

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOĞAL *Bacillus thuringiensis* SUŞLARININ BAKTERİYOSİN
BENZERİ PEPTİD ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SARAH BASIM JAWAD AL-BAGHDADI

EYLÜL 2022

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOĞAL *Bacillus thuringiensis* SUŞLARININ BAKTERİYOSİN
BENZERİ PEPTİD ÜRETİM
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SARAH BASIM JAWAD AL-BAGHDADI

EYLÜL 2022

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

SARAH BASIM JAWAD AL BAGHDADI tarafından hazırlanan **DOĞAL *Bacillus thuringiensis* SUŞLARININ BAKTERİYOSİN BENZERİ PEPTİD ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI** başlıklı tezinin, 22/09/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ (Jüri Başkanı)

İmza:

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Nurdan SARAÇ (Üye)

İmza:

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Nur CEYHAN GÜVENSEN (Üye)

İmza:

Gıda Teknolojisi Programı Ana Bilim Dalı,
Tire Kutsan Meslek Yüksekokulu Ege Üniversitesi, İzmir

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Hasan Koç

İmza:

Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Hatice Güneş

İmza:

Danışman, biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Savunma Tarihi: 22/09/2022

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, döküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca akademik ve bilimsel etik kuralları gergi bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Sarah Basım Jawad Albaghdadi



ÖZET
DOĞAL *Bacillus thuringiensis* SUŞLARININ BAKTERİYOSİN
BENZERİ PEPTİD ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Sarah Basım Jawad Al-bağdadi

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hatice Güneş

Eylül 2022, 85 sayfa

Bacillus thuringiensis (Bt) gram pozitif bir bakteridir ve Cry, Cyt ve Vip proteinleri gibi metabolit üretimi için model bir organizma olduğu düşünülmektedir. Buna ilaveten, Bt'nin antimikrobiyal proteinler de sentezlediği bilinmektedir. Bt'nin biyopestisit ile ilgili proteinleri hakkında çok fazla bilgi olmasına rağmen, Bt bakteriyosinleri hakkında çalışmalar kısmen sınırlıdır. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, Bt koleksiyonumuzda bulunan ve zeytin alanlarından toplanıp karakterize edilen yaklaşık 100 adet Bt suşunun bakteriyosin üretme potansiyelleri araştırılmıştır. Bunun için Bt suşları tekrar canlandırılıp, *agar spot assay* ile indikatör bakteri *B.cereus* 11778 (ATCC)'e karşı bakteriyosin aktiviteleri taranmıştır. Antimikrobiyal aktivite gösteren suşlardan elde edilen süpernatantların (CFS) antimikrobiyal etkisi *kuyu difüzyon assay* ile teyit edilmiş ve sadece 9 tanesinin *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır. Bunlar arasında en yüksek inhibisyon zonu gösteren 28Q1 suşu diğer analizlerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu suşun büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiği araştırıldığında, büyüme eğrisinin logaritmik fazının başlarında primer metabolit olarak bakteriyosin benzeri peptid (BBP) sentezlendiği, maksimum antimikrobiyal aktivitenin (180 AU/ml) ilk 8 saatte gözlemlendiği ve 30 saatte aktivitenin tamamen kaybolduğu tespit

edilmiştir. CFS çeşitli enzimlerle muamele edildiğinde, Proteinaz K (PK) ve lipazda aktivitenin tamamen kaybolması BBP'nin bir çeşit lipoprotein olduğunu göstermektedir. İlk 30 dakikada CFS'nin antimikrobiyal aktivitesi 30°C ve 40°C'de maksimumken, 50°C'de yarıya inmekte ve 60°C'de tamamen yok olmaktadır. Ayrıca, CFS'nin pH aralığının geniş olduğu (pH4-pH10) bulunmuştur. Bt 28Q1 suşu farklı besi ortamlarında büyütüldüğünde, *B. cereus*'a karşı en yüksek anti mikrobiyal aktivite triptik soy broth'da (TSB) gözlenmiştir. İlâveten, çeşitli organik çözücülerin antimikrobiyal aktiviteyi etkilemediği fakat Triton x-100'in aktiviteyi arttırdığı kaydedilmiştir. Amonyum sülfat (%80) ile çöktürülen ve diyaliz edilen BBP preparasyonun (BBPP) ve CFS'nin antimikrobiyal etki spektrumu çeşitli bakteriler üzerinde incelendiğinde, sadece *B. cereus* dahil incelenen tüm *Bacillus* türleri üzerinde etkili olduğu; buna karşın, diğer Gram+ ve Gram- bakteriler ve *Candida albicans* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca, kısmi olarak saflaştırılan ve antimikrobiyal aktivite gösteren proteinin moleküler ağırlığının SDS-PAGE ve *jel overlay assay* yöntemiyle yaklaşık 12 kDa olduğu bulunmuştur. İlâveten, Bt 28Q1 suşunun 16SrDNA ve flagellin *hag* geni PCR analizlerine göre *Bacillus thuringiensis subsp. tochiensis* olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, *B. thuringiensis* 28Q1 suşundan elde edilen ve geniş pH aralığı ve belirli sıcaklık toleransına sahip olan bakteriyosin benzeri protein (BBPP) besin paketlenmesinde, *B. cereus* gibi besinlerde toksin üreten ve ishale yol açan bakterilerin büyümesini engellemek için koruyucu veya biyoaktif molekül olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Gelecekte yapılacak protein sekans analizleri ve proteomik çalışmalar BBPP'nin detaylı karakterizasyonuna önemli katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, bakteriyosin, antimikrobiyal aktivite, kısmi saflaştırma, SDS-PAGE, Jel Overlay

ABSTRACT
INVESTIGATION OF BACTERIOCIN-LIKE PEPTIDE
PRODUCTION POTENTIALS OF NATURAL *Bacillus*
***thuringiensis* STRAINS**

Master of Science (M. Sc)

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice Güneş

September 2022, 85 pages

Gram-positive *Bacillus thuringiensis* (Bt) is regarded as a model organism for the production of metabolites like Cry, Cyt, and VIP proteins. Bt is also known to produce antibacterial proteins. The investigations on Bt bacteriocins are somewhat constrained, despite the fact that the biopesticide-related proteins of Bt are well understood. Therefore, in this thesis, the bacteriocin production potentials of approximately 100 Bt strains in our Bt collection, which were collected and characterized from olive fields, were investigated. For this, Bt strains were revived and their bacteriocin activities were screened against the indicator bacterium *B.cereus* 11778 (ATCC) with agar spot assay. The antimicrobial effect of supernatants (CFS) obtained from strains with antimicrobial activity was confirmed by the well diffusion assay and it was determined that only 9 of them showed antimicrobial activity against *B. cereus*. Among these, the 28Q1 strain showing the highest inhibition zone was selected for use in other analyses. When the growth curve and bacteriocin production kinetics of this strain were investigated, it was found that bacteriocin-like peptide (BLP) was synthesized as the primary metabolite at the beginning of the logarithmic phase of the growth curve, the maximum antimicrobial activity (180 AU/ml) was observed in the first 8 hours and the activity was completely lost in 30 hours. When CFS is treated with various enzymes, complete loss of activity in Proteinase K (PK) and lipase indicates that BLP is a type

of lipoprotein. In the first 30 minutes, the antimicrobial activity of CFS is maximum at 30 °C and 40 °C, halved at 50 °C and completely destroyed at 60°C. Also, the pH range of CFS was found to be wide (pH4-pH10). When the Bt 28Q1 strain was grown on different media, the highest antimicrobial activity against *B. cereus* was observed in tryptic line broth (TSB). In addition, it was noted that various organic solvents did not affect the antimicrobial activity, but Triton x-100 increased the activity. When the antimicrobial effect spectrum of BLP and CFS precipitated with ammonium sulfate (80%) and dialyzed was examined on various bacteria, it was found that they were effective only on all *Bacillus* species, including *B. cereus* ; however, it was found that it did not show antimicrobial activity on other Gram+ and Gram- bacteria and *Candida albicans*. In addition, the molecular weight of the partially purified protein showing antimicrobial activity was found to be approximately 12 kDa by SDS-PAGE and gel overlay assay method. In addition, according to PCR analysis of 16SrDNA and flagellin hag gene of Bt 28Q1 strain *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* has been shown to be. As a result, bacteriocin-like protein (BLP) obtained from *B. thuringiensis* 28Q1 strain, which has a wide pH range and certain temperature tolerance, can be used as a preservative or bioactive molecule in food packaging to prevent the growth of bacteria that produce toxins and cause diarrhea in foods such as *B. cereus*. has potential. Future protein sequence analyzes and proteomic studies will contribute significantly to the detailed characterization of BLP.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, bacteriocin, antimicrobial activity, partial purification, SDS-PAGE, Gel Overlay

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve her daim destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Hatice Güneş'e sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca yardımını hiç esirgemeyen değerli hocam Arş. Gör. Dr. Burcu Şahin'e teşekkürü bir borç bilirim. Tüm yardımları ve desteğiyle yanımda olan değerli arkadaşlarım Siham Naser ve yardımlarını esirgemeyen Serengül Kartal'a içten teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında olduğu gibi tez çalışmam boyunca da yanımda olan, anlayış gösteren ve varlıklarıyla bana her zaman güç veren canım anneme, babama ve sevgili kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLO DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Bakteriyosinin İsimlendirilmesi Ve Tarihçesi.....	5
1.2. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması	6
1.3. Bakteriyosin Biyosentezi.....	9
1.4. Bakteriosin Mekanizması	10
1.5. Bakteriyosin Direnci	13
1.6. Öz-Bağışıklık	14
1.7. Bakterilerden üretilen güçlü antimikrobiyal peptidler (bakteriosinler).....	15
1.8. <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
1.9. <i>Bacillus thuringiensis</i> bakteriyosini	16
1.10. <i>Bacillus</i> cinsinden elde edilen Bakteriyosin- Benzeri Peptidler (BLIS)	17
1.11. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'ten çeşitli bakteriyosin benzeri peptitlerin eldesi ve karakterize edilmesi.....	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
2.1. Materyal	23
2.1.1. Antibakteriyal Aktivitede Kullanılan İndikatör Suşlar	23
2.1.2. Besiyerleri.....	24
2.1.3. Tampon Çözeltiler	26
2.1.4. Kullanılan Cihazlar	27
2.1.5. Kullanılan Besiyeri Ve Kimyasallar	28
2.2. Yöntem	28
2.2.1. Bt Örneklerinin Hazırlanması.....	28
2.2.2. Agar <i>Spot Assay</i>	28
2.2.3. Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi.....	29
2.2.4. Bakteriyosin Benzeri Maddenin Üretim Kinetiklerinin İncelenmesi	30
2.2.5. Bakteriosin Benzeri Maddenin Karakterizasyonu	30
2.2.6. Bt 28Q1 Suşunun 16S rDNA Ve <i>hag</i> Geniyle PCR Analizi	33

2.2.7. 16S rDNA ve <i>hag</i> Geni Analizi	33
2.2.8. Bakteriyosin Benzeri Maddenin Kısmi Pürifikasyonu	34
2.2.9. Bradford Assay	34
2.2.10. Saflaştırılmış Protein Aktivitesinin Antimikrobiyal Spektrumu.....	35
2.2.11. Ultrafiltasyon	36
2.2.12. SDS-PAGE ve Jel Overlay Assay.....	36
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	37
3.1. Antimikrobiyal Aktivitenin <i>Agar Spot Assay</i> Yöntemiyle Belirlenmesi	37
3.2. Antimikrobiyal Aktivitesinin <i>Agar Kuyu Difüzyon</i> Yöntemiyle Belirlenmesi	40
3.3. 28Q1 suşunun mikroskobik karakterizasyonu	42
3.4. Büyüme Eğrisi Ve Bakteriyosin Üretim Kinetiğinin Belirlenmesi.....	43
3.5. Bakteriyosin Aktivitesinin Karakterizasyonu.....	44
3.5.1. Bakteriyosin aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisi	44
3.5.2. Bakteriyosin aktivitesi üzerinde pH'nin etkisi	46
3.5.3. Bakteriyosin aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi.....	47
3.5.4. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Farklı Besiyerlerinin Etkisi	49
3.5.5. Bakteriyosin Aktiviteleri Üzerine Enzimlerin Etkisi	51
3.6. 28Q1 suşunun 16s rDNA PCR ile analizi	52
3.7. 28Q1 <i>hag</i> gen PCR ile analizi	52
3.8. 28Q1 16S rDNA analizi	53
3.9. 28Q1 <i>hag</i> geni ile analizi	57
3.10. Bakteriyosinin amonyum sülfat ile kısmi pürfikasyon	58
3.11. SDS-PAGE ve bakteriyosin aktivitesi.....	59
3.12. 28Q1 Antibakteriyal Etki Spektrumları:	61
4. TARTIŞMA.....	63
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
KAYNAKÇA	76
ÖZGEÇMİŞ.....	85

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. indikatör bakteriler	23
Tablo 3.1. Tekrar canlandırılmış Bt suşları	37
Tablo 3.2. Agar spot assay testi ile Bt pozitif suşlar.....	39
Tablo 3.3. well diffusion assay ile Bt posetif suşları.	41
Tablo 3.4. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi.	45
Tablo 3.5. Bakteriyosin aktivitelerine enzimlerin etkisi.....	51
Tablo 3.6. 28Q1 suşuna ait 16s rDNA konsensus ve BLAST karşılaştırma sonucu. 53	
Tablo 3.7. 28Q1 suşuna ait <i>hage geni</i> forword BLAST karşılaştırma sonucu.	57
Tablo 3.8.Bt 28Q1 suşunun antimikrobiyal etki spektrumu.	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Yapısal gen pre-probakteriyosini kodlar, (i) bağışıklık geni küçük proteinleri kodlar, (ii) proteinleri işlemek için kodlayan genler, (iii) pre-probakteriyosinin taşınması ve salgılanması, (iv) post-probakteriyosin için enzimleri kodlayan genler. Translasyon modifikasyonları ve (vi) sentezin düzenlenmesinde yer alan bileşenleri kodlayan genler (B. R. Sharma, Halami, and Tamang 2022).....	10
Şekil 1.2. Nisin ve laktokoksin A'nın (A) etki mekanizmaları, lipid II'yi hedefleyerek, nisin peptidoglikan biyosentezini inhibe edebilir ve bakteri zarında gözenek oluşturur. (B) laktokoksin A, reseptör olarak mannoz fosfotransferaz sistemini (Man-PTS) kullanır bu reseptörün kontrolsüz açılmasına ve böylece bakteri zarında bir gözenek oluşturmaya sebep olur. Simon vd., 2020'den alınmıştır.....	11
Şekil 2.1. Protein konsantrasyonu testinin Bradford standart eğrisi.	35
Şekil 3.1. Agar spot assay ile bazı suşlara ait inhibisyon zonları.	40
Şekil 3.2. Agar kuyu difüzyon testinde bazı suşlara ait inhibisyon zonları.	42
Şekil 3.3. 28Q1 suşu, spor ve kristal oluşumu.	42
Şekil 3.4. 28Q1 büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretimi kinetikleri.	43
Şekil 3.5. Değişik zamanlarda bakteriyosin aktivitesinin petrideki görünümü.	44
Şekil 3.6. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin petrideki görünümü... ..	45
Şekil 3.7. Bt 28Q1 elde edilen bakteriyosin aktivitesi üzerinde pH etkisi.....	46
Şekil 3.8. Bakteriyosin benzeri maddenin farklı pH'lerde <i>B. cereus</i> 'a karşı antimikrobiyal aktivitesinin görünümü. A: pH 3 ve 4; B: pH 5 ve 6 ; C: pH 7 ve 8; D: pH 9 ve 10.....	47
Şekil 3.9. Bt 28Q1 elde edilen bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.	48
Şekil 3.10. Organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin petrideki görünümü.....	49
Şekil 3.11. Bakteriosin aktivitesi üzerine Triton x-100 etkisi ve kontrol görüntüsü; A:Triton x-100 + 28Q1 süpernetanti, B: Negatif kontrol (Triton x-100+ dH ₂ O).....	49
Şekil 3.12. Farklı besiyerlerinde yetiştirilen 28Q1'in antimikrobiyal aktivitesi.....	50

Şekil 3.13. Farklı besiyerlerinde bakteriyosin üretiminin petrideki görünümü	50
Şekil 3.14. Enzimlerin bakteriyosinin aktivitesi üzerindeki etkilerinin petrideki görünümü.....	51
Şekil 3.15. 16s rDNA PCR ürünün agaroz jel’de görüntüsü.	52
Şekil 3.16. 28Q1 <i>hag</i> geni ile yapılan PCR ’in agaroz jel görüntüsü.....	53
Şekil 3.17. 16S rDNA’nın Blast analizi sonucu.....	56
Şekil 3.18. <i>hag</i> gen Blast analizi.	58
Şekil 3.19. Kısmi olarak saflaştırılan BBPP’nun antimikrobiyal aktivitesi.....	59
Şekil 3.20. Ultrafiltrasyon yapılan BBPP’nun <i>B. cereus</i> ’a karşı antimikrobiyal aktivitesi. 1:alt kısım (filtrat); 2: üst kısım (konsantrat); 3: Ultrafiltrasyon uygulanmayan BBPP.....	59
Şekil 3.21. 28Q1’den elde edilen bakteriyosin benzeri protein örneğinin (BBPP) %15 SDS-PAGE analizi. Kuyucuklar sırasıyla: 1: MW marker; 2: %80 AS ile çöktürülmüş ve yoğunlaştırılmamış protein örneği; 3: %80 AS ile çöktürülmüş ve ultrafiltrasyonla yoğunlaştırılmış protein örneği.	60
Şekil 3.22. Yaklaşık 12 kDa’luk proteinin antimikrobiyal aktivite gösteren bant ile örtüşmesi.	61

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AU	Arbitrary ünitesi
bç	Baz çifti
g	Yerçekimi ivmesi
gr	gram
kDa	Kilodalton
Kb	kilobaz
mM	Milimolar
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
APS	Amonyum persülfat
AS	Amonyum sülfat
BSA	Bovin serum albümin
BBPP	Bakteriyosin benzeri protein preparasyonu
BGPB	Bakteriosin gram pozitif bakteri
BGNB	Bakteriosin gram negatif bakteri
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CFS	Hüresiz kültür süpernatantı
Cry	Kristal protein
Cyt	Sitolitik
DNA	Deoksiribonüklük Asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektrofez
TAE	Tris Borate EDTA
TEMED	Tetra metilindiamin
Vip	Vejetatif insektisidal protein

1. GİRİŞ

Dünya çapında en yaygın ikinci ölüm nedeni bulaşıcı hastalıklardır; bu yüzden mikrobiyal patojenlerle mücadele için yeni ilaçların keşfedilmesi oldukça önemlidir. Antibiyotik pazarı hakkında yakın zamanda yapılan bir araştırma 2009 yılında dünya çapında son 5 yılda yıllık ortalama %4'lük bir büyüme ile 42 milyar doları değerinde antibiyotik satışı olduğunu bildirmiştir (Sumi et al. 2015). Bu yoğun antibiyotik kullanımından dolayı, birçok patojenik bakteri hemen hemen tüm mevcut antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç kazanmıştır. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyanın antibiotik çağı öncesine geri döndüğü konusunda uyarmıştır (Parisien et al. 2008). Antibakteriyel ilaçlar devreye girdiği zaman, bakteriler çeşitli direnç biçimleri göstererek ilaçlara yanıt vermekte, antimikrobiyal kullanımı arttıkça, bakteriyel patojenlerin sergilediği direnç mekanizmalarının düzeyi ve karmaşıklığı da artmaktadır (Tenover 2006). Buna ilave olarak, ana maddeye dirençli suşlar, yeni sentetik türevlere karşı hızla ek direnç kazanmaktadır. Antimikrobiyal dirençteki bu artışla mücadele etmek için yeni antibakteriyel alternatiflerin geliştirilmesi en belirgin yaklaşımdır (Coates et al. 2002). Bu yaklaşımlar arasında, mikrobiyal dirençle mücadelede geleneksel antibiyotiklere karşı yeni nesil antibiyotikler için umut verici bir alternatif olabilecek antimikrobiyal peptitler (AMP'ler) bulunmaktadır (Rotem and Mor 2009; Sumi et al. 2015).

AMP'ler insan antimikrobiyal savunma sisteminin doğal bir parçası olduğundan, bunlara karşı patojen direncinin gelişimi olasılığı ve istenmeyen yan etkiler kimyasal antibiyotiklerden daha azdır. Bakteri ve funguslara karşı etkili geleneksel antibiyotiklere kıyasla, AMP'lerin yeni antibakteriyel, antifungal ve antiviral ilaçların başlıca grubu olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, enfeksiyon hastalıklarının, parazitik enfeksiyonların ve hatta kanser ve HIV tedavisinde kullanılabilecekleri bilinmektedir. Geleneksel antibiyotikler direncin gelişiminde rol alan metabolik enzimleri hedef alır. Buna karşın AMP'ler mikrop membranında porlar açarak öldürür ve direnç gelişimini zorlaştırır (Sumi et al. 2015).

Bacillus cinsi bakteriler çok sayıda AMP'ler üretme potansiyeline sahiptir, dolayısıyla, yeni inhibitör maddelerin araştırılmasında umut vadeden bir başlangıç

olarak görülürler (Jianhua et al. 2009). *Bacillus* cinsi üyelerinin çok miktarda antimikrobiyal madde ürettiği bilinmektedir. Bu maddeler arasında ribozomal veya ribozom dışı sentezlenen lipopeptidler, bakteriyosinler, glikopeptidler ve siklik peptidler bulunmaktadır (Baindara et al. 2013). Bu metabolitler antagonistiktir ve farklı patojenlere karşı kullanılır. Böylece, *Bacillus* genusundan elde edilen AMP'ler enfeksiyon patojenlerinin tekli ve çoklu ilaç dirençlerine karşı geliştirilecek tedaviler için geleneksel antibiyotiklere önemli alternatif olabilir.

