grubuna dahil ve zayıf patojen olan 1883 ve 1404 suşları aynı gruba dahil SSII-1 suşundan 1 numaralı band yönünden ayrılmaktadırlar (de Barjac and Sutherland 1990). 2 numaralı protein çifti hemen hemen bütün patojen suşlarda mevcut olup patojen olmayanlardan ayırımı sağlamaktadır. Kellen Q, 1883, 1404, 31-2, 34-2 suşları 3 numaralı protein çifti yönünden benzer olup aynı gruba girmiştir. Buna karşılık bu suşlar farklı faj ve serogruplara dahildir (Yousten 1984, de Barjac et al. 1980, 1985).

Aynı serogrup ve faj grubuna dahil olan ve yüksek virülense sahip 2362, 1593 ve 1881 suşları 4 numaralı protein 4'lüsünce ortak profil göstermişlerdir (de Barjac and Sutherland 1990). Buna karşılık aynı faj grubuna dahil olan IAB 59, IAB 460 ve IAB 467 suşları 4 numaralı 4'lü protein profiline sahip olmamakla bu gruptan ayrılmış ve 6 numaralı protein 4'lüsü yönünden benzerlik göstermiştir. Farklı bir serogrup ve faj grubuna dahil olan 31-2 ve 34-2 nolu suşlar ise 5 numaralı protein 5'lisi yönünden aynı grupta toplanmışlardır. Yedi numaralı protein 4'lüsünün de zayıf virülense sahip olan ve aynı faj ve serogrupta bulunan 1883 ve 1404'ü aynı gruptaki SSII-1'den ayırdığı görülmektedir.

NY Broth'da geliştirilen vejetatif evredeki *B. sphaericus* suşları arasında protein profilleri yönünden bazı ortak bantlar olmasına rağmen ayırıcı grupların ortaya çıkmadığı Şekil 3.2'de görülmektedir. Sekiz numaralı protein 6'lısının ortaya çıkmadığı Şekil 3.2'de görülmektedir. 8 numaralı protein 6'lısının 1593

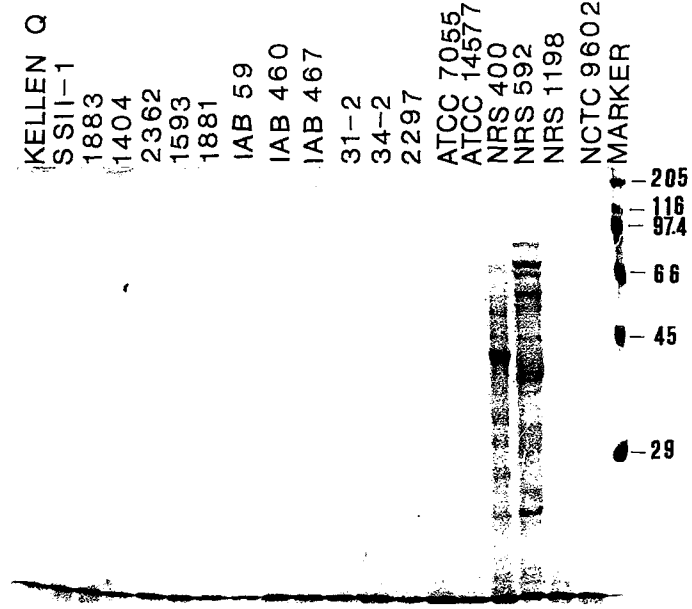


Şekil 3.2. Vejetatif evredeki *B. sphaericus* suşlarının filtrat proteinlerinin Native-PAGE analizi.

ve 1881 suşlarında mevcut olduğu halde aynı faj ve serogruba dahil 2362'den farklılık gösterdiği görülmektedir.

Şekil 3.1'in Şekil 3.2'ye göre daha fazla sayıda protein içermesi bakterinin sporulasyonuna bağlanabilir. *B. sphaericus* suşlarının ayırımında spor evresi filtrat proteinlerin Native-PAGE analizinin daha kullanışlı olduğu görülmektedir.