Bacillus genusu üyeleri iplik şeklinde, endospor üreten Gram-pozitif bakterilerdir ve toprakta bol bulunur. *Bacillus* üyeleri yapısal olarak farklı sekonder metabolit üretirler ve bunlar geniş çaplı antibiyotik aktivitesi gösterirler. *Bacillus*'un ürettiği antibiyotikler 2 grupta toplanır. Bunlardan birinci grubu ribozomal olmayan yani ribozom dışı geniş enzimatik komplekslerle sentezlenen küçük mikrobiyal peptidleri içerir. İkinci grup ise ribozomlarda sentezlenen peptidleri içerir (Li et al. 2012; Marx et al. 2001). Ribozomal olarak sentezlenen antibiyotikler doğada geniş yayılım gösterir; 12-50 amino asit içerir ve büyük yapısal farklılıklar gösterir. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen AMP'lerdir ve genellikle bunu üreten bakteri suşlarına karşı aktivite gösterir (Sumi et al. 2015). *Bacillus* türleri tarafından üretilen bakteriyosinler, çoğu laktik asit bakteriyosinlerinden daha geniş antimikrobiyal spektrum sergilerler. Bunlara örnek olarak *B. subtilis*'den elde edilen subtilin; *B. coagulans*'dan coagulin; *B. thuringiensis*'den bacthuricin F4, thuricin 17, entomicina ve tochicin; *B. cereus*'dan cerein verilebilir.

Bakterilerde, mantarlarda ve streptomisetlerde detaylandırılan ribozomsuz olarak sentezlenmiş peptitler, amino asitlerden türetilen iki veya daha fazla parça içermektedir. Bu sınıftaki daha uzun peptit molekülleri, normal protein yönteminde ribozomlarda (pre-pro protein) sentezlenmek yerine büyük multienzim kompleksleri üzerinde yapılmaktadır. Bu tanıma göre toplumumuzda kullanılan antibiyotiklerin çoğu peptit türevlidir (Hancock and Chapple 1999). Bu peptitler doğrusal veya dairesel olabilmekte ve ayrıca D-amino asitler veya hidroksi asitler gibi protein olmayan amino asitleri ve N-metilasyon, asilasyon, glikosilasyon ve diğer olağandışı fonksiyonel gruplara kovalent bağlantı ile dahil olmak üzere kapsamlı modifikasyonlara maruz kalabilen amino asit bileşenlerini içeren dairesel dallı yapılar içerebilmektedir (Stachelhaus and Marahiel 1995). Ribozomal olarak

sentezlenen peptitler antimikrobiyal özellik taşımaktadır. Ribozomlardan sentezlenen katyonik peptitler, doğuştan gelen bağışıklığın önemli bir parçası olarak kabul edilmiştir. Çoğu antimikrobiyal peptit, en az %50 hidrofobik amino asit kalıntılarına ve düşük oranda hem nötr polar hem de negatif yüklü amino asitlere sahiptir (Hancock and Chapple 1999) .

Bakteriyosinler, katyonik ve hidrofobik, ribozomal olarak sentezlenmiş, 20-60 amino asit uzunluğundaki anti-mikrobiyal peptitlerdir (Kumariya et al. 2019). Bakterilerin ve Archea'nın büyük çoğunluğu tarafından üretilmektedirler. Bu AMP'ler, diğer bakterilere karşı, dar spektrumlu bakteriyosinler için aynı türde veya geniş spektrumlu toksinler için farklı cinslerdeki bakterilere karşı aktiftir, ancak post transkripsiyonel modifikasyon veya spesifik bağışıklık mekanizmaları nedeniyle konakçı bakteriye çok az zarar vermekte veya hiç zarar vermemektedir (Sabaté and Audisio 2013); (Hancock and Chapple 1999).

Son 30 yılda gıda üretimi ve tüketimindeki en önemli eğilim, dünyanın her yerinden çok çeşitli gıdaların bulunduğu süpermarketlerin büyümesi olmuştur. Tüketicilerin hem besleyici hem de sağlıklı ama aynı zamanda daha az korunmuş (daha az tuz, daha az şeker, yağ ve kimyasal koruyucu), daha az işlenmiş (daha az ısınma ve donma hasarı), uzun raf ömrüne sahip gıdalara olan talebi de artmıştır. İşlenmiş gıdalar ideal olarak yapay veya sentetik olarak üretilmiş katkı maddeleri içermemelidir. Koruyucu olarak kullanılanlar ise yalnızca doğal katkı maddeleri ve bileşenleri içermelidir (Delves-Broughton 2012).

Laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen bakteriyosinler kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve doğal gıda koruyucuları olarak kullanılmıştır (Wang et al. 2014). Nisin, gıda koruyucusu olarak onaylanan tek bakteriyosin olup, gıda endüstrisinde giderek yaygınlaşmıştır. *US Food* tarafından genel olarak güvenli kabul edilir (GRAS) şeklinde onaylanmıştır ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 1988'den beri sağlık sorunlarına yol açmadan gıda muhafazasında (E234) kullanılmasına izin verilmiştir (Gharsallaoui et al. 2016).

Nisin genellikle asidik gıdalara eklenmektedir ve pH 8'e kadar aktif kalabilmektedir. Genellikle pastörize süt, eski peynirler ve konserve çorbalar ve sebzelerin korunması için kullanılmaktadır. Nisin, diğer koruma işlemlerini tamamlamak için de kullanılabilir. Örneğin, kutularda saklanan gıdalarda, ısıya dayanıklı

ekşimeye sebep olan sporlara karşı ısıyla pastörizasyon işlemlerine ek olarak nisin kullanılmaktadır. Nisin kullanıldığında termofilik bakterilerin biyolojik aktivitesini değiştirebilecek bazı kimyasal bileşiklerin varlığına dikkat edilmelidir (Gharsallaoui et al. 2016).

Nisin, *Listeria monocytogenes* ve *C. botulinum* gibi çeşitli patojenik Gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. Aynı zamanda etilendiamintetraasetik asit (EDTA), ısıtma işlemi, dondurma veya geçirgen hale gelen hücre duvarının değişmesine neden olan herhangi bir işlem gibi şelatörlerle birleştirildiğinde *Escherichia coli* ve *Salmonella spp.* gibi bazı Gram-negatif patojenlere karşı da etkilidir ve sitoplazmik membran arasındaki teması teşvik etmektedir (Gharsallaoui et al. 2016). Ayrıca, bitki patojenlerini inhibe etmek ve tahılı korumak için tarım sektöründe birkaç *Bacillus* türünden türetilmiş AMP kullanılabilmektedir. Ayrıca *B. subtilis* türü bitki hastalıklarının biyokontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda, *B. subtilis* NCD-2 suşunun, pamuk fide kök çürüklüğü hastalığının etken maddesi olan *Rhizoctonia solani*'ye karşı antifungal aktivite sergileyen fengycin tipi lipopeptitleri salgıladığı keşfedilmiştir (Sumi et al. 2015). *B. thuringiensis* kaynaklı thuricin CD'si, *C. difficile*'ye karşı spesifik aktivite gösteren bir bakteriyosindir ve çoğu geleneksel antibiyotikte olduğu gibi bağırsakta yaşayan iyi flora üzerinde hiçbir etkisi yoktur (Salazar-Marroquín et al. 2016).

Günümüzde geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması, yeni antimikrobiyal alternatiflerin araştırılmasını gerekli kılmıştır. Seçenekler arasında gen tarafından kodlanan doğal antibiyotikler olan antimikrobiyal peptidler (AMP) önemli alternatif sağlamaktadır. *Bacillus* genusu çok sayıda AMP'ler üretme potansiyeline sahip olduğundan yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılmasında umut vadetmektedir. Antimikrobiyal ajanların arasında bakteriyosinler prokaryotlar tarafından sentezlenen küçük peptidlerdir. *Bacillus thuringiensis* (Bt) biyopestisit üretimi için model bir organizma olmasına rağmen, Bt bakteriyosinleri hakkında çalışmalar oldukça sınırlıdır. Buna karşın, literatürdeki çalışmalar farklı Bt suşlarının yeni aktivite gösteren bakteriyosin elde edilmesinde çok çekici alternatif olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, Bt koleksiyonumuzda bulunan ve zeytin alanlarından toplanıp karakterize edilen

yaklaşık 100 adet Bt suşunun bakteriyosin benzeri madde üretme potansiyeli araştırılmış ve bunlardan biri karakterize edilmiştir.

1.1. Bakteriyosinin İsimlendirilmesi Ve Tarihçesi

Gratia, yaklaşık 100 yıl önce *Escherichia.coli* S'nin E. coli V tarafından baskılandığını gözlemledikten sonra 1925'te bakteriyosinleri keşfetmiştir. Başlangıçta kolisinler olarak adlandırılırken, 1946'da Fredericq tarafından proteinli yapıları çözülmüş ve bakteriyosinlerin inhibe edici etkisinin, hassas hücrelerin yüzeyindeki belirli reseptörlerin varlığına bağlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca elde ettikleri bulgular bakteriyosinlerin belirli türlere veya suşlara karşı neden dar bir aktivite spektrumuna sahip olduğunu açıklamaya da yardımcı olmuştur. Bu yıllardan yakın geçmişe kadar, Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen kolisinler ve diğer bakteriyosin türleri bilimsel çalışmalarda daha çok ilgi odağı olmuştur (Medine Güllüce and Barış 2015). Başka bir deyişle, Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler üzerine yapılan araştırmalar tarihsel olarak geride kalmıştır. Bununla birlikte, geniş antibakteriyel etki spektrumu ve bu bakteriyosinlerin diğer faydalı özellikleri, ilgili çalışmaları teşvik etmiştir. Bu nedenle, son otuz yılda, Gram pozitif bakterilerin bakteriyosinleri üzerine yapılan çalışmalar bakteriyosinle ilgili literatüre önemli katkı sağlamıştır. Son zamanlarda, çok çeşitli Gram pozitif bakterileri içeren laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler, üreticilerinin GRAS özelliğine sahip olma özellikleri ve birçok endüstriyel uygulamada çok yönlü kullanışlılığı nedeniyle en popüler grup haline gelmiştir (Medine Güllüce and Barış 2015; Riley and Wertz 2002). Bakteriyosin terminolojisi kendi kendini açıklayıcıdır. Enzim terminolojisinde "az" son ekinin kullanılmasına benzer şekilde, bakteriyosin terminolojisinde "sin" eki bakteriyosin aktivitesini belirtmek için kullanılır. Tür adına "sin" eki eklenir. Kolisinler ilk olarak *Escherichia coli* 'den izole edilmiştir, monosinler *Listeria monocytogenes* tarafından üretilen antimikrobiyal proteinlerdir, subtilin *Bacillus subtilis* tarafından üretilir ve stafilozin *Staphylococcus aureus* tarafından üretilir. Keşif sırasına göre atanan ardışık harfler, aynı türün farklı suşları tarafından üretilen benzersiz bakteriyosinleri ayırt etmek için

bakteriyosin adından sonra kullanılır. Örneğin, laktasin F, bir laktobasil türünde tanımlanan altıncı bakteriyosindir (Hoover and Steenson 2014).

1.2. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

Klaenhammer'a (Klaenhammer 1993) göre, nisin içeren lantibiyotik sınıfı(I), lantionin ve türevleri de dahil olmak üzere nispeten düşük moleküler ağırlıklı (5 kDa) termostabil peptidlerden oluşur. Nisin, gıda sektöründe, özellikle peynir ve sıvı yumurtalarda, soslarda ve konserve yiyeceklerde antibotulinik bir bileşen olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. *Lactobacillus monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve diğer patojenlere ve LAB türlerine karşı hücre duvarı yapısının inhibisyonunu ve hücre zarında delik oluşumunun teşvik edilmesini içeren çift etkili bir mekanizma ile elde edilen geniş bir antibakteriyel spektruma sahiptir (Balciunas et al. 2013). Sınıf II üç kategoride (IIa, IIb, IIc) sınıflandırılan, küçük ve ısıya dayanıklı, lantionin içermeyen membran aktif peptitlerdir (10 kDa). Sınıf IIa - Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-'nin N-terminalinde bir konsensüs dizisine sahip *Listeria*-aktif peptitler olan pediocin PA-1, sakasin A'yı içerir. Sınıf IIb aktivite için iki proteinli peptit içeren Laktokok G, laktokok M, laktasin B'den oluşmuştur. Sınıf IIc: tiyol ile aktive olan peptitlerden lactococci B'yi içerir. Sınıf III büyük (>30 kDa) ve ısıya dayanıklı proteinlerden oluşur: helveticin J, acidophilucin A, lactacins A and B . Sınıf IV ise aktivite için protein ve bir veya daha fazla kimyasal kısımdan (lipit, karbonhidrat) oluşan kompleks bakteriyosinlerdir: plantarisin S, leuconocin S, lactocin 27, pediocin SJ-1.

Cotter vd. (Cotter, Hill, and Ross 2005) bakteriyosinlerin iki kategoride lantionin (sınıf I) ve lantionin olmayan (sınıf II) olarak sınıflandırıldığı yeni bir sınıflandırma sistemi oluşturmuşlardır. Lantionin içeren lantibiyotikler (sınıf I), adsız lantionin veya β -metillantionin kalıntılarına sahip küçük peptitlerdir (19-38 amino asit uzunluğunda). Bu benzersiz kalıntılar, amino asitler arasında kovalent bağlar kurarak iç "halkalar" oluşturmuş ve lantibiyotiklere ayırt edici yapısal özelliklerini vermiştir. Ek olarak, lantibiyotikler, translasyon sonrası modifikasyonun bir sonucu olarak diğer yaygın olmayan kalıntılara sahip olabilir. Lantionin içermeyen (sınıf II) daha sık kullanılan bakteriyosinler de küçük (<10 kDa) ısıya dayanıklı peptitlerdir, ancak

lantibiyotiklerin aksine, önemli ölçüde translasyon sonrası modifikasyona uğramamıştır. Tüm sınıflandırma sistemleri iki türü tanır: sınıf IIa pediosin benzeri veya Listeria-aktif bakteriyosinler ve sınıf IIb iki peptid bakteriyosinler. Cotter'a göre, sınıf IIc (başlangıçta sınıf V) bakteriyosinler, kovalent olarak bağlı N- ve C-terminallerine göre sınıflandırılır ve siklik bir yapı ile sonuçlanmaktadır. Bilinen çok az sınıf IIc bakteriyosin olmasına rağmen, Cotter, amino asit dizi özdeşliği yüzdesi temelinde alt sınıf c (i) (enterosin AS48 ve LAB olmayan daireselin A'yı içerir) ve alt sınıf c (ii) (gasserisin A, reuterisin 6, LAB dışı butirivibriosin AR10 ve henüz dairesel bir yapı oluşturulmamış olmasına rağmen asidosin B) olarak adlandırılan iki alt bölüm önermektedir. Kalan bakteriyosinler tipik olarak "çeşitli" veya "tek peptitli pediosin olmayan lineer grup (sınıf IId) olarak gruplandırılmıştır. Büyük, ısıya dayanıksız murein hidrolazlar (eskiden sınıf III bakteriyosinler) 'bakteriolizinler' olarak yeniden sınıflandırılmıştır. Etki mekanizmaları, hücre duvarı hidrolizini katalize ederek hareket ettikleri için bakteriyosinlerinkinden farklıdır. Ek olarak, her zaman bakteriyosin yapısal genleriyle ilişkili spesifik bağışıklık genlerini içermez bunun yerine direnç sağlamak için üretici hücre duvarındaki modifikasyonlara dayanır.

A. Simons vd. (Simons, Alhanout, and Duval 2020) 'ne göre, bakteriyosinler boyutları, moleküler bileşimleri, yapıları ve modifikasyon yöntemleri dahil olmak üzere çok sayıda parametreye göre sınıflandırılmıştır. Bakteriyosinler arasında yapılabilecek ilk ayırım, üretici organizmanın tipidir: GPB veya GNB. BGPB'ler dört farklı kategoride sınıflandırılır: Sınıf I lantibiyotikler küçük boyuta (<5 kDa) ve çok sayıda halka yapısı oluşturan ve ısı, pH ve proteoliz varlığında yapısal stabilite sağlayan benzersiz amino asitler içeren transkripsiyon sonrası modifiye edilmiş bakteriyosinlere sahiptir. Tipik olarak, bu sınıf, GPB'nin bir inhibisyonu ile ilişkilidir. Lantibiyotikler ayrıca aşağıdaki alt sınıflarda gruplandırılabilir: Alt sınıf Ia; Pozitif yüklü uzun peptitler, örneğin nisin ve epidermin; bu alt sınıf tipik olarak bakteri zarlarında gözeneklerin oluşturulmasıyla bağlantılıdır. Alt sınıf b; bu bakteriyosinlerin yapısı küreseldir ve esnek değildir, peptitler negatif yüklüdür, örneğin laktik 481, sitolisin; Bu alt sınıfın etki mekanizması, hedeflenen bakterilerin büyümesi için gerekli olan belirli enzimlerin baskılanması ile ilgilidir.

Sınıf II, lantibiyotik olmayan proteinler, yapılarında olağandışı amino asitler içermez ve translasyon sonrası modifikasyon, pediocin PA-1 gibi sadece birkaç üyede bisülfid köprülerinin oluşumu ile sınırlıdır ve bir sınıf olarak, bu sınıf, bakteri zarlarında kararsızlığa ve geçirgenliğe neden olur veya zarda gözenek oluşumuna neden olur. Bu grup dört alt sınıfa ayrılmıştır. 11a alt sınıfının üyeleri (antilisterial bakteriyosin) bisülfid köprüleri olan lineer bir yapıya sahiptir ve yaygın antilisterial etki gösterir (örn. lökosin A, asidosin A). Alt sınıf 11b; eşit miktarlarda üretilen ve antibiyotik etkisi için gerekli olan iki peptit bakteriyosinlerdir (β/α) (örn. laktokok G, laktokok Q). Alt sınıf 11c bakteriyosinleri, bir öncü peptit dizisi ile bağlantılı olan ve bir ile iki sistin kalıntısı (sistiyobiyotikler ve tiyolbiyotikler) içeren küçük bakteriyosinlerdir (örneğin laktokoksin A ve asidosin B). Alt sınıf 11d, sınıf II grubuna dahil olan tüm bakteriyosinleri bir arada gruplamak için kullanılmış ve diğer alt grupların hiçbirine dahil değildir. Sınıf III'ün bakteriyosinleri, zoosin A gibi ısıya karşı kararsız litik veya litik olmayan olabilen büyük peptitlerdir (>30 KDa). Bu bakteriyosinler, enzimatik aktivite ile elde edilen antibakteriyel aktiviteye sahiptir (örneğin endopeptidaz) ve bakteri hücre duvarının yırtılmasına neden olmuştur. Sınıf IV bakteriyosinler, bakteri hücre zarına zarar veren plantarisinler gibi lipid veya karbonhidrat bileşenlerini içeren yapıları ile tanımlanmıştır. Bu yapısal özellik, bu bileşikler, lipolitik enzimler dahil olmak üzere çok sayıda enzime karşı duyarlı hale getirmiştir.

BGNB dört gruba ayrılır: *E.coli*'den üretilen ve moleküler ağırlığı 10 KDa'dan fazla olan bakteriyosinler ve kolisinlerdir. Bu grubun etki yöntemi iki tipte sınıflandırılabilir: bakteri hücre duvarında gözenek oluşturma ve DNAaz, RNAaz veya tRNAazlara benzeyen nükleik asit yapılarının bozunmasıdır. İkinci grup, yapısal, boyutsal ve işlevsel olarak *E.coli* tarafından üretilen bakteriyosinlere benzeyen diğer bakteriler (örneğin: *Klebsiella* spp., klebicins; *P.aeruginosa*, S. pyocins) tarafından üretilen kolisin benzeri bakteriyosinler. Kolisinler gibi antibakteriyel aktiviteleri, delik oluşturma veya nükleaz aktivitesine bağlanabilmiştir. Üçüncü grup, iki alt sınıfa ayrılan küçük peptitler (<10 KDa) olan mikrosinlerle temsil edilmiş : (I) moleküler ağırlığı 5 kDa'dan az olan translasyon sonrası modifiye edilmiş bakteriyosinler; ve (II) molekül ağırlığı 5 ile 10 kDa arasında olan modifiye edilmemiş veya minimal modifiye edilmiş peptitlerdir. Bu grubun etki şekli, zarın

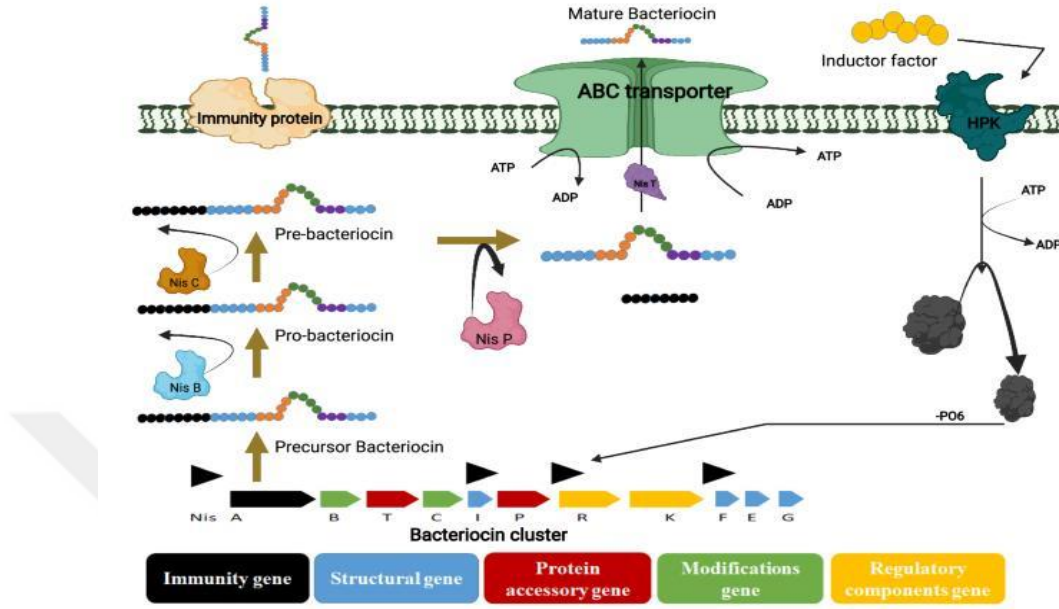
bozulması veya yaşamsal enzimatik fonksiyonların inhibisyonudur. Dördüncü grup, bakteri hücre zarlarını delebilen ve hücre ölümüne neden olabilen silindirik yapılara sahip yüksek moleküler ağırlıklı peptitler olan “Faj Kuyruğu Benzeri” Bakteriyosinlerdir. Bu peptitler, faj kuyruğu genlerinin evcilleştirilmesinin bir sonucudur. *P. aeruginosa* tarafından üretilen R- ve F-piyosinler bu grupta en iyi araştırılan bakteriyosinlerdir (Michel-Briand and Baysse 2002).