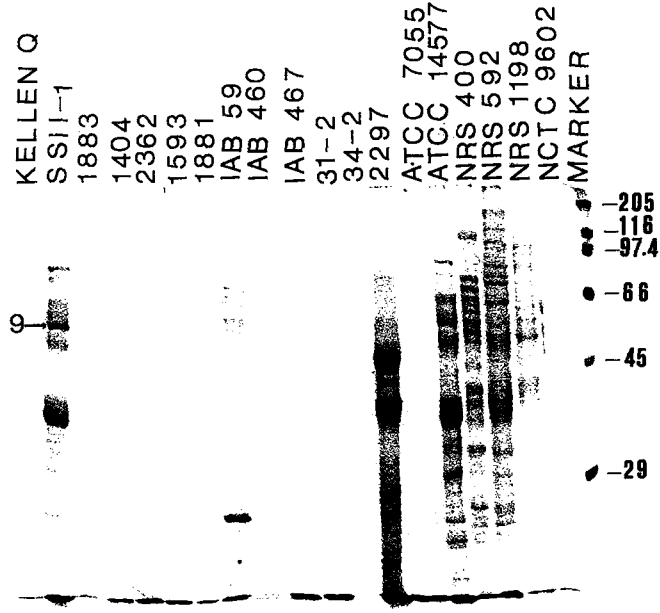
Şekil 3.3'de *B. sphaericus*'un NYSM Broth'da sporlanmış kültürlerdeki filtrat proteinlerin SDS-PAGE protein profilleri görülmektedir.



Şekil 3.3. Sporlanmış *B. sphaericus* suşlarının filtrat proteinlerinin SDS-PAGE analizi.

Şekilde de görüldüğü gibi sadece NRS 400 ve NRS 592 suşlarında protein bantları elde edilebilmiştir. Buradan suşların ayrımını yapmak mümkün olamamaktadır. Elde edilen proteinlerin yaklaşık 25. 95.- kDa arasında oldukları bulunmuştur.

Şekil 3.4'de ise *B. sphaericus*'un vejetatif hücrelerinden elde edilen filtrat protein profillerinin SDS-PAGE protein profilleri görülmektedir.



Şekil 3.4. Vejetatif evredeki *B. sphaericus* suşlarının filtrat proteinlerinin SDS-PAGE analizi.

Görüldüğü gibi sadece SSII-1, IAB 59, 2297, ATCC 14577, NRS 400, NRS 592 ve NRS 1198 suşlarında protein bandları elde edilebilmiştir. Bunlar suşların ayırımı için yeterli olmamakla birlikte 9 ile işaretlenen ve molekül ağırlığı 64.- kDa civarında olan proteinin SSII-1, ATCC 14577 ve NRS 400 suşlarında ortak olduğu görülmektedir.

Sonuçlardan da anlaşılacağına göre, *B. sphaericus* suşlarının birbirlerinden ayırımında tamamen sporlanmış kültürlerdeki filtrat proteinlerin vejetatif evreye göre daha kullanışlı olduğu ve Native-PAGE'in kullanılabileceği buna karşılık SDS-PAGE'in kullanılamayacağı görülmüştür.