1.3. Bakteriyosin Biyosentezi

Bakteriyosinler sıklıkla spesifik bir şekilde, pre-peptid veya pre-bakteriyosin olarak adlandırılan bir C-terminaline bağlı bir N-terminal lideri ile aktif olmayan bir peptit olarak üretilmektedir. Yolak, ön bakteriyosinin oluşmasıyla başlar, ardından belirli modifikasyon reaksiyonları, lider peptidin bölünmesi ve son olarak pro-bakteriyosinin hücre zarı boyunca yer değiştirmesi izlenmektedir. Bakteriyosin üretimini kodlayan bakteriyosinlerin genetik belirleyicileri, plazmitler, kromozom veya kromozoma yerleştirilmiş transpozonlar üzerinde yer alan farklı bileşenlerden oluşan bir veya iki operon halinde organize edilmektedir (Drider et al. 2006).

David ve arkadaşların’a göre (David, Tania, and Norma 2016) bileşenler şunları içermektedir:1) Yapısal gen, bir N-terminali, çift glisin veya peptid sinyal dizisi içeren pre-probakteriyosini kodlamaktadır. Çift glisin tipi liderin C-terminalindeki iki korunmuş glisin, lider diziyi işlemek ve olgun bakteriyosinin hücre dışı ortama salgılanması için ABC taşıyıcıları tarafından tanımlanmaktadır. 2) Bağışıklık geni, bakteriyosin üreten suşun kendisini koruyan 51 ila 154 amino asit arasında değişen küçük proteinleri kodlamaktadır. 3) Ön işleme, probakteriyosinin taşınması ve salgılanmasında yer alan proteinleri kodlayan genler içermektedir. 4) Probakteriyosinin post-translasyonel modifikasyonlarından sorumlu enzimleri kodlayan genler içermektedir. 5) Sentezin düzenlenmesinde yer alan bileşenler, genler aracılığıyla kodlanmaktadır. Bakteriyosin üretimi adaptif bir reaksiyon olarak görülmekte ve bu nedenle belirli çevresel koşullara yanıt olarak düzenlenmektedir (Skaugen, Cintas, and Nes 2003).

Düzenleme süreci, üç bileşenden oluşan bir sinyal iletim sistemi tarafından gerçekleştirilmektedir: bir indüktör peptit (IP), bir sensör histidin protein kinaz (HPK) ve bir yanıt düzenleyici protein (RR) (Şekil 1.1).



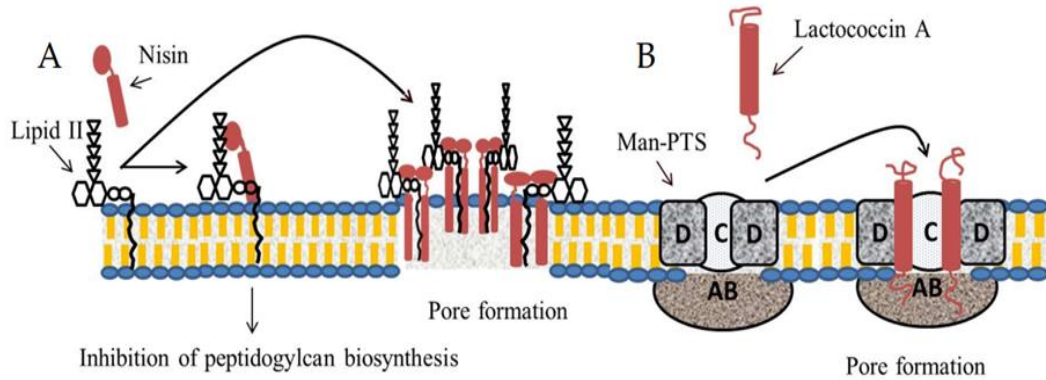
Şekil 1.1. yapısal gen pre-probakteriyosini kodlar, (i) bağışıklık geni küçük proteinleri kodlar, (ii) proteinleri işlemek için kodlayan genler, (iii) pre-probakteriyosinin taşınması ve salgılanması, (iv) post-probakteriyosin için enzimleri kodlayan genler. Translasyon modifikasyonları ve (vi) sentezin düzenlenmesinde yer alan bileşenleri kodlayan genler (B. R. Sharma, Halami, and Tamang 2022).

1.4. Bakteriosin Mekanizması

Bakteriyosinler, hedef suşlarına karşı aşırı toksisiteleriyle iyi bilinmektedir. Bakteriyosin aktivitesi genellikle bakteriyosin üreticisi olan suş ile yakından ilişkili olan suşlarla (dar spektrumlu biyoaktivite) sınırlıdır, ancak çok sayıda bakteriyosin son zamanlarda daha geniş bir türe karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir (geniş spektrumlu biyoaktivite) (Gautam, Sharma, and Sharma 2020).

BGPB'nin antimikrobiyal aktivitesi tipik olarak hücre ölümüyle sonuçlanan bakteriyel membran bütünlüğünün kaybı ile ilişkilidir (Cavera et al. 2015). Birkaç olası süreç arasında, bu etki, bakteri zarının lipid II bileşeni, Mannoz FosfoTransferaz Sistemi (Man-PTS) ile doğrudan etkileşimden veya belirli bir reseptörün katılımı olmadan kaynaklanabilmektedir (Nishie, Nagao, and Sonomoto

2012). Nisin lipid II'yi bir yerleştirme molekülü olarak kullanmakta ve hedeflenen hücrenin zarında gözenekler oluşturarak hareket etmektedir, bu da membran geçirgenliğinin artmasına ve dolayısıyla hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Cooper, Li, and van der Donk 2010). Nisin peptidin yapısı iki fonksiyonel alana ayrılır: (i) lipid II'nin pirofosfat grupları için yüksek bir afiniteye sahip iki halka içeren N-terminal alanı, ii) gözenek oluşumu için gerekli olan C-terminal bölgesi (Wiedemann et al. 2006). Epidermin ve gallidermin dahil olmak üzere ek alt sınıf Ia BGPB'ler için benzer gözlemler bulunmuştur. Mikrobisporisin ile olduğu gibi, ek bakteriyosinler, peptidoglikan biyosentezini inhibe ederek antimikrobiyal aktiviteye sahip olabilmektedir, bu da sitoplazmada peptidoglikan öncüllerinin birikmesine ve bakteri zarının parçalanmasına neden olur (Castiglione et al. 2008). Çok sayıda sınıf II bakteriyosini (örneğin, pediosin PA-1, sakasin P, laktokoksin A) şekerlerin fosforilasyonu ve ikili taşıyıcı için kullanılan bir taşıma sistemi olan Man-PTS bir reseptör olarak çalışmaktadır. Bu sistemde bulunan karbonhidrat-proteine spesifik bir kompleks olan enzim EII, üç proteinden (AB, C ve D) oluşur ve bu bakteriyosinlerin hedefidir. Bakteriyosinin Man-PTS ile etkileşimi bu reseptörü kalıcı olarak açmakta ve böylece hücre içi kimyasalların kontrolsüz ve sürekli bir şekilde dışarı çıkmasına neden olmaktadır (Şekil 1.2). İki peptit laktokok Q ve laktokok G gibi alt sınıf IIb'nin bakteriyosinleri de gözenek oluşturma yoluyla, reseptör görevi gören membran proteinleri ile etkileşime girerek çalışmaktadır (Simons, Alhanout, and Duval 2020).



Şekil 1.2. Nisin ve laktokoksin A'nın (A) etki mekanizmaları, lipid II'yi hedefleyerek, nisin peptidoglikan biyosentezini inhibe edebilir ve bakteri zarında gözenek oluşturur. (B) laktokoksin A, reseptör olarak mannoz fosfotransferaz sistemini (Man-PTS) kullanır bu reseptörün kontrolsüz açılmasına ve böylece bakteri zarında bir gözenek oluşturmaya sebep olur. Simon vd., 2020'den alınmıştır.

BGNB bakteriyosinleri, mikrosinler iki mekanizmadan biri yoluyla antibakteriyel etki gösterir: (i) iç zarda gözenek oluşumu (örn. mikrosinler E492, M ve H47), (ii) hücre içi enzimlerin (örn., mikrosin J25, B17 ve C) hedeflenmesi. BGPB'den farklı olarak, mikrosinler, antimikrobiyal aktivite uygulamak için hedef hücreye girmeli ve daha sonra, demir absorpsiyon reseptörleri ve dış membran porinleri gibi hassas süşların dış zarlarındaki belirli reseptörlere bağlanmalıdır. Bu nedenle, siderofor taşıma sistemi, gözenekler oluşturan mikrosinleri içe aktarmak için kullanılmaktadır (Duquesne et al. 2007). Aslında FepA, Cir, Fiu veya FhuA gibi demir alım reseptörleri hedeflenebilmek ve mikrosin E492, M, H47 ve J25 dahil olmak üzere çeşitli mikrosinler için reseptör görevi görebilmektedir (Patzner et al. 2003). Mikrosinler, mikrosin E492 için mannoz, ilgili heksozların (Man XYZ permeaz) ve mikrosin H47 için ATP sentez kompleksinin absorpsiyonunda yer alanlar gibi spesifik iç membran bileşenleri ile ardı sıra gelen etkileşimlerin bir sonucu olarak gözenekler oluştururken, mikrosin hedefi M hala bilinmemektedir (Rodríguez and Laviña 2003). Hücre içi enzimleri hedef alan mikrosinler söz konusu olduğunda, mikrosin J25 ile gösterildiği gibi, siderofor taşıma sistemi yoluyla alım kolaylaştırılabilmektedir. Mikrosin C ve mikrosin B17 ise, hedeflenen hücrelerin periplazmik bölgesine girmek için bir kanal olarak dış zar proteini OmpF'yi kullanmaktadır. Mikrosin B17, besin emilimi için gerekli olan SdaC ve SbmA proteinleri gibi belirli iç zar reseptörleri yoluyla hücreye girerken, mikrosin C, YejBFF ABC taşıyıcı kompleksi tarafından iç zar boyunca taşınmaktadır. Mikrosinler, belirli ve kritik enzimlerin inhibitörleri olarak işlev görmektedir. Örneğin, Mikrosin J25'in hedeflenen bakterinin RNA polimerazını inhibe ettiği gösterilirken, microcin B17'nin bir DNA giraz inhibitörü olduğu, DNA replikasyonunu inhibe ettiği ve bir SOS reaksiyonu oluşturduğu bulunmuştur (Mathavan and Beis 2012). Mikrosin C'nin aspartil-tRNA sentezini inhibe ederek etki gösterdiği, dolayısıyla hedef hücrede protein sentezini azalttığı bilinmektedir (Novikova et al. 2007). Mikrosinlerde olduğu gibi, kolisinler de hassas bakteri zarlarında gözenekler oluşturarak veya hücre içinde belirli hedefleri enzimatik olarak yok ederek çalışmaktadırlar (Gillor, Kirkup, and Riley 2004). Buna ek olarak, bu bakteriyosinler, hedeflenen hücrelere dış zardaki belirli reseptörler yoluyla girmektedir. TonB'ye bağlı B12 vitamini taşıyıcısı (BtuB), dış zar proteinleri A ve F (OmpA ve OmpF), nükleozid taşıyıcı Tsx ve FepA, FhuA ve Cir gibi demir alımında

rol oynayan reseptörler dahil olmak üzere çok sayıda kolisin reseptörü tanımlanmıştır (Cascales et al. 2007; Simons, Alhanout, and Duval 2020).

1.5. Bakteriyosin Direnci

Antibiyotikler söz konusu olduğunda, kazanılmış direnç, bakteriyosinlerin kullanımının bir sonucu olarak kendini gösterebilmektedir (de Freire Bastos, Varella Coelho, and da Silva Santos 2015). Raporlara göre, direnç, zarın yapısında, akışkanlığında ve yükünde değişikliklerle sonuçlanan karmaşık bir mekanizmadır. Hemen hemen tüm bakteriyosinler, antimikrobiyal etkilerini göstermek için bakteri membranı ile etkileşime ihtiyaç duymaktadır. Sonuç olarak, bu tür bir değişikliğin bakteriyosin aktivitesi üzerinde bir etkisi olması muhtemeldir (Islam et al. 2012). Bu bileşikler ribozomlar tarafından üretilir ve genellikle doğada katyonik ve hidrofobiktir (de Freire Bastos, Varella Coelho, and da Silva Santos 2015). Örneğin, nisin, 50 yılı aşkın bir süredir gıda maddelerini korumak için ticari olarak kullanılan ribozom sentezi yoluyla üretilen katyonik bir antimikrobiyal peptittir. *L. monocytogenes*'deki nisine direncin, *L. monocytogenes*'in virülansında yer alan iki bileşenli sistem Vir R/Vir S ile ilişkili olduğu daha önce gözlemlenmiştir. Bu iki bileşenli sistem, hidrofobik bileşenler ekleyerek bakteri hücre yüzeyini değiştiren proteinleri kodlayan *dltA* ve *mprF* genlerinin ekspresyonunu düzenlemektedir (Collins et al. 2010; Simons, Alhanout, and Duval 2020). Bu değişiklikler bakteri Bakteri membranı bu modifikasyonlar sonucunda negatif yükünü kaybederek bakteriyosinler gibi katyonik peptitlere karşı dirençli hale gelmektedir. Buna ek olarak, bakteriyel membranların kalınlığının ve sertliğinin artmasıyla sonuçlanan membran değişikliklerinin nisin direnci ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (Najjar, Chikindas, and Montville 2007; Simons, Alhanout, and Duval 2020) ve bazı nisine dirençli GPB'de nisin parçalayıcı bir enzim olan nisinaz üretimi görülmüştür (Kaur et al. 2011). Öte yandan, Gram-negatif bakteriler doğal bakteriyosinleri çeşitli şekillerde engelleyebilmektedir. Örneğin, kolisinler, *Escherichia coli* ve akrabaları tarafından üretilen ve bunlara karşı aktif olan bir antimikrobiyal sınıftır. *E.coli*'nin bakteriyosinlere karşı direnci aşağıda belirtilen durumlarda ortaya çıkar. 1) Kolisin-plazmit kodlu bağışıklık proteini spesifik bir kolisine bağlandığında ve bunu inaktif

hale getirdiğinde ortaya çıkan plazmit kodlu bağışıklık, 2) Kolisini bağlayan bir hücre yüzeyi reseptörü değiştiğinde ortaya çıkan direnç 3) Kolisin translokasyonunda yer alan hücre zarı proteinleri değiştirildiğinde ortaya çıkan tolerans, 4) Aynı faj tarafından tekrarlanan enfeksiyonları önleyen ve aynı zamanda kolisin direnci sağlayan bir süreç olan lizojen süperenfeksiyonu dışlama (Feldgarden and Riley 1998).

1.6. Öz-Bağışıklık

Üretici suşlar, kendilerini kendi bakteriyosinlerinden korumak için bağışıklık genlerine sahiptir. Çoğu zaman, bağışıklık proteinlerini kodlayan genetik belirleyiciler, bakteriyosin yapısal gen(ler)i ile birlikte lokalize olmak ve birlikte düzenlenmek ve korunmuş lokalizasyonları nedeniyle, bakteriyosinlerin çoğunluğu için varsayılan bakteriyosin bağışıklık proteinleri bilinmektedir. Bununla birlikte, koruma sağladıkları moleküler süreçler bilinmemektedir. Genel olarak, çeşitli bakteriyosin sistemleri için potansiyel bağışıklık proteinleri, daha önce karakterize edilmemiş çeşitli bağışıklık mekanizmalarının varlığını gösteren, boyut, dizi ve yapı açısından önemli farklılıklar göstermektedir (Hassan et al. 2012). Bağışıklık en iyi, üreticiye kendini koruma sağlamak için en az iki farklı bağışıklık mekanizmasının birlikte çalıştığı nisin gibi lipid II'yi hedefleyen sınıf I bakteriyosinler için tanımlanmaktadır: (i) bakteriyosini dışarı pompalayan özel bir ABC taşıyıcı sistemi (Stein et al. 2003) ve (ii) hücre dışı taraftaki aynı kökenli bakteriyosin ile spesifik olarak etkileşime giren ve onun lipid II'ye bağlanmasını önleyen özel bir bağışıklık proteini LanI (Hill et al. 2008). Birkaç dairesel bakteriyosin için, ABC taşıyıcılarını içeren bir bağışıklık mekanizması da önerilmektedir (Diaz et al. 2003). Sınıf II bakteriyosinleri (sınıf IIa bakteriyosinler ve sınıf IIb laktokoksin A) hedefleyen Man-PTS için bağışıklık mekanizması tanımlanmıştır. Bağışıklık proteini, zarın hücre içi tarafındaki Man-PTS reseptörüne yakından bağlanarak gözenek oluşumunu önlemektedir (Diep et al. 2007). Man-PTS'ye bu bağlanma ancak bakteriyosin varlığında gerçekleşmektedir. Bu bağışıklık proteinleri çok seçicidir ve sıklıkla sadece tasarlandıkları bakteriyosine karşı koruma sağlamaktadır (Hassan et al. 2012; Johnsen, Fimland, and Nissen-Meyer 2005).

1.7. Bakterilerden üretilen güçlü antimikrobiyal peptidler (bakteriosinler)

Antimikrobiyal peptidler (AMP'ler), çok hücreli organizmalardan tek bakteri hücrelerine kadar her türlü canlılar tarafından üretilir. Daha yüksek organizmalarda, AMP'ler doğuştan gelen bağışıklığa katkıda bulunmaktadır ve patojenik mikroplara karşı ilk savunma hattı olarak hizmet etmektedir. Genel olarak ökaryotik AMP'ler ve bakteriyosinler, aşağıdaki özellikleri paylaşan büyük heterojen bir bileşik grubudur: Küçük (20-50 aa), katyonik ve amfifilik veya hidrofobiktirler; bu, negatif yüklü bakteri membranıyla erken temasları kolaylaştırma, burada hücrel çözünenlerin dışarı sızmasına neden olurlar ve sonunda hücre ölümüne neden olan gözenekler üretirler (Hassan et al. 2012). Ancak ökaryotik AMP'ler ve bakteriyosinler arasında birkaç kritik ayrım vardır. Bakteriyosinler sıklıkla son derece güçlü olmakla birlikte, ökaryotik AMP aktivitesi için daha düşük piko-nanomolar konsantrasyonlar gereklidir. Bakteriyosinlerin çoğunluğu çok dar bir hedef spektruma sahiptir, üretici ile sadece birkaç yakından ilişkili türe/cinslere karşı aktiftir (Nissen-Meyer and Nes 1997), oysa ökaryotik AMP'ler genellikle daha az spesifiktir ve çok çeşitli bakterileri hedeflerler. Bakteriyosinler, yüksek potansiyelleri ve özgüllükleri nedeniyle gıda muhafazası ve enfeksiyon tedavisi de dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar için potansiyel antibakteriyel ajanlar olarak kabul edilmektedirler (Hassan et al. 2012).

1.8. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) aerobik, spor oluşturan, gram-pozitif bir bakteridir. Bt, önemli tarımsal zararlıların ve insan hastalıklarının vektörlerinin kontrolünde yaygın olarak kullanılan bir biyoinsektisit kaynağıdır. Ticari olarak temin edilebilen biyopestisitlerin %90'ından fazlasının temelini oluşturmaktadır (Abdelmalek et al. 2016). *B. thuringiensis* toksinlerinin çoğu, sporulasyon fazı sırasında üretilen parasporal inklüzyonlardır. Parasporal inklüzyon cisimcikleri, delta-endotoksinler olarak bilinen ve iki farklı gruba sınıflandırılan kristal proteinler içermektedir: Amino asit dizisi benzerliklerine dayanan Cry ve Cyt proteinleri (Jouzani, Valijanian, and Sharafi 2017). Cry proteini 73 farklı gruba ayrılırken (Cry1'den Cry73'e), Cyt proteini üç farklı grupta sınıflandırmıştır: Cyt1, Cyt2 ve Cyt3 (Palma et

al. 2014). Diğer insektisidal proteinler, büyümenin vejetatif fazı sırasında üretilen vejetatif insektisidal proteinlerdir (Vips). Vip proteinleri, amino asit benzerlik derecelerine göre Vip1, Vip2, Vip3 ve Vip4 olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (Palma et al. 2014). Bt bazlı biyoinspektisidler Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera takımlarındaki belirli böcek türlerinin kontrolünde kullanmakla birlikte, diğer böcek takımlarına (Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera ve Mallophaga) ve nematodlara, akarlara ve protozoaya karşı da aktif oldukları bildirilmiştir (Schnepf et al. 1998). Ayrıca Cry31A, Cry41A, Cry45A, Cry46A, Cry63A ve Cry64A (Palma et al. 2014) gibi bazı Bt Cry proteinleri insektisidal ve hemolitik aktivite göstermemektedir (Jouzani, Valijanlian, and Sharafi 2017). Bu, yeni bir protein kategorisi olan parasporin (PS), kanser hücrelerini ayırt ederek öldürme yeteneğine sahip bakteriyel parasporal protein olarak tanımlanan yeni bir kategorinin oluşmasına sebep olmuştur (Ohba, Mizuki, and Uemori 2009).

Bütün bu proteinlere ilaveten, Bt antimikrobiyal aktiviteye sahip proteinleri, özellikle bakteriyosinleri de sentezlemektedir. Bu nedenle, Bt antimikrobiyallerinin uygulanması, gıda biyolojik koruma, tıp ve çevre bakımı gibi farklı alanlarda oldukça önemli hale gelmektedir (Salazar-Marroquín et al. 2016).

1.9. *Bacillus thuringiensis* bakteriyosini

B. thuringiensis gibi entomopatojenik bakteriler, sadece böcekleri kontrol etmek için değil, aynı zamanda farmasötikler ve gıda koruyucuları olarak da kullanılabilen çeşitli ikincil metabolitler üretmektedirler (Bode 2009). *B. thuringiensis*'in diğer Gram-pozitif bakterilere karşı antagonistik aktivitesi ilk defa Vankova tarafından 1957'de tanımlanmıştır. Günümüzde antagonistik aktivite neredeyse tüm serotipler arasında gösterilmiştir. Antibakteriyel aktivitenin bakteriyosin benzeri maddelerden kaynaklandığı gösterilmektedir (Favret and Yousten 1989).

B. thuringiensis antimikrobiyal peptitlerin çoğu, sporulasyon ve Cry sentezi ile aynı zamana denk gelen durağan faz büyümesi sırasında maksimum düzeyde üretilir (de la Fuente-Salcido vd., 2013)

Şimdiye kadar farklı *B. thuringiensis* suşları tarafından sentezlenen 18 bakteriyosin rapor edilmiş (Sumi et al. 2015) ve Thuricin Bn1, Bacthuricin 17 F103, Bacturicin F4, Entomocin 9, Entomocin 110, Entomocin 420, Morricin 269, Kurstacin 287, Kenyacin 404, Tolworthcin 524, Tochicin, Thuricin, Thuricin CD, Thuricin 19 H, Thuricin S, Thuricin 17, Thuricin 439 ve Thuricin 7 olarak isimlendirilmişlerdir. Bu bakteriyosinler *morrisoni*, *kurstaki*, *kenyae*, *entomocidus*, *tolworthi* ve *tochigiensis* dahil olmak üzere çeşitli alt türler tarafından üretilmektedir (de la Fuente-Salcido, Casados-Vázquez, and Barboza-Corona 2013).

Bakteriyosinler, neredeyse 1 kDa (thuricin, 0.950 kDa) ile 12.4 kDa (entomosin 9) arasında değişen farklı moleküler ağırlığa sahip peptitlerdir. Moleküler ağırlık açısından, bu bakteriyosinleri A ve B gruplarına ayrılır. A Grubu, 5 kDa'dan daha hafif olan bakteriyosinlerden ve B grubu 5 kDa'dan daha ağır olan bakteriyosinlerden oluşur. İşlevsel olarak bakıldığında, A grubu içinde iki tip bulunabilir: tek peptit ve iki bileşenli peptitler (Parisien et al. 2008).

B. thuringiensis bakteriyosinleri patojenik bakterilere karşı geniş veya dar bir inhibitör aktiviteye sahip olabilmektedir. Thuricin 439 ve Thuricin CD dar spektrumlu antimikrobiyal peptidlere örnektir. Morricin 269, Kurstacin 287, Kenyacin 404, Entomocin 2 420 ve Tolworthcin 524 ise geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir (de la Fuente-Salcido, Casados-Vázquez, and Barboza-Corona 2013).

1.10. Bacillus cinsinden elde edilen Bakteriyosin- Benzeri Peptidler (BLIS)

Bacillus bakteriyosinleri, Gram pozitif türlere ek olarak Gram negatif bakterileri, mayaları veya mantarları içerebilen, ve çoğu LAB bakteriyosinlerine kıyasla bazen daha geniş inhibisyon spektrumları nedeniyle önem kazanmaktadır. Bazı bakteriosinlerin insanlar ve/veya hayvanlar için patojen olduğu bilinmektedir. Basiller, filogenetik sınıflandırmalarına göre Firmicutes filumunun I. Sınıfına aittir. Bacillus bakterileri Gram pozitif, aerobik, endospor oluşturan, çubuk şeklinde hücreli, katalaz üreten ve yaygın bir dağılıma sahip bakterilerdir. Toprakta ve killerde, kayalarda, tozda, su ortamlarında, bitki örtüsünde, yiyeceklerde ve çok

sayıda böcek ve hayvanın gastrointestinal sistemlerinde bulunabilmektedir. Bakteriyosin benzeri inhibitör bileşikler (BLIS), henüz tam olarak tanımlanmamış bir grup antimikrobiyal kimyasaldır. Antimikrobiyal bileşiğin peptit bileşimi bilinmediğinde, bu terim sıklıkla kullanılır, *Bacillus*, ribozomal olmayan sentez yoluyla antimikrobiyal peptitlerin (veya lipopeptitlerin) meydana gelmesinde üretken olduğundan, gerçek bakteriyosinlerin (iturinler ve diğerleri gibi) ribozomal sentezini doğrulamak da önemlidir (Abriouel et al. 2011).

Lisboa vd. (Lisboa et al. 2006) Brezilya Atlantik ormanı türü *B. amyloliquefaciens* LBM 5006'nın, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* ve *Pasteurella haemolytica* gibi patojenik ve gıda bozulmasına neden olan bakterilere karşı bakteriyosin benzeri peptitler (BLIS) geliştirdiğini göstermiştir. BLIS etkisi geniş bir sıcaklık aralığında sabittir, ancak sıcaklık 121°C/15 dakikayı aştığında etkisi durmaktadır. Asidik ve nötr pH seviyelerinde maksimum aktivite kaydedilmiş, ancak alkali pH'ta etkisi yok olmuştur. İturinler hariç antibakteriyel bileşik, tripsin, papain, proteinaz K ve pronaz E proteolizine duyarlıdır. Maksimum antibakteriyel aktivite, bakterilerin 37°C sıcaklıkta BHI içinde yetiştirilmesiyle durağan büyüme fazı sırasında belirlenmiştir. BLIS aktivitesi, moleküler ağırlığı yaklaşık 5 kDa olan bir peptit tarafından düzenlenmektedir.

Saleem vd. (Saleem et al. 2009) bahçe toprağından izole edilen BLIS adı verilen Bacillocin üreten *Bacillus brevis*'in antibakteriyel aktivitesini araştırmaktadır. Bacillocin üretimi, BHI ortamında 32°C'de en yüksek seviyede gözlemlenmiş, Bacillocin üretimi, erken büyüme fazında başlamış ve durağan dönemde artmıştır. Bacillocin Bb, 1 ila 9 arasındaki pH değerlerinde stabildir, ısıya (30 dakika boyunca 100°C), deterjanlara ve organik çözücülere karşı dirençlidir. Proteinaz K tedavisinin ardından bacillocin aktivitesinin tamamen ortadan kalkması, bunun bir protein olduğunu göstermiştir. Moleküler kütlesi <10 KDa olarak belirlenmiştir. Bacillocin'in *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *C. xerosis* ve *C. hoffmanni*'ye karşı etkili olduğu bulunmuştur.

Bir diğer bakteriyosin benzeri madde olan Cerein 8A *Bacillus cereus* 8A'dan elde edilmiştir (Bizani, Dominguez, and Brandelli 2005) . Cerein 8, pH 2-11 arasında stabil kalmıştır, ve 30 dakika boyunca 75°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ısıl işlem ve

test edilen proteolitik enzimlerin tümü (Tripsin, Pronaz E, Proteinaz K ve Papain) ile işlem, inhibitör etkinin kaybolmasıyla sonuçlanmıştır. Cerein 8A, *L. monocytogenes* ve *B. cereus* dahil olmak üzere çeşitli patojenik ve gıda bozulma bakterilerini, muhtemelen membran fonksiyonlarına müdahale ederek inhibe etmiştir. Ek olarak, bu BLIS, bozulmamış *B. cereus* sporlarına karşı da aktif durumdadır.

Jianhua ve arkadaşları (Jianhua et al. 2009) Çin bitkilerinden izole edilen bir suş olan *B. subtilis* LFB112'yi evcil hayvanlarda bulunan çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı potansiyel antimikrobiyal etkisi nedeniyle araştırmıştır. *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus bovis* ve *Staphylococcus aureus* ve iki çoklu ilaca dirençli klinik izolat ve bir fitopatojenik maya suşu da inhibe edilmiştir. Antibakteriyel aktivite, orta-log büyüme fazı sırasında tanımlanmış ve erken durağan faz sırasında hızla artmıştır. Bunu takiben, antagonistik aktivite azalmıştır. Antimikrobiyal madde proteinaz K ve pronaz E'ye duyarlıdır ancak papain, tripsin ve pepsin proteolizine dirençlidir. Antibakteriyel aktivite, ısıya nispeten dirençlidir ve ayrıca 3 ila 10 pH aralığında aktiftir. Aktif peptit, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlendiği üzere, yaklaşık 6.3 kDa'lık bir görünür moleküler ağırlığa sahiptir.

1.11. *Bacillus thuringiensis*'ten çeşitli bakteriyosin benzeri peptitlerin eldesi ve karakterize edilmesi

B. thuringiensis suşları, thuricins, tochicins veya entomocins olarak bilinen çeşitli antibakteriyel proteinler ve peptitler üretmektedir. Cherif vd (A. Cherif et al. 2001) *B. thuringiensis* suşu BMG 1.7'nin bir toprak izolatu tarafından üretilen, aktivitesi logaritmik fazın sonuna doğru tespit edilen ve orta durağan faz sırasında zirveye ulaşan yeni bir bakteriyosin olan thuricin 7'yi tanımlamıştır. Bu sonuçlar daha önce *B. cereus*, Bc 7 tarafından üretilen bakteriyosin olan Cerein 7 için bildirilenlerle benzerdir, ancak daha önce thuricin, tochicin ve Cerein için bildirilenlerden farklıdır. Bunların tümü, erken logaritmik büyüme evresinde tespit edilen aktivitelere sahiptir ve sabit faz esnasında azalmıştır. Thurisin 7, proteinaz K'ya karşı aktif değildir, 3-9 pH aralığında stabildir ve ısıya nispeten dirençlidir. Kalan aktivitesi 90°C ve 98°C'de

30 dakika sonra sırasıyla yaklaşık %90 ve %55 iken, 121°C'de 20 dakika sonra inhibitör etki tamamen ortadan kalkmıştır. Thuricin 7, bilinen dört bakteriyosin üreticisinden üçüne, *B. thuringiensis* HD2 ve HD868 dahil olmak üzere test edilen *Bacillus cereus* suşlarının yanı sıra yanı sıra *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes* ve *Streptococcus pyogenes*'e karşı antagonistiktir. LAB ve Gram negatif bakterilere karşı aktivite gözlenmemiştir. Thuricin 7 inhibitör spektrumu Cerein 7'ninkine benzerdir, ancak yakından ilişkili suşlara karşı sınırlı spektruma sahip olan thuricin, tochicin ve cerein ile karşılaştırıldığında spektrumu oldukça geniştir.

Thuricin CD Trn-C ve Trn-B olmak üzere iki peptitten oluşmaktadır (Hill, Rea, and Ross 2008). Trn-C yaklaşık 2763, Trn-B ise yaklaşık 2861 moleküler kütleye sahiptir. Bu bakteriyosin yaklaşık 85°C'ye kadar ısıya dayanıklıdır, ancak aktivite 90 °C'de azalmakta ve 100°C'de 15 dk inkübasyondan sonra tamamen kaybolmaktadır. Supernatant (CFS) proteolitik enzimlere (pepsin, tripsin, peptidaz, C-kimotripsin tip V111, C-kimotripsin tip 11 ve proteinaz K) duyarlıdır. Thuricin CD pH 2 ila 10 aralığında aktiftir. En yüksek Thuricin CD konsantrasyonları, sporulasyonun başlamasıyla aynı zamana denk gelen geç log ve gelişimin durağan evrelerinde oluşmuştur. Büyümenin durgun evresi sırasında, aktivite sabit kalmıştır. CFS, *B. cereus*, diğer *B. thuringiensis* suşları, *B. mycoides* ve *B. firmus* gibi yakından ilişkili *Bacillus* türlerini inhibe ederek, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı dar bir inhibisyon spektrumu göstermiştir; *B. subtilis* veya *B. coagulans*'a karşı hiçbir inhibisyon tanımlanmamıştır. *Clostridium sp* içinde *C. difficile* ribotip 027 (NCTC 13366) dahil olmak üzere test edilen tüm *C. difficile* izolatları, geniş inhibisyon bölgeleri ile CSF'ye karşı aşırı duyarlıdır. *C. tyrobutyricum*, *C. lituseburense* ve *C. indolis* de inhibe edilmiştir, buna karşın test edilen diğer *Clostridium* türleri inhibe edilmemiş veya sadece zayıf bir şekilde inhibe edilmiştir. Test edilen diğer Gram pozitif patojenler arasında, yalnızca *Listeria monocytogenes* Thuricin CD'sine duyarlıdır. Thuricin CD'si, *C. difficile* ile ilişkili diyare tedavisi için Alimentaryary Pharmabiyotik Merkezi (APC) tarafından Eylül 2009'da İrlandalı bir biyoteknoloji işletmesi olan Alimentaryary Health Ltd.'ye lisanslanmıştır. (<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=200906865> (37)).

Cherif ve diğerleri (Ameur Cherif et al. 2008) *Bacillus thuringiensis* subsp *entomocidus* tarafından üretilen başka bir bakteriyosin keşfetmiştir. Entomosin 110

olarak adlandırılan antibakteriyel aktivite, logaritmik büyüme fazının ortasından başlayarak üretilmiştir ve erken ve durağan fazlar sırasında artmıştır. Kültür süpernatantından ekstrakte edilen bakteriyosinin, *Listeria monocytogenes*, *Paenibacillus* larvaları ve diğer *Bacillus* türleri dahil olmak üzere çok sayıda Gram pozitif bakteriyi inhibe ettiği ve Entomocin 110'un ayrıca ısıya dayanıklı ve pH değişikliklerine ve kimyasal çözücülere karşı dirençli olduğu bulunmuştur. Proteinaz K ile muameleden sonra, inhibitör aktivite tamamen ortadan kaldırılmış ve 4.8 kDa'lık bir moleküler ağırlık bulunmuştur.

Bideshi vd. (Barboza-Corona et al. 2007b) Meksika'da beş adet *B. thuringiensis* suşundan bakteriyosin benzeri peptit inhibitör maddelerinin (Bt-BLIS) üretildiğini bildirmiştir. Morricin 269 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269)'den; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287)'den kurstacin 287; *B. thuringiensis* subsp. *Kenya* (LBIT 404) tarafından üretilen kenyacin 404; *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* (LBIT 420) tarafından üretilen entomocin 420; ve *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* (LBIT 524)'nin ürettiği *tolworthcin* 524 olarak isimlendirilmiştir. Bt-BLIS, farklı biyofiziksel ve biyokimyasal özelliklerine göre iki gruba ayrılmıştır: Morrisin 269 ve kurstacin 287'yi içeren A Grubu, ve kenyacin 404, entomocin 420 ve tolworthcin 524'ü içeren Grup B. Isıl işlem altında, Bt-BLIS formülasyonları nispeten stabil kalmıştır. Morricin 269 ve kurstacin 287 (Grup A), 80°C'ye kadar olan sıcaklıklarda stabiliteleri nedeniyle termotolerant olarak kabul edilmiştir. B Grubu üyeleri (kenyacin 404, entomocin 420 ve tolworthcin 524), 121°C'ye kadar olan sıcaklıklarda aktivitelerinden dolayı ısıya dayanıklı olarak adlandırılmıştır. Kısmen saflaştırılmış inhibitör proteinler, geniş bir pH aralığında (5-11) mükemmel stabilite sergilemiştir: PH 5'te, morrisin 269 ve kurstacin 287, *B. cereus*'a karşı inhibitör etkiyi korumuş, ancak pH 9'da etkinliklerinin yalnızca yaklaşık %40'ı kalmıştır. pH 5'te, kenyacin 404, entomocin 420 ve tolworthcin 524 önemli aktivite sergilemiş, ancak pH 11'de aktivitelerinin %80'ini koruyarak Grup A'dakilerden daha stabil kalmıştır. BLIS'in moleküler ağırlığı 10 KDa'dır. Durağan fazın başlangıcında bakterisidal aktivite grubu A (morricin 269 ve kurstacin 287), bu aşamanın sonunda pik seviyeleri ile, Grup B (kenyacin 404, entomocin 420, tolworthcin 524) Bt-BLIS'in bakterisidal aktivitesi logaritmik fazda alınan örneklerde görülmüş ve durağan dönemin başlangıcında pik yapmıştır. Sadece iki bakteri, *B. cereus* ve *B.*

thuringiensis, Grup A Bt-BLIS tarafından inhibe edilmiştir. *B. subtilis*, *Listeria* türleri, *E. faecium* ve *S. aureus* 'a karşı etkisiz kalmıştır. Grup A, incelenen gram negatif basiller arasında yalnızca *V. cholera* 'ya karşı etkili olmuştur. Grup B için *L. monocytogenes* ve *S. aureus* dışında test edilen tüm gram pozitif bakterilere karşı bakterisidal aktivite tespit edilmiştir. A Grubu Bt-BLIS'de olduğu gibi, B Grubunun üyeleri *V. cholera*'ya karşı aktif olmuş, ancak *E. coli*, *S. typhi*, *S. Xexneri*, *S. sonnei* ve *P. aeruginosa* dahil olmak üzere diğer gram-negatif bakterilere karşı aktif olmamıştır.

Diğer bir çalışmada Paik vd. (Paik et al. 1997) *B. thuringiensis* subsp. *tochigiensis* HD868 tohicin üreticisi olarak tanımlanmıştır. Bu kısmen saflaştırılmış tohicin, test edilen 20 tipik *B. thuringiensis* suşu ve bir *B. cereus* suşuna karşı dar bir antibakteriyel aktivite aralığı sergilemiş, ancak test edilen diğer bakteri veya mayalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Bu tohicin, proteinaz K'ya duyarlıdır, yüksek bir pH stabilitesine (pH 3.0-9.0) sahiptir ve 90°C'de bir dereceye kadar ısıya dayanıklıdır, 100°C'de 30 dakika boyunca aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Tohicin aktivitesi log-orta büyüme fazında keşfedilmiştir. Aktivitenin erken durağan fazda arttığı, ancak durağan fazdan sonra azaldığı fark edilmiştir. Tohicin, yaklaşık 10.5 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir.

Bunlara ilave olarak Uğraş vd. (Ugras et al. 2013) fındık zararlısı bir böcekten izole ettikleri *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Bn1 (Bt-Bn1)'den Thuricin Bn-1 elde etmişlerdir. Bu inhibitör madde logaritmik fazın başlarından sonuna kadar olan sürede üretilmiştir. Proteinaz K'ya duyarlı olan Thuricin Bn'in 3 kDa moleküler ağırlığında ve pH 6-8 arasında stabil olduğu gösterilmiştir.

Yukarıda verilen çalışmalarda da görüldüğü gibi, farklı *B. thuringiensis* suşlarından farklı fiziko kimyasal özelliklere sahip ve farklı spektrumda antimikrobiyal aktivite gösteren bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri maddeler tanımlanmıştır. Bu tez çalışmasında ise koleksiyonumuzda bulunan ve zeytin alanlarından toplanıp karakterize edilmiş *B. thuringiensis* suşlarının bakteriyosin benzeri madde üretim potansiyelleri araştırılmıştır.

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Antibakteriyal Aktivitede Kullanılan İndikatör Suşlar

Çalışmada indikatör suşu olarak kullanılan *Bacillus cereus* 11778 ATCC'den; *Bt* subsp. *kurstaki*, *Bt* subsp. *aizawai*, *Bt* subsp. *tenebrionis*, *Bt* subsp. *israilensis*, *Bt* subsp. *dakota* 4R2, Bacillus Genetic Stock Center (Ohio, USA)'den; *Bt* subsp. *finitimus*, *Bt* subsp. *galleriae*, *Bt* subsp. *thompsoni*, *Bt* subsp. *morrisoni* Ege Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümünden; *Listeria spp.*, *Candida albicans* Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümünden elde edilmiştir. Diğer Gram pozitif ve Gram negatif suşlar MSKÜ, Eğitim Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümünden elde edilmiştir. Bütün indikatör suşlar, besiyerleri ve sıcaklık koşulları Tablo 2.1 de verilmiştir.

Tablo 2.1. indikatör bakteriler

Suşların adı	Kod. Numarası	Besiyeri	Sıcaklık °C
Gram pozitif			
<i>Bt</i> subsp. <i>finitimus</i>	BGSC 4B1-4B2	NA	30
<i>Bt</i> subsp. <i>tenebrionis</i>	BGSC 4AA1	NA	30
<i>Bt</i> subsp. <i>galleriae</i>	BGSC 4G1-4G6	NA	30
<i>Bt</i> subsp. <i>thompsoni</i>	BGSC 4Q1	NA	30
<i>Bt</i> subsp. <i>morrisoni</i>	BGSC 4K1-4K3	NA	30
<i>Bt</i> subsp. <i>dakota</i>	BGSC 4R2	NA	30
<i>Bt</i> subsp. <i>azawai</i>	BGSC 4J3	NA	30
<i>Bt</i> subsp. <i>kurstaki</i>	BGSC 4D1	NA	30
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	TSA	28

<i>Listeria spp.</i>	Gıda izolatı	BHI	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538/P	NA	37
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	NA	30
<i>Micrococcus luteus</i>	NRRLB-4375	TSB	37
Gram Negatif			
<i>Eschreischia coli DH5a</i>		NA	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 29212	NA	37
<i>Eschreischia coli</i>	ATCC 11230	NA	37
Fungal			
<i>Candida albicans</i>	90026	PDA	33

2.1.2. Besiyerleri

2.1.2.1. Trypto-casein soy broth (TSB)

TSB hazırlanırken 30 gr tartılıp 1 litre distile su ile çözülmüştür. Daha sonra otoklavda 121°C 15 dakika sterilizasyon işlemi uygulanmış ve 24 saat 37°C inkübe edilmiştir. Hazırlanan TSB, Bt ve bazı indikatör suşların büyütmesinde kullanılmıştır. Aynı besiyerine agar agar 15 gr eklenerek katı besiyerine dönüştürülmüş ve steril edildikten sonra petrilere dökülmüştür. Bakteriyosin benzeri madde üretim denemelerinde, Bt ve bazı indikatör suşların büyütmesinde kullanılmıştır.

2.1.2.2. Nutrient broth (NB)

Sekiz gram NB 1 litre distile su ile çözülmüştür. Sterile edilmesi için 121°C 15 dakika otoklavlanmış ve steril edildikten sonra 24 saat 37°C de inkübe edilmiştir. Bazı indikatör suşların büyütmesi için kullanılmıştır. NA hazırlanmasında ise 1 litre NB'ye 15 gram agar agar eklenmiş ve steril edildikten sonra 37 °C de 24 saat inkübe

edilip 4°C’de saklanmıştır. Stok hazırlaması ve bazı indikatör suşların büyütmesinde kullanılmıştır.

2.1.2.3. *Luria Bertani Broth (LB)*

LB’den 25gr tartılıp 1 litre distile su ile çözülmüş, Otoklavda 121°C 15 dakika steril edilmiştir. Steril edildikten sonra 37°C’de 24 saat inkübe edilmiş ve stok hazırlanmasında kullanılmıştır. LB agar hazırlamak için ise aynı besiyerine 15 gr agar agar ilave edilmiş ve steril edildikten sonra 37 °C de 24 saat inkübe edilip 4°C’de saklanmıştır.