KAYNAKLAR

- BAĞCI, H., SHAREEF, S.R. ve ÖZDAMAR, K. 1991.** *Bacillus thuringiensis* varyetelerinin sınıflandırılmasında sayısal taksonominin uygulanması. TÜBİTAK. Doğa-Tr. J. of Biology., 5: 70-81.
- BAUMANN, P., BAUMANN, L., BOWDITCH, R.D. and BROADWELL, A.H. 1987.** Cloning of the gene for the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* 2362: Evidence for a family of related sequences. J. Bacteriol, Vol. 169, No. 9, p. 4061-4067.
- BAUMANN, L., BROADWELL, A.H. and BAUMANN, P. 1988.** Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4 and 41.9 Kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. J. Bacteriol. Vol. 170, No. 5, p. 2045-2050.
- BOŞGELMEZ, A., ÇAKMAKÇI, L., GÜRKAN, B., GÜRKAN, F. ve ÇETİNKAYA, G. 1983.** Büyük mum güvesi, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera : Galleriidae) üzerine *Bacillus thuringiensis*'in etkisi. Mikrobiyoloji Bülteni, 17(4): 233-242.
- BOŞGELMEZ, A., ÇAKMAKÇI, L., GÜRKAN, B., GÜRKAN, F. ve ÇETİNKAYA, G. 1984.** *Amorphogynia necessaria* Zell, (Lepidoptera : Geometridae) üzerine *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*'in etkisi. TÜBİTAK Ulusal Çevre Simpozyumu, 12-16 Kasım 1984, Adana.
- BROADWEL, A.H. and BAUMANN, P. 1986.** Sporulation-Associated activation of *Bacillus sphaericus* larvicide. Appl. Environ. Microbiol. 52: 758-764.

- BRUCE, K.D. and JORDENS, J.Z. 1991.** Characterization of noncapsulate *Haemophilus influenzae* by whole-cell polypeptide profiles, restriction endonuclease analysis, and rRNA gene restriction patterns. J. Clin. Microbiol. Vol. 29, No. 2, p. 291-296.
- BURSALIOĞLU, M.H. ve ÖNER, M. 1986.** *Bacillus thuringiensis* taksonomisi üzerine bir çalışma. Doğa TU Bio. D. 10, 3, 269-285.
- ÇAKMAKÇI, L., BOŞGELMEZ, A., SOYLU, O.Z., BULUT, H. ve GÜRKAN, B. 1985.** *Bacillus thuringiensis*'in üretim olanakları ve tarımda önemli zararlara neden olan bazı Lepidopter türlerine karşı etkinliklerinin saptanması üzerine araştırmalar. TÜBİTAK Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu, Tarımsal Mikrobiyoloji Ünitesi, Proje No: TARMİK 3.
- ÇETİNKAYA, G. ve ÇAKMAKÇI, L. 1991.** *Bacillus thuringiensis* suşlarında protoplast oluşumu ve rejenerasyonu. TÜBİTAK. Doğa Tr. J. of Biology. 15: 210-221.
- ÇETİNKAYA, G., ÖZTÜRK, A. and ÇAKMAKÇI, L. 1995.** The persistence time of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals on the leaf surfaces. Acta Microbiologica Polonica. Vol. 44, No. 1, 91-97.
- ÇETİNKAYA, G. ve ÇAKMAKÇI, L. 1996.** Toprak ve ölü larvalardan izole edilen *Bacillus thuringiensis* izolatlarının patojenitesinin araştırılması. TÜBİTAK. Tr. J. Agriculture and Forestry., 20: 63-65.
- COKMUS C. and YOUSTEN, A.A. 1991.** Two new mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* from Turkey. J. Invertebr. Pathol. 57, 439-440.

- COKMUS, C. and YOUSTEN, A.A. 1993.** Bacteriocin production by *Bacillus sphaericus*. J. Invertebr. Pathol. 61, 323-325.
- COKMUS, C. and YOUSTEN, A.A. 1994.** Characterization of *Bacillus sphaericus* strains by SDS-PAGE. J. Invertebr. Pathol. 64, 267-268.
- COKMUS, C. and ELÇİN, Y.M. 1995.** Stability and controlled release properties of carboxymethylcellulose encapsulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Pestic. Sci. 45: 351-355.
- DAVIDSON, E.W. and MYERS, P. 1981.** Parasporal inclusions in *Bacillus sphaericus*. FEMS Microbiology Letters, 10, 261-265.
- de BARJAC, H., VERON, M., and COSMAO-DUMANOIR, V. 1980.** Caracterisation biochimique et serologique de souches de *Bacillus sphaericus* pathogenes ou non four les moustiques. Ann. Microbiol (Inst. Pasteur). 131 B: 191-201.
- de BARJAC, H., LARGET-THIÈRY, I., COSMAO-DUMANOIR, V. and RIPOUTEAU, H. 1985.** Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains on the basis of toxicity to mosquito larvae. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 85-90.
- de BARJAC, H., THIÈRY, I., COSMAO-DUMANOIR, V., FRACHON, E., LAURENT, P., CHARLES, J.F., HAMON, S. and OFORI, J. 1988.** Another *Bacillus sphaericus* serotype harbouring strains very toxic to mosquito larvae: serotype H6. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 139: 363-377.