2.1.2.4. *Mueller Hinton Broth (MHB)*

MHB’den 21 gr alınıp 1litre distile su ile çözülmüştür. Steril etmesi için 121°C 15 dakika otoklavlanmıştır. Steril edildikten sonra 24 saat 37°Cde inkübe edilip 4°Cde saklanmıştır. MHA agar hazırlamak için ise aynı besiyerine 15 gr agar agar ilave edilmiş ve steril edildikten sonra 37 °C de 24 saat inkübe edilip 4°C’de saklanmıştır. İndikatör bakteri büyütmesi için kullanılmıştır.

2.1.2.5. *Brain Heart Infusion Broth (BHI)*

37 gr BHI 1 litre distile su ile çözülmüştür. Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilerek 37 °C 24 saat inkübe edilmiştir. BHI agarı ise aynı besiyeri bir litrede 15 gr agar aga eklenmiş ve steril edildikten sonra, 37 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. *Listeria spp.* ve *Candida albicans* büyütmesi için kullanılmıştır.

2.1.2.6. *Potato Dextrose Agar (PDA)*

39 gr PDA 1 litre distile su ile çözülmüştür. Steril etmesi için 121°C 15 dakika otoklavlanmış ve 37°C 24 saat inkübe edilmiştir. *Candida albicans* büyütmesi için kullanılmıştır.

2.1.3. Tampon Çözeltiler

2.1.3.1. Enzim solüsyonları (10 mg/ml)

Proteinaz K 10 mg alınıp 1 ml distile su ile çözülmüştür. 0.22mm filtreden geçirilmiş ve -20' de saklanmıştır.

Trypsin 10 mg alınıp 1 ml distile su ile çözülmüştür. 0.22mm filtreden geçirilmiş ve -20' de saklanmıştır.

α -amilaz 10 mg alınıp 16mM PH 6 Na- asetat ile çözülmüştür. 0.22 mm filtreden geçirilmiş ve -20 de saklanmıştır.

Lipaz 10 mg alınıp 1ml 1M PH 8.0 Tris- HCL ile çözülüp 0.22 mm filtreden geçirilmiş ve -20 de saklanmıştır.

2.1.3.2. Na- asetat tamponu

16 mM Na- asetat pH 6.0, 0.21 gr Na-asetat pH 6 ayarlamak için 0.091 ml asetik asit kullanılarak 100 ml'ye kadar distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.3.3. SDS – PAGE için kullanılan tampon ve solüsyonlar

Monomer solüsyonu: 6 gr akrilamid, 0.16 gr bis-akrilamid, 20ml olacak şekilde distile su ile çözündürülerek 4°C de saklanmıştır.

4X Running jel tamponu (1.5M PH 8.8): 9.075 gr Tris 20 ml distile su ile çözündürülerek HCL ile 8.8 ayarlanıp distile su ile 50 ml e kadar tamamlanmıştır.

4X stacking jel tamponu (0.5M PH 6.8): 3 gr Tris 20 ml distile su ile çözündürülerek HCL ile 6.8 ayarlanıp distile su ile 50 ml'e kadar tamamlanmıştır.

%10 APS: 1.0 gr APS den alınarak 1ml de distile su ile çözündürülmüştür. Bu çözelti taze hazırlanmalıdır.

%10 SDS: 10 gr SDS, 100 ml ile distile su ile çözündürülmüştür.

Tank buffer: 3.02 gr Tris, 14.41 gr glisin, 1 gr SDS, 1000ml'e distile su ile çözündürülmüştür.

Fiksasyon çözeltisi (%5 asetik asit): 5 ml asetik asit, 100 ml'e distile su tamamlanmıştır.

Jel boyası: 1.5 gr Coomassie Brilliant Blue, 225 ml metanol, 50 ml asetik asit, 500 ml'e kadar distile su ile tamamlanmıştır.

Destaining çözeltisi: 10 ml asetik asit, 25 ml methanol, 100 ml'e kadar distile su ile tamamlanmıştır.

Jel overlay assay için fiksasyon çözeltisi : %25 izopropanol için 125 ml izopropanol, %10 asetik asit için 50 ml asetik asit alınıp 500 ml'ye kadar distile su ile tamamlanmıştır.

4X native sample buffer: 4ml Tris- HCL 0.5 M PH 6.8, 4 ml gliserol, 4mg bromofenol 10 ml distile su ile çözölmüştür.

2.1.3.4. Antimikrobiyel aktivite için çözelti

Normal salin: 0.9 gr NaCl, 100 ml distile su ile çözönmüştür.

0.5 McFarland: 0.05 ml %1 BaCl₂.2H₂O, 10 ml'ye H₂SO₄ ile tamamlanmıştır.

1 McFarland: 0.1 ml %1 BaCl₂.2H₂O, 10 ml'ye H₂SO₄ ile tamamlanmıştır.

2.1.3.5. 20 mM Tris-HCl Tamponu

1.211 gr Tris, 400 ml distile su ile çözönmüş, PH'sı HCL ile ayarlanıp 500 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.4. Kullanılan Cihazlar

Thermal cycler PCR (Blue Ray Biotech, TCL9T620), Otoklav (Hirayama Hv-50L), Soğutmalı Santrifüj (Nüve NF 1200R ve NF800R), Mikro Santrifüj (Hettich mikro200 ve Thermo), Etüv (Nüve EN500), Çalkalamalı Su Banyosu (GFL1003),

Terazi (Denver Instrument), Isıticılı Manyetik karıştırıcı (IKA RH Basic 2 ve wisestir msh-20A), Spektrofotometer (Thermo Scientific), Transilluminator (FRONT), Agaroz Elektroforez Cihazı (Thermo EC320), SDS-PAGE Eleltroforez Cihazı (ATTO), Distile Su Cihazı (GFL2004), 3.5K MWCO, 16mm Dialysis Tubing (Thermo Scientific).

2.1.5. Kullanılan Besiyeri Ve Kimyasallar

Trypton Soy Broth (Merk ve Biokar), Mueller Hinton Broth (Biokar), Agar Agar (Oxoid), Commassie Brillentblue R-250, Gliserol, Tripsin, Amonyum persülfat, TEMED, Bisakrilamid, Amonyum sülfat, Sodium asetat (Applichem), Proteinaz K, α -amilaz, lipaz, Akrilamid, Triton X-100, Glisin (Sigma), Tris-Base (NZYTech), İzopropanol, Etanol, SDS, Potatoes Dextrose Agar, Yeast Extract, Nutrient Broth, HCL, NaOH, (Merck), Agaroz (Sigma), Aseton (Tek-PATH), NaCl, Metanol (Iso Lab), Protein Marker, Dream Taq Green PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific). Brain Heart infusion (BHI) (LAB049), Asetik asit (Riedeldeltaen).

2.2. Yöntem

2.2.1. Bt Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmada koleksiyonumuzda bulunan Bt suşlarını tekrar canlandırmak için bütün suşlar Nutrient agar'a ekilerek gece boyunca 30°C inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında üreyen tek bir koloni alınıp LB broth'a inoküle edilmiştir. 24 saat 30°C'de inkübasyonun ardından üreyen kültürden 250 µl alınarak eşit hacimde %50 steril gliserol ile stokları hazırlanmıştır. Stoklar -20 °C ve -80 °C'de saklanmıştır.

2.2.2. Agar Spot Assay

Bt suşların antimikrobiyel madde üretimi araştırılırken indikatör bakteri olarak *Bacillus cereus* 11778 (ATCC) suşu kullanılmıştır. TSA (Tryptic Soy agar) petrilere steril öze ile çizgi ekimler yapılarak 28 °C' de bir gece inkübe edilmiştir.

Ertesi gün, bir tane koloni alınıp 5 ml TSB (Tryptic Soy Broth)' ye eklenip 28°C de su banyosunda 4-5 saat bırakılarak, 2µl kültürden alınıp TSA 'ın üzerine nokta olarak eklenip bir gece 28°C'de inkübe edilmiştir

Bt Ertesi gün indikatör suşu *B. cereus* ise TSB'de 4-5 saat kadar büyütülmüş ve OD'si 0.2-0.3 (1×10^9 cell/ml) ulaştıktan sonra soft agar'a (TSA 0.7%) 100 µL eklenmiştir. TSA petrilerindeki kültürlerin üzerine indikatör suşu içeren soft agar yaklaşık 10 ml dökülmüştür. Döküldükten sonra donmaya bırakılıp inkübasyonda bir gece beklemiştir. İnkübasyondan sonra suşların petrideki kültürleri etrafında oluşan zonlara göre değerlendirme yapılmıştır (Barboza-Corona et al. 2007b; A. Cherif et al. 2001)

2.2.3. Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi

Antibakteriyel aktivite ön tarama yöntemi olan *agar spot assay* sonucu seçilen 17 adet Bt suşu 3ml TSB broth içinde 24 saat büyütülmüş, sonra kültür sıvıları 8000 × g de 10 dakika, 4°C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra, kültür süpernatantları şırıngalarla çekilerek 0.45 µm por çaplı, steril membran filtreden süzölmüş ve steril ependorf tüplere toplanmıştır. Süzölmüş süpernatant (CSF) -20°C'de veya 4°C'de saklanmıştır. İndikatör suş *B. cereus* kültüründen 50µl (1×10^9 hücre/ml) alınıp 25 ml'lik soft agara eklenerek steril petrilere dökülmüştür. Soft agar katılaştıktan sonra, 5-7 mm çaplı steril sarı tip ile kuyucuk açılmıştır.

Daha sonra oluşan rutubet mikro pipet ile çekilmiş, tam rutubetinden kurtulmak için 37 °C de 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonra kuyucuklar içerisine 90 µl süpernatant koyulmuş ve 4°C'de 22 saat bekletildikten sonra 28°C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra oluşan zonların çapları ölçölmüştür (Izquierdo et al. 2008; Rogers and Montville 1991). Sonuç olarak, 100 izolattan antibakteriyel aktivite spektrumu en geniş olan 28Q1 kodlu suş bakteriyosin benzeri madde üretimi ve karakterizasyonunda çalışılmak üzere seçölmüştür.

2.2.4. Bakteriyosin Benzeri Maddenin Üretim Kinetiklerinin İncelenmesi

Bakteriosinlerin üretim kinetiklerini incelemek için seçilmiş suş (28Q1) 5 ml'lik TSB içinde 28°C de 2-4 saat inkübe edilmiştir. Bakteri yoğunluğu 0.1(OD 600nm) oluncaya kadar (erken logaritmik faz) çalkalamalı su banyosunda inkübasyona devam edilmiştir. OD 0.1'e ulaştınca erlenlerdeki 100 ml TSB besiyerine kültürden 250µl alınarak ekim yapılmış ve 28 °C'de 3 gün inkübe edilmiştir. Duplike örnekler her 4 saatte bir (4, 8, 12, 16,20, 24, 30, 42, 54, 66, 78, 93) alınmıştır. İnkübasyon periyodu boyunca 3'er ml 2 adet kültür alınmış ve 2 ml 600 nm'de hücre büyümesinin spektrofotometrik olarak gözlenmesinde kullanmıştır. Diğer 1 ml 'si 8000xg 10 dakika 4°C de santrifujlenmiştir. Elde edilen süpernatant (CFS) 0.45mm filtreden geçirilmiş ve bütün filtre edilen CSF buz dolabında 4 °C'de saklanmıştır. Sonra filtre edilen CFS'ların 2 kat olacak şekilde (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyonlardan 90 µl alınarak indikatör bakteri *B.Cereus* içeren soft TSB petrilerindeki kuyucuklara eklenmiştir. Difüzyon için 22 saat 4°Cde bıraktıktan sonra 28°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Bakteriyosin aktivitesi, en son zonun görüldüğü (2mm) dilüsyon 1000 ile çarpılıp 90 µl'ye bölünerek mililitredeki AU/ml olarak tespit edilmiştir. Deneyler en az iki defa tekrarlanmış ve ortalaması verilmiştir.

2.2.5. Bakteriosin Benzeri Maddenin Karakterizasyonu

En yüksek bakteriosin üretiminin ve aktivitesinin görüldüğü zaman periyodunda 28Q1 suşu TSB'de kültüre alınmıştır. Elde edilen kültür sübernatantları (CFS) filtre edildikten sonra farklı sıcaklık, pH, besi yeri, enzimler, ve organik çözücülerin etkisi incelenmiştir. Bütün çalışmalar en az 2 defa tekrar edilmiş ve sonuçları ortalama olarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Kalan aktivite} = B \times 100 / K \quad (0.1)$$

B = işlem görmüş supernatantın oluşturduğu zon çapı

K = kontrol zon çapı (işlem görmemiş supernatant)

2.2.5.1. Farklı sıcaklık değerlerinin bakteriyosin üzerine etkisi

Bt 28Q1suşu en yüksek bakteriyosin aktivitesinin görüldüğü 8 saat boyunca büyütülmüştür. Kültürden 100 ml alınarak steril ependorfların her birinde 300 µl koyularak +4 °C de santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı (CFS) alınarak 0.45µl'lik filtreden geçirilmiştir. CFS farklı sıcaklıklarda (30, 50, 70, 100 °C) 30 dakika ve 2 saat ısıtıcı blokta inkübe edilmiştir. 120 °C için ise 15 dk otoklavlama işlemi uygulanmıştır. Oda sıcaklığına ulaşana kadar buz üzerine bırakılmıştır. İndikatör bakteri *B.cereus* 11778 (50 µl), 25 ml soft TSB ile karıştırılarak petriye dökülmüş ve katılaşması beklenmiştir. Sonra kuyucuklar açılmış ve işlem görmüş CSF 2 kat dilüsyon yapılarak (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) her birinden 90 µl kuyucuklara eklenmiştir. Difüze olması için +4 °C buzdolabında 22 saat bırakılmış ve 28°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra aktivitelere bakılmıştır.

2.2.5.2. Farklı pH değerlerinin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Farklı pH değerlerinin kültür süpernatantı (CFS) aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla CFS' nin pH'sı değiştirilmiş ve 5 ve 1 M' lik tamponları hazırlanmıştır. pH değeri 3, 4, 5, 6 ayarlamak için HCL kullanılmış; pH 7, 8, 9,10 ayarlamak için ise NaOH kullanılmıştır. CSF'in pH kararlılığı 30 dakika buz üzerinde bekledikten sonra 2 kat dilüsyon (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) yapılarak tespit edilmiştir. Kuyu difüzyon metodu kullanılarak 50 µl indikatör bakteri *B.cereus* içeren soft TSB agar petrilere dökülmüştür. Her petride 6 tane kuyucuk açılmıştır. İşlem görmüş ve dilüsyon edilmiş CSF'den 90 µl kuyucuklara eklenmiştir. 28 °C de 24 saat inkübe edildikten sonra zonların çapları ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak pH'sı değiştirilmemiş CFS kullanılmıştır.

2.2.5.3. Bazı organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Bazı organik çözücülerin kültür süpernatantı (CSF) aktivitesi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Bunun için %10 Aseton, %10 Etanol, %10 Metanol, %10 Triton-x-100, ve %10 DMSO kullanılmıştır. CFS organik çözücülerle muamele edildikten

sonra oda sıcaklığında bir saat bekletilerek 2 kat dilüsyon (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) yapılmıştır.

Kuyu difüzyon metodu kullanarak 50 µl indikatör bakteri *B. cereus* içeren soft TSB agar petrilere dökülmüştür. Her petride 6 tane kuyucuk açılmıştır. İşlem görmüş ve dilüsyon yapılmış CSF' den 90 µl kuyucuklara eklenmiştir. 4 °C' de 22 saat bırakılmış ve daha sonra 28 °C de 24 saat inkübe edilerek zon çapları ölçülmüştür. Organik çözücüler distile su ile negatif, CSF içermeyen organik çözücü örnekleri ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

2.2.5.4. Farklı besiyerlerin bakteriosin aktivitesi üzerine etkisi

Bt 28Q1 suşu farklı besiyerleri olan NB ve MHB'de 28 °C'de büyütülmüştür. Bunun için 28Q1 suşu 5 ml TSB'de büyütülerek 250 µl inoküle olarak alınmış ve 100 ml'lik NB ve MHB besiyerine eklenmiştir. Daha sonra 28°C'de 24 saat su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodu boyunca her 8 saat 1'er ml 2 adet kültür alınarak 1 ml 'si 600 nm'de hücre büyümesinin spektrofotometrik ölçümü için kullanılmıştır. Diğer 1 ml ise 8000 xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir ve elde edilen CSF 0.45 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Antimikrobiyel aktivitesine bakmak için agar kuyu difüzyon metodu kullanmıştır. Soft agar (% 0.7) içeren 25 ml TSB, 50µl *B. cereus* ile karıştırılarak petriye dökülmüştür. Petri içerisindeki agar üzerinde 5-7mm çapında kuyucuklar açılmış ve rutubet uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 37°C de 15 dakika inkübe edilmiştir. Filtre edilen CSF 2 kat (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) dilüsyon yapılarak kuyucuklara eklenmiş 22 saat 4°C'de buzdolabına bırakılmıştır. Daha sonra petriler 28 °C de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan zonların çapı ölçülmüştür.

2.2.5.5. Farklı enzimlerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Kültür süpernatantının (CSF) aktivitesi üzerine çeşitli enzimler kullanılmıştır. CSF Proteinaz K, Lipaz, Tripsin, α-amilaz ile son konsantrasyon 1mg/ml olacak şekilde 37 °C'de 2 saat su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra muamele edilen CSF'den 2 kat dilüsyon (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) hazırlanmıştır. 50 µl indikatör bakteri *B. cereus* içeren soft TSB agar petriye dökülülerek 6 tane kuyucuk

açılmıştır. 90 µl muamele ve dilüsyon edilmiş CSF'lerden kuyucuklara eklenmiş ve 4°C de 22 saat bırakılıp 28°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra zon çapıları ölçülmüştür. Muamele edilmemiş CSF pozitif kontrol, tek başına enzim kullanılarak gerçekleştirilen işlemler negatif olarak kullanılmıştır.

2.2.6. Bt 28Q1 Suşunun 16S rDNA Ve hag Geniyle PCR Analizi

Bakteri suşu 28Q1'den kaynatma yöntemiyle DNA izole edilmiştir. DNA izolasyonu için 1.5 ml bakteri kültürü 28 °C' de 18 saat çalkalamalı su banyosunda büyütülmüş ve 9000 x g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen pellet 200 µl distile su ile çözündürüldükten sonra 15 dakika kaynatılıp 13000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Genomik DNA süpernatant olduğu için süpernatant alınıp temiz ependorf tüpüne aktarılmış ve PCR deneyinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.7. 16S rDNA ve hag Geni Analizi

Bt 28Q1suşundan genomik DNA elde edildikten sonra 16S rDNA geni Forward (F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3' ve Reverse (R) : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 10 mM primerleri, hag geni ise F: 5'-ATGAGCAATTCTATGGACCG-3' ve R: 5'TTTCAGACATTTCTTTCGCC-3' 10mM primerleriyle çoğaltılmıştır (la Cruz D et al. 2018); (León-Galván et al. 2009). Bu primerler MacroGen Europe firması tarafından sentezlenmiştir. Bt subsp. *kurstaki* (4D1)'den elde edilen DNA pozitif kontrol, DNA içermeyen PCR reaksiyonu ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonu için Dream Taq enzimi (Thermo scientific PCR master mix 2x) kullanılmış olup her bir reaksiyon 12.5 µl master mix, 0.5 µl forward primer (10 mM), 0.5 µl reverse primer (10 mM), 3 µl DNA, 8.5 µl ddH₂O 'nu içermektedir.

*16S rDNA geni için PCR programı aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Ön denaturasyon: 95°C'de 5 dakika; denaturasyon: 95°C'de 1 dakika; bağlanma: 60°C'de 1 dakika; uzama: 72°C 2 dakika; son uzama: 72 °C'de 10 dakika olarak gerçekleştirilmiş ve 30 döngüde ilgili gen çoğaltılmıştır.

**hag* geni için PCR programı aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Ön denaturasyon: 95°C’de 5 dakika; denaturasyon: 95°C’de 1 dakika; bağlanma: 48°C’de 2 dakika; uzama: 72°C’de 2 dakika; Son uzama: 72°C’de 7 dakika olarak uygulanmış ve *hag* geni 30 döngüde çoğaltılmıştır.

Her PCR ürününden alınan örnekler hazırlanan % 1 agaroz jelde 100 voltta 30 dakika yürütülmüş ve jel dokümantasyon sistemi (Vilber Lourmat) ile görüntülenmiştir. O’GeneRuler 10 kb DNA Ladder moleküler ağırlık marker’ı olarak kullanılmıştır. PCR ürünleri DNA sekansı için DNA sekanslayıcı firmaya gönderilmiş, elde edilen sekanslar NCBI’da yer alan BLAST programı ve BioEdit kullanılarak analiz edilmiştir.

2.2.8. Bakteriyosin Benzeri Maddenin Kısmi Pürifikasyonu

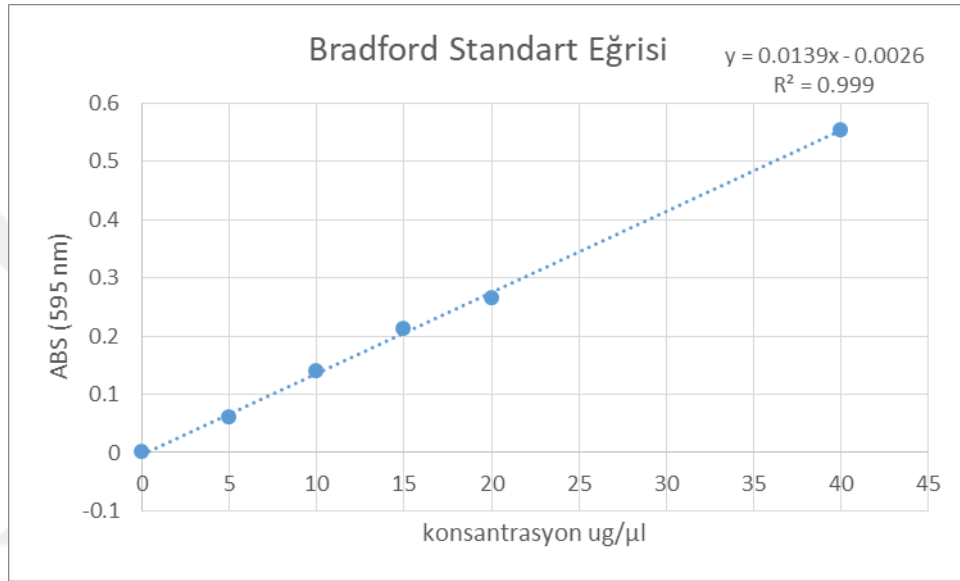
En yüksek bakteriyosin benzeri madde üretiminin ve aktivitesinin görüldüğü zamanda Bt suşu 28Q1 100 ml’lik TSB’de kültüre alınmıştır. Bakteri kültürü 8000x g’de 4°C’de, 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant elde edilmiştir. Gerekli miktarda amonyum sülfat ezilerek süpernatanta her 15 dakikada bir 1 saat boyunca buz üzerin’e manyetik karıştırıcı ile karıştırarak eklenmiştir. Kültür süpernatantları amonyum sülfatla %80, %70 ve %60 saturasyona 4°C’de gece boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırarak konsantre edilmiştir.

Daha sonra, örnekler 8000x g’de, 4°C’de 30 dakika santrifüjlenmiş ve uygun miktarda 20 mM Tris-HCL (pH 7) tamponunda çözülmüş ve 2 litrede 4°C’de 6 saat boyunca mini diyaliz kiti (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 3.5K MWCO, 16 mm, Thermo Science) kullanılarak aynı tampona karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz edilen bakteriyosin benzeri protein preperasyonu (BBPP) 0.45 µm’lik filtreden geçirilmiş ve küçük miktarlara bölünerek -20 °C’de saklanmıştır.

2.2.9. Bradford Assay

Örneklerin protein konsantrasyonu Bradford assay ile tayin edilmiştir. Protein (BSA) 2 mg/ml konsantrasyonu (2.5 µl, 5µl, 7.5 µl, 10 µl, 40 µl) standart olarak kullanmış,

BSA konsantrasyonları 2'şer ml Bradford boyası ile tamamlayarak 595 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Sonuca göre eğri grafiği hazırlanmıştır. Daha sonra diyaliz edilen proteinden 50 µl alınıp 2 ml olacak şekilde Bradford boyasına eklenip karıştırılarak 30 dakika boyunca karanlık ortamda beklenmiştir. Bekleme süresi bittikten sonra 595 nm'de absorbansı ölçülmüş konsantrasyonu bilinmeyen protein hazırlanan eğri grafiği ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır.



Şekil 2.1. Protein konsantrasyonu testinin Bradford standart eğrisi.

2.2.10. Saflaştırılmış Protein Aktivitesinin Antimikrobiyal Spektrumu

Kısmi olarak saflaştırılmış bakteriosin benzeri protein preparasyonunun (BBPP) etki spektrumunu belirlemek amacıyla, *agar kuyu difüzyon* metodu kullanarak Gram (+) ve Gram (-) toplam 16 adet bakteriye karşı antimikrobiyal aktivite denenmiştir. Bunun için 25 ml soft agar (%0.7) içeren MHB, 0.5 McFarland yoğunluğunda indikatör bakteri veya fungus (Tablo2.1) ile karıştırılıp petriye dökülmüş ve katılaşması beklenmiştir. Steril sarı tip ile kuyucuklar açılmış ve rutubetin uzaklaştırılması için 15 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Birbiriyle kıyaslanması için 50 µl BBPP ve 90 µl süpernatant (CFS) alınıp kuyucuklara eklenmiş ve sonra 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. *B. cereus* indikatör suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

2.2.11. Ultrafiltasyon

Bakteriyosin benzeri protein preparasyonunu konsantre etmek amacıyla ultrafiltasyon uygulanmıştır. Bu amaçla 10.000 MWCO büyüklüğünde ultra filtrasyon membranı (Vivaspin 500, Sartorius) kullanılmıştır. BBPP 100-500 µl ultra filtrasyon tüplere yüklenip 12.000 rpm 5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst (konsantrat) ve alt (filtrat) sıvıların aktivitesini tespit etmek için *agar kuyu difüzyon* metodu uygulanmıştır. Bunun için, 25 ml soft agar (%0.7) içeren TSB, 50µl indikatör bakteri *B. cereus* ile karıştırılmış ve petriye dökülmüştür. Açılan kuyucuklara 50 µl konsantrat veya 50 µl filtrat eklenmiştir. Konsantre edilmeyen bakteriyosin kontrol olarak kullanılmıştır.

2.2.12. SDS-PAGE ve Jel Overlay Assay

Eşit miktardaki BBPP örnekleri Laemmli tamponunda 2 adet %15 SDS-PAGE'e yerleştirilerek elektroforeze tabi tutulmuştur (Laemmli 1970). Moleküler ağırlık için hazırlanan jelde BBPP örneği kaynatılmış; fakat jel overlay assay için hazırlanan jelde kaynatılmamıştır çünkü BBPP'nin 50°C'de aktivitesini kaybettiği gösterilmiştir. Ayrıca örnek tamponuna (sample loading buffer) SDS eklenmemiştir. Jellerden biri Comassie Brilliant Blue R-250 ile boyanmıştır. Diğer jel ise %25 isoporopanol ve %10 asetik asit ile 30 dakika fiksasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra, aktivite bakılacak jel gece boyunca 4 °C'de belirli aralıklarla değiştirilerek ddH₂O ile yıkanmıştır. Jel steril petri tabağına yerleştirilmiş ve üzerine *B. cereus* (0.5 McFarland) içeren soft agarlı (%0.7) TSB'ye dökülmüştür. Petri kabı 28°C'de 1 gün inkübasyona bırakılıp inhibisyon zonu oluşumu için incelenmiştir. Standart moleküler ağırlık markerı (PageRuler SMO661, Fermentas) BBPP'nun moleküler ağırlığını boyanmış jelle karşılaştırarak belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada Bt koleksiyonumuzda bulunan ve zeytin alanlarından toplanıp karakterize edilen yaklaşık 100 adet Bt suşunun bakteriyosin benzeri madde üretme potansiyelleri antimikrobiyal aktivitelerine bakılarak araştırılmıştır.

3.1. Antimikrobiyal Aktivitenin Agar Spot Assay Yöntemiyle Belirlenmesi

Laboratuvarımızda bulunan Bt koleksiyonumuzdan toplamda 100 adet Bt suşu tekrar canlandırılmış ve yeni stokları oluşturulmuştur (Tablo 3.1). Zeytin alanlarından toplanan Bt stoğumuzdaki bazı suşlar tekrar canlandırılmamıştır. Bu nedenle, incelenecek Bt suşlarını 100'e tamamlamak için koleksiyonumuzdaki diğer Bt suşları da kullanılmıştır. Toplam 100 adet Bt suşu *Bacillus cereus* 11778'e karşı antimikrobiyal aktivite belirlemek amacıyla TSA'da agar spot testi kullanılarak taranmıştır. Sonuç olarak, 100 adet Bt suşundan 35 tanesinin antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 3.2 ; Şekil 3.1).

Tablo 3.1. Tekrar canlandırılmış Bt suşları

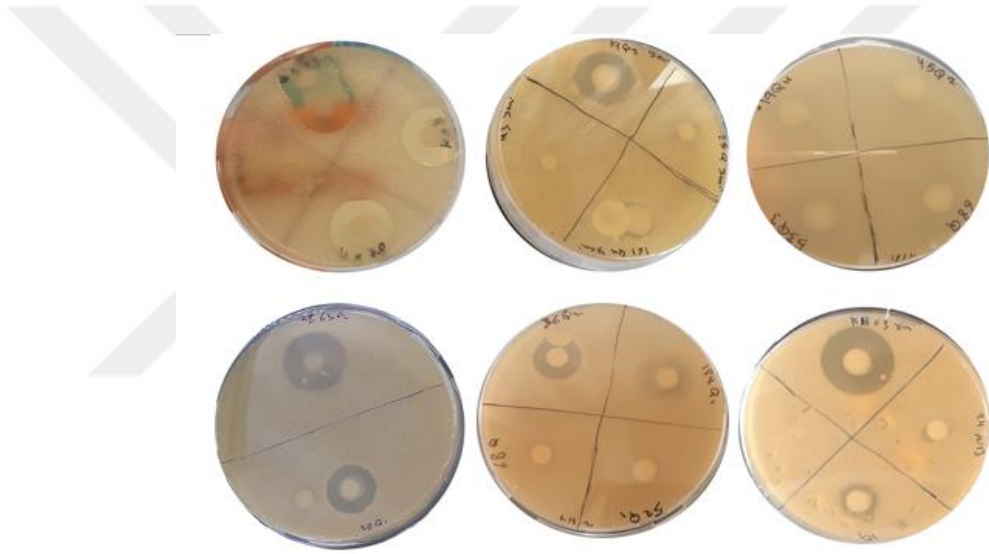
NO	Suşların adı	NO	Suşların adı	NO	Suşların adı	NO	Suşların adı
1.	42my	28.	25Q	55.	52Q3	82.	71Q
2.	13my	29.	161Q4	56.	161Q3	83.	20Q3
3.	KH58	30.	174Q	57.	39Q1	84.	69Q
4.	KH3	31.	56Q1	58.	55Q2	85.	14Q4
5.	85pb	32.	54Q1	59.	58Q3	86.	63Q
6.	43my	33.	57Q1	60.	44Q1	87.	50Q3
7.	By7	34.	41Q3	61.	44Q2	88.	67Q
8.	6A	35.	36Q1	62.	69Q1	89.	56Q2
9.	44my	36.	58Q2	63.	19Q1	90.	51my

10.	70my	37.	62Q	64.	164Q1x	91.	50Q2
11.	45my	38.	90Q1	65.	249Q	92.	74Q
12.	60Q2	39.	14Q3	66.	41Q	93.	19Q5
13.	125Q	40.	169Q	67.	39Q	94.	184Q
14.	19Q3	41.	36Q2	68.	167Q2	95.	93*Fa
15.	53Q2	42.	52Q1	69.	73Q	96.	24.Nb
16.	37Q3	43.	184Q1	70.	59Q1	97.	27pb
17.	290Q1	44.	183Q1	71.	64Qx	98.	KE62.64
18.	19Q4	45.	68Q	72.	28Q1	99.	43Q
19.	45Q2	46.	5Q	73.	14Q1	100.	19Q2
20.	53Q3	47.	16Q	74.	75Q		
21.	14Q2	48.	64Q1	75.	41Q2		
22.	167Q	49.	24.50I	76.	45Q1		
23.	65Q	50.	164Q1	77.	60Q1		
24.	37Q2	51.	37Q1	78.	19Q		
25.	183Q	52.	48Q1	79.	161Q5		
26.	58Q1	53.	54Q2	80.	71Q1		
27.	55Q3	54.	70Q	81.	70Q		

Tablo 3.2. Agar spot assay testi ile inhibisyon zonu oluşturan Bt suşları

No	Çok temiz olan suşlar	Zon çapları	NO	Az Bulanıklı suşlar	Zon çapları	NO	Çok bulanıklı suşlar	Zon çapları
1.	42my		18.	43MY	8mm	25.	169Q (çok küçük)	2mm
2.	13my		19.	70 MY	8mm	26.	184Q1 (çok küçük)	2mm
3.	KH3	9mm	20.	44MY	6mm	27.	16 Q	
4.	KH58	10mm	21.	73Q (küçük bir zon)	14mm	28.	167Q1	12mm
5.	85Pb	9mm	22.	71 Q1(çok hafif bir halka)		29.	44 Q2 (hafif bir halka)	
6.	BY7	14mm	23.	164 Q1	24 mm	30.	48Q1(çok küçük)	1mm
7.	19 Q2	12mm	24.	161Q3	14mm	31.	249 Q(çok küçük bir halka)	
8.	37 Q2	9mm				32.	39Q (çok küçük hafif bir zon)	
9.	183 Q	9mm				33.	167Q2	14mm
10.	174 Q	17mm				34.	59Q1	

11.	90 Q1	25mm				35.	93*Fa	12mm
12.	36Q2	17mm						
13.	5Q	19mm						
14.	164Q1X	19mm						
15.	28Q1	19.5mm						
16.	51MY	19mm						
17.	KE63.64	27mm						



Şekil 3.1. Agar spot assay ile bazı suşlara ait inhibisyon zonları.

3.2. Antimikrobiyal Aktivitesinin Agar Kuyu Difüzyon Yöntemiyle Belirlenmesi

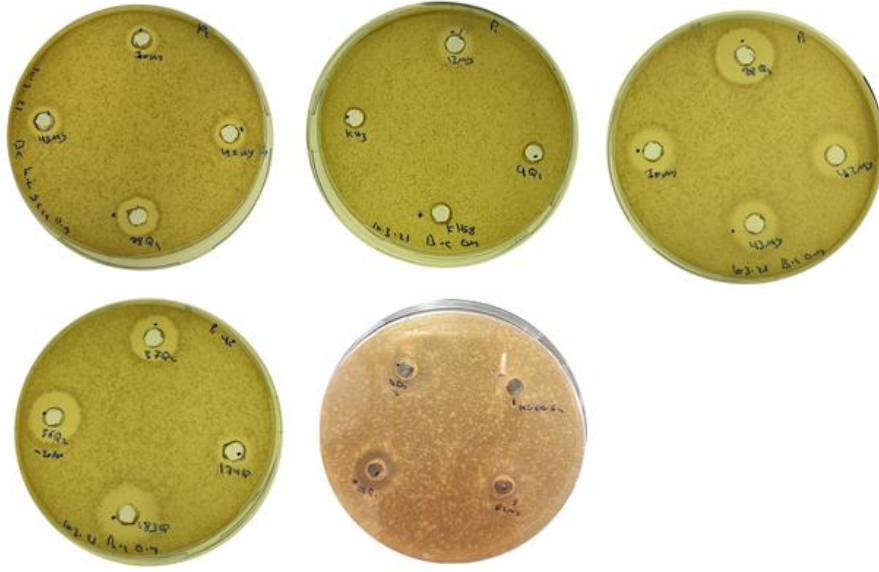
Antimikrobiyal etki gösteren ve agar spot testinde 17 adet çok temiz inhibisyon zonu veren suşlar TSB içinde 28°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra, süpernatantlar elde edilmiştir. Bu suşların antimikrobiyal aktivitesi *Agar kuyu difüzyon assay* ile de test edilmiştir. Suşlardan bazıları *agar spot* testinde inhibisyon zonu vermelerine rağmen *agar kuyu difüzyon assay* testinde inhibisyon zonu oluşturmamışlardır. İnhibisyon zonu oluşturan bazı suşların agar petri kabında görünüşleri Şekil 3.2’de verildiği

gibidir. *Agar kuyu difüzyon assay* sonunda 17 Bt suşundan 9 tanesinin çeşitli çaplarda inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmiştir (Tablo 3.3).

En yüksek inhibisyon zonu 28Q1 suşu tarafından oluşturulduğundan sonraki çalışmalarda bakteriyosin benzeri peptid üretimi ve karakterizasyonu için 28Q1 suşu kullanılmıştır.

Tablo 3.3. *Kuyu difüzyon assay* ile inhibisyon zonu oluşturan suşlar

NO	POSETIVE SUŞLAR	Zon çapları	NO	POSETIVE SUŞLAR	Zon çapları	NO	ZAYIF SUŞLAR
1.	28Q1	17.5mm	6.	13MY	12mm	1.	KE63Ç62
2.	183Q	16mm	7.	70MY	12mm	2.	161Q3
3.	36Q2	17mm	8.	42MY	13mm		
4.	174Q	10mm	9.	43MY	13mm		
5.	37Q2	17mm					



Şekil 3.2. Agar kuyu difüzyon testinde bazı suşlara ait inhibisyon zonları.

3.3. 28Q1 suşunun mikroskopik karakterizasyonu

Bt 28Q1 suşu faz kontrast mikroskobu ile incelendiğinde parasporal kristal üretimi gözlenmiştir Şekil (3.3).

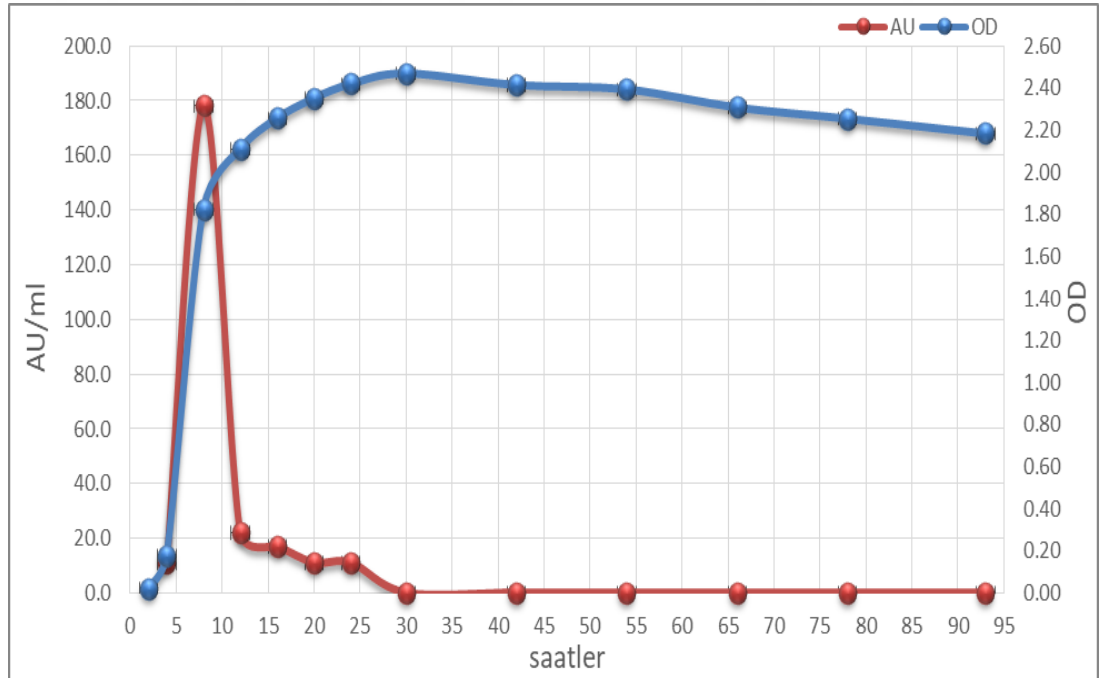


Şekil 3.3. 28Q1 suşu, spor ve kristal oluşumu.

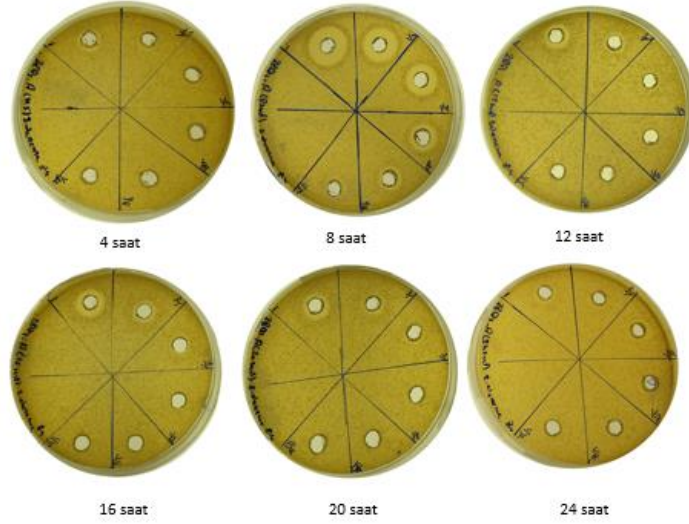
3.4. Büyüme Eğrisi Ve Bakteriyosin Üretim Kinetiğinin Belirlenmesi

B. cereus'a karşı 17.5 mm inhibisyon zonuyla diğer suşlara kıyasla en yüksek antimikrobiyal etki gösteren 28Q1 suşunun büyüme eğrisi ve antimikrobiyal aktivitenin kinetiği değişik zamanlarda incelenmiştir. Bunun için 28Q1 suşu TSB besiyerinde, 28C° de 95 saat inkübe edilmiş ve her 4 saatte bir alınan örneklerden absorbans (OD 600 nm) ölçülmüş ve antimikrobiyal aktivitesi agar well diffüzyon testi ile belirlenmiştir. Elde edilen büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiği Şekil 3.4'de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi bakteriyosin üretimi logaritmik fazın başlarında (yaklaşık ilk 3-4 saatte) gözlenmiş ve maksimum aktivite logaritmik fazın sonunda ve durgun fazın başında (8-10 saatte) tespit edilmiştir. Bakteriyosin aktivitesi 12 saat sonra azalmaya başlamış ve 24 saate kadar durgun fazda bakteriosin aktivitesi düşük düzeyde devam etmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre bakteriyosin aktivitesi büyüme eğrisinin ilk 3-4 saati sonra 11 AU/ml, 8-10 saat sonra 178 AU/ml, 16 saat sonra 17 AU/ml, 20 saat sonra 11 AU/ml, 24 saat sonra 11 AU/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.4)



Şekil 3.4. 28Q1 büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretimi kinetikleri.



Şekil 3.5. Değişik zamanlarda bakteriyosin aktivitesinin petrideki görünümü.