- de BARJAC, H. and SUTHERLAND, D.J. 1990.** "Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies." Rutgers University Press, New Brunswick.
- ELCIN, Y.M., COKMUS, C. and SACILIK, S.C. 1995.** Aluminum Carboxymethylcellulose Encapsulation of *Bacillus sphaericus* 2362 for Control of *Culex* spp. (Diptera : Culicidae) larvae. J. Econ. Entomol. 88(4): 830-834.
- ESEN, A. 1978.** A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of Protein. Anal. Biochem. 89, 264-273.
- FRACHON, E., SYLVIANE, H., NICOLAS, L. and de BARJAC, H. 1991.** Cellular fatty acid analysis as a potential tool for predicting mosquitocidal activity of *Bacillus sphaericus* strains. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 57, No: 11, 3394-3398.
- KELLEN, W.R. and MEYERS, C.M. 1964.** *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. Proc. Calif. Mosq. Control Assoc. 32-37.
- KELLEN, W.R., CLARCK, T.B., LINDEGREN, J.E., HO, B.C., ROGOFF, M.H. and SINGER, S. 1965.** *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 7: 442-448.
- KRYCH, V.K., JOHNSON, J.L. and YOUSTEN, A.A. 1980.** Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 476-484.

- LAEMMLI, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680-685.
- LEWIS, L.O., YOUSTEN, A.A. and MURRAY, R.G.E. 1987.** Characterization of the surface protein layers of the mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *J. Bacteriol.* Vol. 169, No. 1, p. 72-79.
- MYERS, P. and YOUSTEN, A.A. 1978.** Toxic activity of *Bacillus sphaericus* SSII-1 for mosquito larvae. *Infect. Immun.* 19: 1047-1053.
- NEIDE, E. 1904.** Botanische beschreibung einiger sporenbildenden bacterien. *Zentralbl. Bacteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 12:* 1-32.
- QHOBELA, M., LEACH, J.E., CLAFLIN, L.E. and PEARSON, D.L. 1991.** Characterization of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *helvicola* by PAGE of membrane proteins and by REA and RFLP analysis of genomic DNA. *Plant Disease*, Vol. 75, No: 1, pp. 32-36.
- RUSSELL, B.L., SCOTT, A.J. and YOUSTEN, A.A. 1989.** Carbohydrate metabolism in the mosquito pathogen *Bacillus sphaericus* 2362. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 55, No. 2, 55(2): 294-297.
- SINGER, S. 1973.** Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. *Nature* 244: 110-111.
- SINGER, S. 1977.** Isolation and development of bacterial pathogens of vectors. In *Biological regulation of vectors*, 3-18. DHEW Publication no. (NIH) 77-1180.

- THIÈRY, I. and de BARJAC, H. 1989.** Selection of the most potent *Bacillus sphaericus* strains based on activity ratios determined on three mosquito species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 577-581.
- WEISER, J. 1984.** A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from Northern Nigeria. *Zbl. Microbiol.* 139: 57-60.
- WICKREMESINGHE, R.S.B. and MENDIS, C.L. 1980.** *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. *Mosq. News.* 40: 387-389.
- YOUSTEN, A.A. 1984.** *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Adv. Biotechnol. Processes.* 3: 315-343.

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Çine’de doğdu. İlk öğrenimini İzmir, orta öğrenimini Mardin, lise öğrenimini Ankara’da tamamladı. 1988 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 1992 yılında A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisansa başladı.

1994 yılından beri Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi’nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