3.5. Bakteriyosin Aktivitesinin Karakterizasyonu

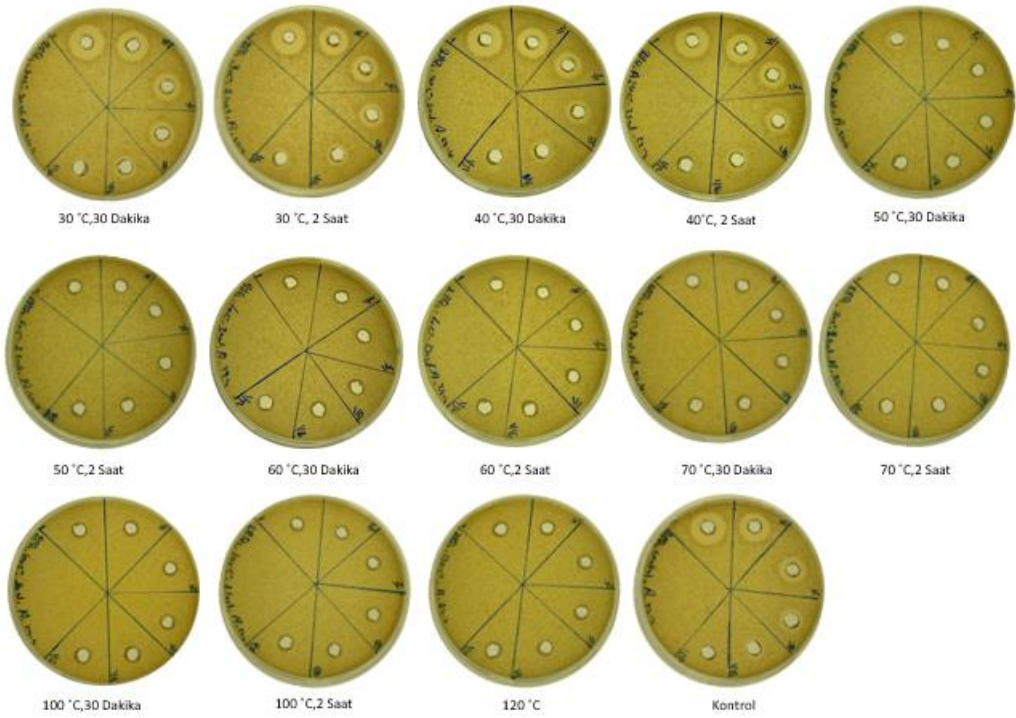
3.5.1. Bakteriyosin aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisi

Öncelikle, Bt 28Q1 suşu kültür süpernatantlarının üzerinde sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Kültür süpernatantları 30-100 °C’de 30 dakika ve 2 saat ısıtıcı blokta inkübe edilmiş; 121°C’de ise 15 dakika otoklavlanmıştır. Değişik sıcaklıklara maruz bırakılan süpernatantların *B. cereus*’a karşı oluşturduğu zon çapları ölçülüp kontrolle kıyasladığında elde edilen kalan aktivite Tablo 3.4’de verilmiştir. Deneyde sıcaklık uygulanmamış kültür süpernatantları kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Sonuç olarak kültür süpernatantları en iyi antimikrobiyal aktiviteyi 30-40°C’de gösterdiği; 50°C’de 30 dakikada aktivitesinin büyük bir kısmını kaybettiği; buna karşın, 50°C’de 2 saatte ve 60-121°C’de aktivitesini tamamen kaybettiği gözlenmiştir (Şekil 3.6).

Tablo 3.4. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi.

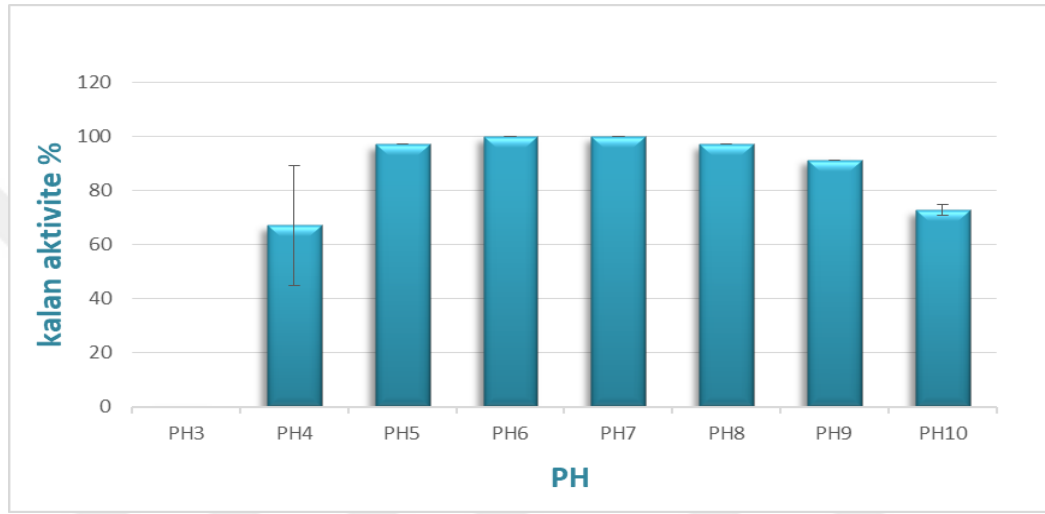
Sıcaklık °c	KALAN AKTİVİTE %	
	30 dakika	2 saat
30 °C	103	101
40°C	100	94
50°C	47	—
60°C	0	0
70°C	0	0
100°C	0	0
121°C (15 min)	—	—



Şekil 3.6. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin petrideki görünümü.

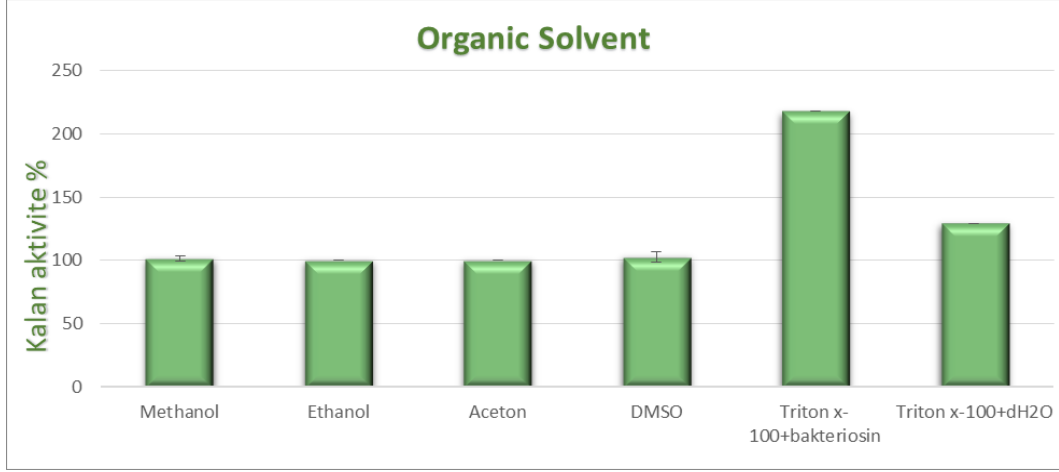
3.5.2. Bakteriyosin aktivitesi üzerinde pH'nin etkisi

Farklı pH değerlerinin CFS'nin bakteriyosin aktivitesini nasıl değiştirdiği test edilmiştir. Bu amaçla Bt 28Q1 suşunun kültür süpernatantlarının (CFS) pH leri 3-10 arasında ayarlanarak aktiviteyi tayin edilmiştir. Süpernatantların oluşturduğu zon çapları ölçülerek işlem görmemiş süpernatantların oluşturduğu kontrol grubu ile kıyaslanmış ve kalan aktivite. şekil 3.7'de verilmiştir.



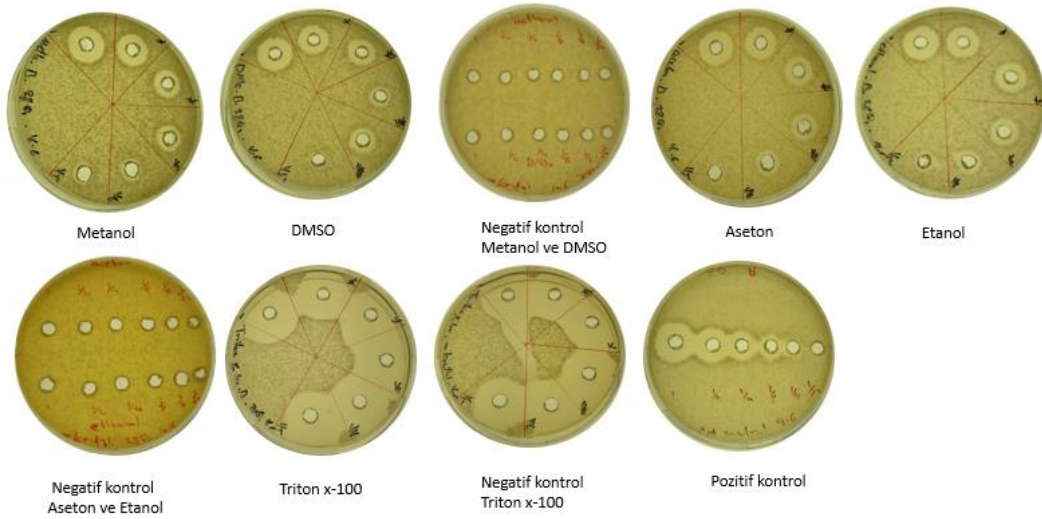
şekil 3.7. Bt 28Q1 elde edilen bakteriyosin aktivitesi üzerinde pH etkisi.

Sonuçta bakteriyosin 30°C'de, 30 dakikada pH 6-7'de en iyi aktivite göstermiş, pH 5-8-9 da aktivitesini kısmen kaybetmiş ve pH4, pH 10'da aktivite %62, %70'e sırasıyla düşmüş, pH 3'te ise aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. (şekil 3.7; şekil 3.8).

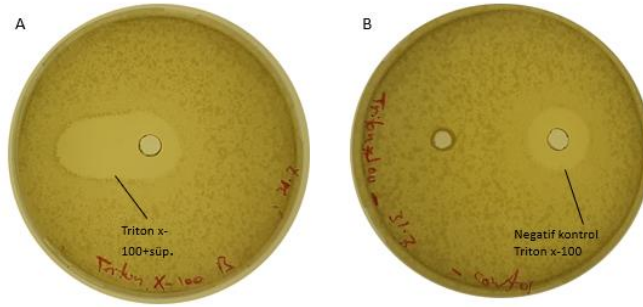


Şekil 3.9. Bt 28Q1 elde edilen bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.

Sonuçta Aseton, Metanol, Etanol ve DMSO'nun CFS'nin bakteriyosin aktivitesini etkilemediği fakat Triton x-100'ın ise aktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 3.10). Triton x-100 antimikrobiyal özelliğe sahip olması nedeniyle bakteriyosinin aktivitesini ne kadar arttırdığını belirlemek amacıyla Triton x-100 bakteriyosin yerine dH₂O ile karıştırılarak kontrol grubu oluşturulmuştur. Şekil 3.11'de agar kuyu difüzyon testi kullanılarak Triton x-100 ve dH₂O karışımıyla elde edilen negatif kontrolün *B.cereus*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve 20 mm'lik inhibisyon zonu oluşturduğu; buna karşın Triton x-100 ve bakteriyosin karışımının ise 37 mm inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmiştir. Sonuçta Triton x-100'ın antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir.



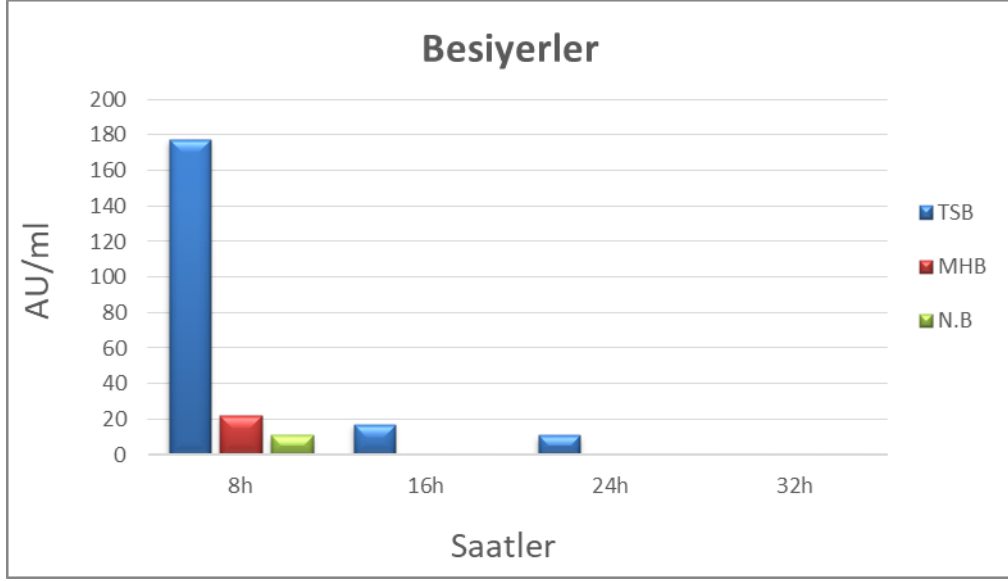
Şekil 3.10. Organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin petrideki görünümü.



Şekil 3.11. Bakteriosin aktivitesi üzerine Triton x-100 etkisi ve kontrol görüntüsü; A:Triton x-100 + 28Q1 süpernatantı, B: Negatif kontrol (Triton x-100+ dH₂O).

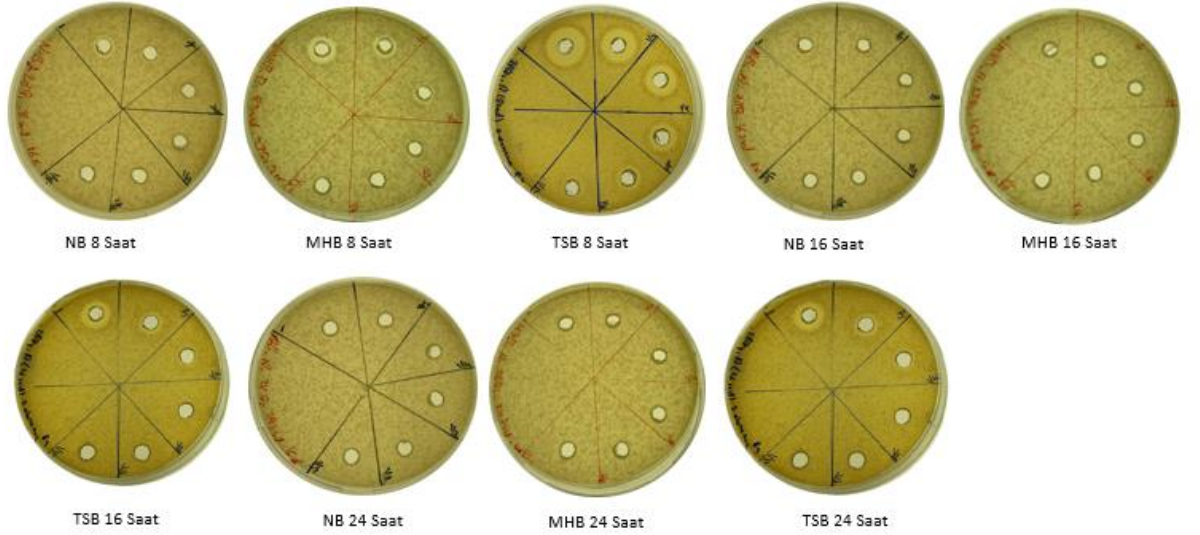
3.5.4. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Farklı Besiyerlerinin Etkisi

Çalışmada bakteriyosin üretimine farklı besiyerleri olan MHB ve NB'un etkisi araştırılmıştır. Bt 28Q1 suşu MHB ve NB besiyerlerinde 24 saat 28 °C de inkübe edilmiş ve her 8 saatte bir süpernatant alınarak *B.cereus* üzerine antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. 28Q1 TSB besiyerinde büyütülerek kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Farklı besiyerleri TSB kontrolü ile kıyasladığında antimikrobiyal aktivite üzerine etkileri belirlenmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Farklı besiyerlerinde yetiştirilen 28Q1'in antimikrobiyal aktivitesi.

TSB, NB ve MHB de en iyi bakteriyosin üretimi 8 saat sonra gözlemlenmiş olup, TSB broth ortamında 178 AU/ml, NB'da 11 AU/ml, MHB'da 22 AU/ml aktivite gözlemlenmiştir. Böylece en fazla bakteriyosin üretimi TSB broth ortamında gerçekleşmiştir (Şekil 3.13).



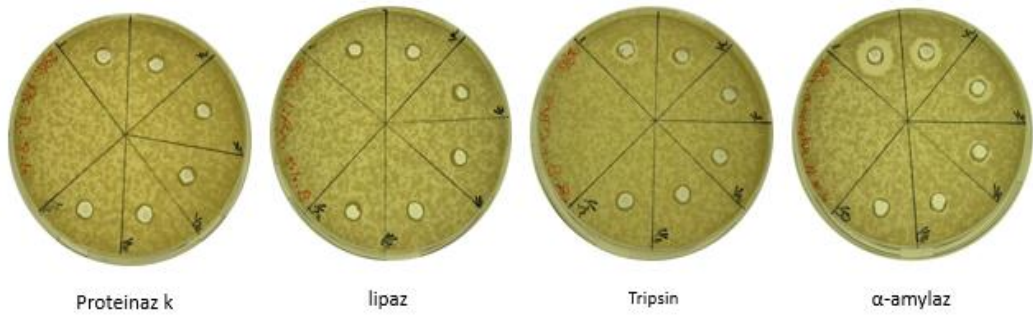
Şekil 3.13. Farklı besiyerlerinde bakteriyosin üretiminin petrideki görünümü

3.5.5. Bakteriyosin Aktiviteleri Üzerine Enzimlerin Etkisi

28Q1 suşundan elde edilen CFS'nin aktivitesinin değişik enzimlerle muamele sonunda nasıl değiştiği incelenmiştir. Proteinaz K, tripsin, α -amilaz, lipaz enzimleri gibi dört farklı enzim son konsantrasyon 1mg/ml olacak şekilde süpernatanta eklenmiş ve 2 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. *Agar kuyu difüzyon* deneyinde, enzim ile muamele edilen süpernatantlardan kuyucuklara 90 μ l eklenmiş ve *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteye bakılmıştır (Şekil 3.14). Proteinaz K ve lipaz muamelesi sonucunda bakteriyosin aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlenirken, α -amilaz'da ise aktivitenin korunduğu gözlemlenmiştir. Tripsin muamelesi sonucunda ise bakteriyosin aktivitesinin kısmi olarak azaldığı saptanmıştır (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Bakteriyosin aktivitelerine enzimlerin etkisi.

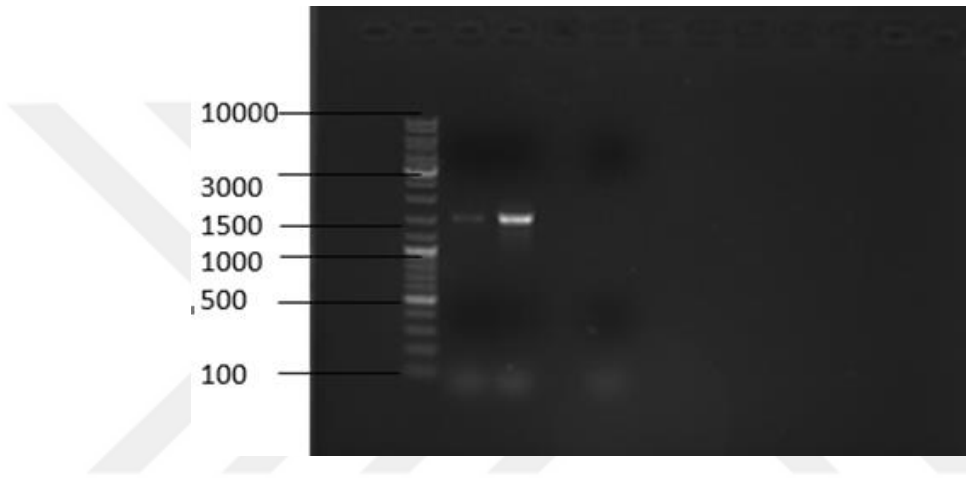
Enzimler	% Kalan aktivite
Proteinaz K	0
Lipaz	0
α -amilaz	96.6
Tripsin	70



Şekil 3.14. Enzimlerin bakteriyosinin aktivitesi üzerindeki etkilerinin petrideki görünümü.

3.6. 28Q1 suşunun 16s rDNA PCR ile analizi

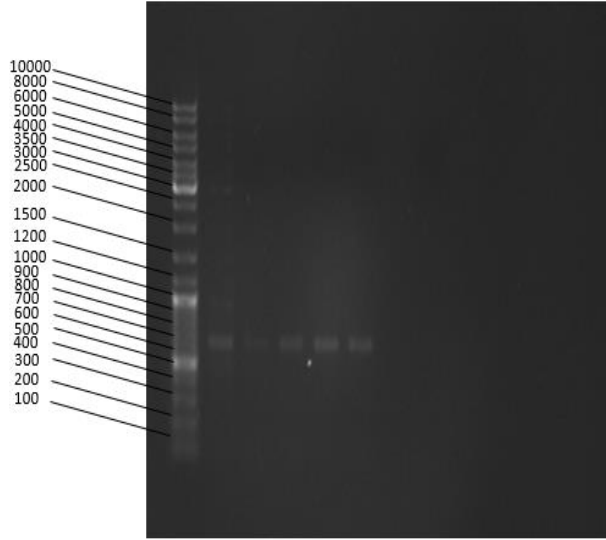
Önceki çalışmalarda 28Q1 suşu içerdiği *cry* genleri ve faz kontrast mikroskopuyla tespit edilen kristal inklüzyonların varlığıyla Bt olarak tanımlanmıştır. 28Q1 suşunun Bt olduğunu teyit etmek için 16S rDNA gen sekans analizi gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA genine ait primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile ilgili gen çoğaltılmıştır. PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldüğünde, 16S rDNA geni için beklendiği gibi 1500 bp uzunluğunda PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 3.15). *B. thuringiensis* supsp. *kurstaki* (4D1) pozitif kontrol olarak kullanmıştır.



Şekil 3.15. 16s rDNA PCR ürünün agaroz jel’de görüntüsü.

3.7. 28Q1 *hag* gen PCR ile analizi

Bt’nin alt türünü belirlemek için ise flagellin gen (*hag*) sekans analizi yapılmıştır. Bu amaçla 28Q1’den elde edilen DNA *hag* geni primerleri ile çoğaltılmış ve beklendiği gibi 700 bp uzunluğunda PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. 28Q1 *hag* geni ile yapılan PCR 'in agaroz jel görüntüsü.

3.8. 28Q1 16S rDNA analizi

28Q1 suşu 16S rDNA'yı kodlayan gen bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılmış ve dizi analizi yapılmıştır. Sekans sonuçları Bioedit program kullanarak birleştirilmiştir ve sonuç olarak 28Q1 için konsensus diziler elde edilmiştir. Konsensus www.pubmed.com adresinde yer alan nükleotid blast programı aracılığıyla veri tabanında yer alan 16S rDNA dizileri karşılaştırılmıştır. Karşılaşma sonucunda 28Q1 ile veri tabanında bulunan ve tür tanısı yapılmış bakteriler arasında % 99 oranda *Bacillus thuringiensis* bakterisi ile homoloji gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 3.6; Şekil 3.17).

Tablo 3.6. 28Q1 suşuna ait 16s rDNA konsensus ve BLAST karşılaştırma sonucu.

```
GCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGC
ATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGKGAGGT
AACGGYTCACCAAGGCAACGATGSGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAMTGAGACMCGGCC
CAGAYTCYTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTKTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTG
ACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGA
GGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTT
AGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACG
```

GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGARRAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT
CTGAMAACCCTARAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCARAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCRSCTCSTGT
CGKGARAWGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGYTGCCAYCATTAAAGTTGGGCACTCT
AAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTC
AGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAAC
CTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGGGCC



>Bacillus thuringiensis strain BDzD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: MN203615.1 Length: 1486
Range 1: 29 to 1461

Score:2569 bits(1391), Expect:0.0,
Identities:1412/1433(99%), Gaps:0/1433(0%), Strand: Plus/Plus

Query	2	CTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGA	61
Sbjct	29	CTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGA	88
Query	62	CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG	121
Sbjct	89	CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG	148
Query	122	CTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTTGAAATTGAAAGCGGCTTCGGCTGTC	181
Sbjct	149	CTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTTGAAATTGAAAGCGGCTTCGGCTGTC	208
Query	182	ACTTATGGATGGACCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGKGAGGTAACGGYTACCAAGGCAA	241
Sbjct	209	ACTTATGGATGGACCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAA	268
Query	242	CGATGSGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAMTGAGACMCGGCCAGAY	301
Sbjct	269	CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC	328
Query	302	TCYTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG	361
Sbjct	329	TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG	388
Query	362	CCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGTCGTAAACTCTKTTGTTAGGGAAGAACAAAGTGC	421
Sbjct	389	CCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAAGTGC	448
Query	422	TAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC	481
Sbjct	449	TAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC	508
Query	482	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC	541
Sbjct	509	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC	568
Query	542	GCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG	601
Sbjct	569	GCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG	628
Query	602	GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATG	661
Sbjct	629	GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATG	688
Query	662	CGTAGAGATATGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACGTGACACTG	721
Sbjct	689	CGTAGAGATATGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACGTGACACTG	748
Query	722	AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG	781
Sbjct	749	AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG	808

Query 782 ATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCAC 841
 Sbjct 809 ATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCAC 868

Query 842 TCCGCCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACA 901
 Sbjct 869 TCCGCCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACA 928

Query 902 AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCARRAACCTTACCAGGTCTTGACAT 961
 Sbjct 929 AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCARRAACCTTACCAGGTCTTGACAT 988

Query 962 CCTCTGAMAACCTARAGATAGGGCTTCTCTTGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGATG 1021
 Sbjct 989 CCTCTGACAACCTTAGAGATAGGGCTTCTCTTGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGATG 1048

Query 1022 GTTGTCTGCRSCTCTGTGCGARAWGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTG 1081
 Sbjct 1049 GTTGTCTGAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTG 1108

Query 1082 ATCTTAGYTGCCAYCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG 1141
 Sbjct 1109 ATCTTAGTGGCATCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG 1168

Query 1142 AAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGCTACA 1201
 Sbjct 1169 AAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGCTACA 1228

Query 1202 ATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACGGTTCT 1261
 Sbjct 1229 ATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACGGTTCT 1288

Query 1262 AGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGAT 1321
 Sbjct 1289 AGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCGGAT 1348

Query 1322 CAGCATGCCCGGGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACACGAGA 1381
 Sbjct 1349 CAGCATGCCCGGGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACACGAGA 1408

Query 1382 GTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGG 1434
 Sbjct 1409 GTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGG 1461

☒	Bacillus (paranthracis strain) C220000000.10.chromosome.complete.genome	Bacillus (paranthracis)	2569	37014	99%	0.0	98.53%	5351390	CP045537.1
☒	Bacillus cereus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	2569	2569	99%	0.0	98.53%	1500	MN620468.1
☒	Bacillaceae bacterium C05 chromosome, complete genome	Bacillaceae bacterium C05	2569	35774	99%	0.0	98.53%	5258784	CP045537.1
☒	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain SNH-K73 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: Bacteria)	2569	2569	99%	0.0	98.53%	1441	MN493922.1
☒	Bacillus thuringiensis strain BDzD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus thuringiensis	2569	2569	99%	0.0	98.53%	1486	MN203815.1
☒	Bacillus paranthracis strain PR1 chromosome, complete genome	Bacillus paranthracis	2569	35883	99%	0.0	98.53%	5319903	CP040515.1
☒	Bacillus cereus strain MH19 chromosome, complete genome	Bacillus cereus	2569	35822	99%	0.0	98.53%	5247580	CP039269.1
☒	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain ILR58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: Bacteria)	2569	2569	99%	0.0	98.53%	1508	MK096376.1
☒	Bacillus sp. SYJ chromosome, complete genome	Bacillus sp. SYJ	2569	35809	99%	0.0	98.53%	5296886	CP036356.1
☒	Bacillus sp. FDAARGOS_527 chromosome, complete genome	Bacillus sp. FDAARGOS_527	2569	35809	99%	0.0	98.53%	5277296	CP033795.1
☒	Bacillus cereus strain R2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	2569	2569	99%	0.0	98.53%	1484	MK064179.1
☒	Bacillus cereus strain H6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	2569	2569	99%	0.0	98.53%	1473	MG386505.1
☒	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain Firmi-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: Bacteria)	2569	2569	99%	0.0	98.53%	1505	MH683113.1
☒	Uncultured bacterium clone MF9Y.R12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	2569	2569	99%	0.0	98.53%	1513	KY609479.1
☒	Bacillus cereus strain CC-1 chromosome, complete genome	Bacillus cereus	2569	35899	99%	0.0	98.53%	5279524	CP023179.1
☒	Bacillus sp. (in: Bacteria) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: Bacteria)	2569	2569	99%	0.0	98.53%	1544	KX839268.1
☒	Bacillus cereus strain 192 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	2569	2569	99%	0.0	98.53%	1543	KT259192.1
☒	Bacillus thuringiensis strain XL6 chromosome, complete genome	Bacillus thuringiensis	2569	15014	99%	0.0	98.53%	5308217	CP013000.1
☒	Bacillus cereus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain Iso10-14	Bacillus cereus	2569	2569	99%	0.0	98.53%	1459	AB795549.1
☒	Bacillus cereus strain S2-8, complete genome	Bacillus cereus	2569	33252	99%	0.0	98.53%	5271178	CP009605.1
☒	Bacillus thuringiensis strain HD682, complete genome	Bacillus thuringiensis	2569	35811	99%	0.0	98.53%	5213285	CP009720.1

Şekil 3.17. 16S rDNA'nın Blast analizi sonucu

3.9. 28Q1 hag geni ile analizi

28Q1 hag geni kodlayan gen bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltmış ve dizi analizi yapılmıştır. Sekans sonuçları Bioedit programı kullanarak 28Q1 suşun altsuşu belirlenmiştir. Karşılaştırma sonucunda 28Q1 veri tabanında bulunan ve altsuş tanısı yapılmış bakteriler arasında %99 oranda *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* bakterisi ile homoloji gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 3.7; Şekil 3.18).

Tablo 3.7. 28Q1 suşuna ait *hag* geni forward BLAST karşılaştırma sonucu.

```
ACGGAAGTATCAACAACGCTTCTGACGATGCAGCAGGTCTTGCAATCGCAACTCGTATGCGTGCACATGAAAGT
GGTCTTTCAGTAGCAGCTCGTAATACATCAGACGGTATTTCTTTAATCCGTACTGCTGATTAGCTTTACAATCTG
TATCTAATATTCTTCTTCGTATGCGTGACATCGCCAACTGCAAACGGAATAATAAGATACTGATATTG
AAGCCTTAGGTAAAGAATTTGCCGCTTTAAAGAACAATTACTTATGTTAGCGATAACACAAAATTTAATGGTA
GAGAGCTATTAAGGGCGCGATGATATCAATATTCAAACGTACGATGGTAGCGACGAGTCCCAACAAATTA
ATTAATAATCTGAATTAGACCTTTCAAGTCTAGACACTGGTGAAGTTACAGACTCAGATACTGCTCGTGGA
GTTAGCACACTTGATGACGCTATAACAAATATTGCTTCTAAGCGTGCTGAGTTAGGCGCTACATTAATCGTTA
GATTATAACACTCAAAATGTAAACAGTGAGGCTGCAAGTATGGCTGCATCTGCTTCTCAAATTGAAGATGCAGAT
ATGGCGAAAGAAATGTCTGAAAAT
```

```
>Bacillus thuringiensis serovar tochigiensis strain IEBC-T19 001 flagellin (hag) gene, partial cds
Sequence ID: DQ377259.1 Length: 693
Range 1: 44 to 658
```

```
Score:1125 bits(609), Expect:0.0,
Identities:613/615(99%), Gaps:0/615(0%), Strand: Plus/Plus
```

```
Query 7 GTATCAACAACGCTTCTGACGATGCAGCAGGTCTTGCAATCGCAACTCGTATGCGTGCAC 66
|||||
Sbjct 44 GTATCAACAACGCTTCTGACGATGCAGCAGGTCTTGCAATCGCAACTCGTATGCGTGCAC 103

Query 67 ATGAAAGTGGTCTTTCAGTAGCAGCTCGTAATACATCAGACGGTATTTCTTTAATCCGTA 126
|||||
Sbjct 104 ATGAAAGTGGTCTTTCAGTAGCAGCTCGTAATACATCAGACGGTATTTCTTTAATCCGTA 163

Query 127 CTGCTGATTGACGCTTTACAATCTGATCTAATATTCTTCTCGTATGCGTGACATCGCCA 186
|||||
Sbjct 164 CTGCTGATTGACGCTTTACAATCTGATCTAATATTCTTCTCGTATGCGTGACATCGCCA 223

Query 187 ACCAACTGCAACGGAACATAAAGATACTGATATTGAAGCCTTAGGTAAGAAATTTG 246
|||||
Sbjct 224 ACCAACTGCAACGGAACATAAAGATACTGATATTGAAGCCTTAGGTAAGAAATTTG 283

Query 247 CCGCTTTAAAGAACAATTACTTATGTTAGCGATAACACAAAATTTAATGGTAGAGAGC 306
|||||
Sbjct 284 CCGCTTTAAAGAACAATTACTTATGTTAGCGATAACACAAAATTTAATGGTAGAGAGC 343

Query 307 TATTAAGGCGCGATGATATCAATATTCAAACGTACGATGGTAGCGAGTCCCAAC 366
|||||
Sbjct 344 TATTAAGGCGCGATGATATCAATATTCAAACGTACGATGGTAGCGAGTCCCAAC 403

Query 367 AAATTAATAATAATATCTGAATTAGACCTTTCAAGTCTAGACACTGGTGAAGTTACAG 426
|||||
Sbjct 404 AAATTAATAATAATATCTGAATTAGACCTTTCAAGTCTAGACACTGGTGAAGTTACAG 463

Query 427 ACTCAGATACTGCTCGTGGAAGTGTAGCACACTTGATGACGCTATAACAAATATTGCTT 486
|||||
Sbjct 464 ACTCAGATACTGCTCGTGGAAGTGTAGCACACTTGATGACGCTATAACAAATATTGCTT 523

Query 487 CTAAGCGTGCTGAGTTAGGCGCTACATTAATCGTTTAGATTATAACACTCAAAATGTAA 546
|||||
Sbjct 524 CTAAGCGTGCTGAGTTAGGCGCTACATTAATCGTTTAGATTATAACACTCAAAATGTAA 583

Query 547 ACAGTGAGGCTGCAAGTATGGCTGCATCTGCTTCTCAAATTGAAGATGCAGATATGGCGA 606
|||||
Sbjct 584 ACAGTGAGGCTGCAAGTATGGCTGCATCTGCTTCTCAAATTGAAGATGCAGATATGGCGA 643

Query 607 AAGAAATGTCTGAAA 621
|||||
Sbjct 644 AAGAAATGTCTGAAA 658
```

✓ Bacillus tropicus strain FDAARGOS_782 chromosome, complete genome	Bacillus tropicus	1125	1125	98%	0.0	99.67%	5263142	CP053955.1
✓ Bacillus tropicus strain AOA-CPS1 chromosome	Bacillus tropicus	1125	1125	98%	0.0	99.67%	5246960	CP049019.1
✓ Bacillus thuringiensis strain XL6 chromosome, complete genome	Bacillus thurin...	1125	1125	98%	0.0	99.67%	5308217	CP013000.1
✓ Bacillus cereus ATCC 4342, complete genome	Bacillus cereus...	1125	1125	98%	0.0	99.67%	5269496	CP009628.1
✓ Bacillus sp. CRB-7 chromosome, complete genome	Bacillus sp. C...	1125	1125	98%	0.0	99.67%	5254393	CP083749.1
✓ Bacillus thuringiensis serovar tochiensis strain IIBC-T19 001 flagellin (hag) gene, partial cds	Bacillus thurin...	1125	1125	98%	0.0	99.67%	693	DQ377259.1
✓ Bacillus cereus strain FT9, complete genome	Bacillus cereus	392	392	34%	3e-104	100.00%	5223665	CP008712.1
✓ Bacillus sp. FDAARGOS_235 chromosome, complete genome	Bacillus sp. FD...	248	248	41%	6e-61	84.09%	5287334	CP020437.2
✓ Bacillus thuringiensis serovar neoleonensis strain IIBC-T24 001 soluble lytic murein transglycosyla...	Bacillus thurin...	248	248	41%	6e-61	84.09%	1816	DQ377265.2
✓ Bacillus thuringiensis serovar xiaquangensis strain IIBC-T51 001 flagellin (hag) gene, partial cds	Bacillus thurin...	248	248	41%	6e-61	84.09%	1014	DQ377279.1
✓ Bacillus thuringiensis serovar navarrensensis strain IIBC-T50 001 flagellin (hag) gene, partial cds	Bacillus thurin...	244	244	50%	8e-60	81.07%	1047	DQ377278.1
✓ Bacillus albus strain PFYN01 chromosome, complete genome	Bacillus albus	243	243	41%	3e-59	83.77%	4939577	CP034548.1
✓ Bacillus sp. PGP15 chromosome, complete genome	Bacillus sp. P...	243	243	41%	3e-59	83.77%	5318931	CP095874.1
✓ Bacillus sp. N5-665 strain N5/665 plasmid p1, complete sequence	Bacillus sp. N5...	243	243	41%	3e-59	83.71%	5519593	CP093325.1
✓ Bacillus toyonensis strain JAS22/1 chromosome, complete genome	Bacillus toyone...	243	243	41%	3e-59	83.71%	5307379	CP036094.1
✓ Bacillus cereus strain FDAARGOS_802 chromosome, complete genome	Bacillus cereus	235	235	41%	5e-57	83.27%	5342923	CP053965.1

Şekil 3.18. hag gen Blast analizi.

3.10. Bakteriyosinin amonyum sülfat ile kısmi pürfikasyon

Bt 28Q1 hücreleri 200 ml TSB'de 28°C'de 8 saat inkübe edilerek 8000x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant toplanarak farklı saturasyon değerlerinde (%60, %70, %80) amonyum sülfat (AS) ile yoğunlaştırılmış ve bir gece çökmesi sağlanmıştır. Tekrar santrifüjlenen örneklerden elde edilem pellet uygun tamponda çözülmüş ve aynı tampona karşı diyaliz edilerek filtreden geçirilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesiyle kısmi purifikasyonu sağlanan bakteriyosin benzeri protein preperasyonunun (BBPP) *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu difüzyon ile test edilmiş ve hepsinde antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. Kısmi olarak saflaştırılan BBPP'nun antimikrobiyal aktivitesi.

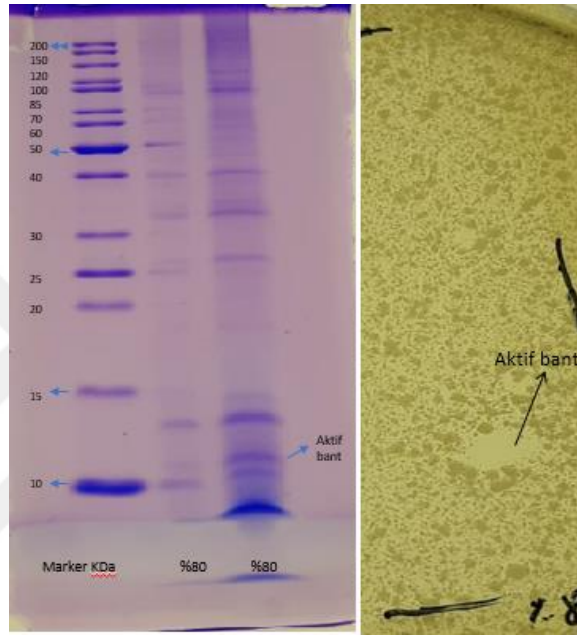
3.11. SDS-PAGE ve bakteriyosin aktivitesi

Amonyum sülfat (%80) çöktürmesiyle elde edilen BBPP'nu daha yoğun hale getirmek için ultrafiltrasyon (10000 MWCO) işlemi uygulanmıştır. Filtreden süzen örnek (filtrat) ve filtrenin üst kısmında kalan örnek (konsantrat) antimikrobiyal aktiviteleri bakımından incelenmiştir. Antimikrobiyal aktivite filtratta gözlenmezken konsantratta gözlenmiştir (Şekil 3. 20). Bu veriler antimikrobiyal aktivite gösteren proteinin 10 kDa veya daha büyük moleküler ağırlıkta olduğunu göstermektedir.

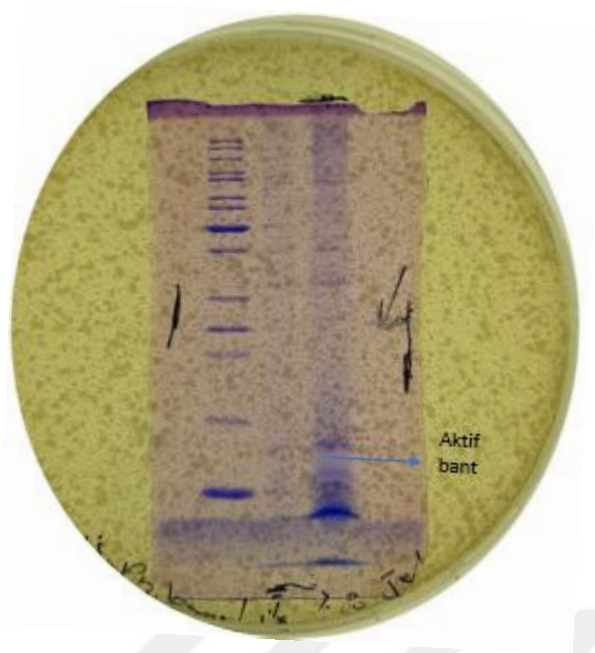


Şekil 3.20. Ultrafiltrasyon yapılan BBPP'nun *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi. 1:alt kısım (filtrat); 2: üst kısım (konsantrat); 3: Ultrafiltrasyon uygulanmayan BBPP.

Kısmi olarak saflaştırılan BBPP %15'lik SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Amonyum sülfat ile çöktürülen protein bantlarının (BBPP) hangisinin antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemek amacıyla *Jel overlay assay* uygulanmıştır. Moleküler ağırlık (MW) standartı ile karşılaştırıldığında, yaklaşık 12 kDa ağırlığındaki protein bantının antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.21). Ayrıca, moleküler ağırlık standartı ve antimikrobiyal aktivite gösteren bantlar üst üste getirildiğinde de 12 kDa'luk protein bantının antimikrobiyal aktivitesi çakışmaktadır (Şekil 3.22).



Şekil 3.21. 28Q1'den elde edilen bakteriyosin benzeri protein örneğinin (BBPP) %15 SDS-PAGE analizi. Kuyucuklar sırasıyla: 1: MW marker; 2: %80 AS ile çöktürülmüş ve yoğunlaştırılmamış protein örneği; 3: %80 AS ile çöktürülmüş ve ultrafiltrasyonla yoğunlaştırılmış protein örneği.



Şekil 3.22. Yaklaşık 12 kDa'luk proteinin antimikrobiyal aktivite gösteren bant ile örtüşmesi.

3.12. 28Q1 Antibakteriyal Etki Spektrumları:

B. cereus'a karşı en yüksek antimikrobiyal etki gösteren 28Q1 suşundan elde edilen süpernatant (CFS) ve kısmi olarak saflaştırılmış bakteriyosin benzeri protein preparasyonu'nun (BBPP) toplam 17 adet Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler ile *Candida albicans* üzerindeki etkisi incelenmiştir. Gram pozitif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki gözlenirken, bazı Gram pozitif ve incelenen Gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki gözlenmemiştir. Fungus üzerinde de antifungal etkiye rastlanmamıştır (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. Bt 28Q1 suşunun antimikrobiyal etki spektrumu.

Suşların adı	Zon Çapları (mm)	
	Süpernatant	BBPP
Gram pozitif		
<i>Bacillus thuringiensis subsp. finitimus</i>	13	16
<i>B. thuringiensis subsp. tenebrionis</i>	19	22
<i>B. thuringiensis subsp. galleriae</i>	18	22
<i>B. thuringiensis subsp. thompsoni</i>	16.5	20
<i>B. thuringiensis subsp. morrisoni</i>	20	21
<i>B. thuringiensis subsp. dakota</i>	16	8.5
<i>B. thuringiensis subsp. azawai</i>	19	23
<i>B. thuringiensis subsp. kurstaki</i>	-	18
<i>Bacillus cereus</i>	17.5	21
<i>Listeria spp</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-
Gram negatif		
<i>Eschreichia coli DH5α</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Eschreichia coli</i>	-	-
Fungal		
<i>Candida albicans</i>	-	-

4. TARTIŞMA

Bacillus thuringiensis (Bt), sporlanma sırasında insektisidel kristal proteinleri ve büyümenin vejetatif evresi sırasında vejetatif insektisidel proteinleri (VIP'ler) sentezleme yeteneği nedeniyle biyopestisit olarak kullanılan en başarılı entomopatojenik bakterilerdir. Bununla birlikte, Bt çeşitli bakteriyosin benzeri antimikrobiyal peptid üretme potansiyeline de sahiptir. Günümüzde farklı ortamlardan elde edilen Bt suşlarının bakteriyosin benzeri madde üretimi üzerinde çalışmalar bulunmasına rağmen zeytin alanlarından toplanan Bt suşlarının bakteriyosin üretim potansiyeli üzerinde araştırma bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada, Bt koleksiyonumuzda bulunan ve zeytin alanlarından toplanıp karakterize edilen yaklaşık 100 adet Bt suşunun bakteriyosin benzeri antimikrobiyal peptid üretme potansiyelleri araştırılmıştır. Bu suşların sadece 80 tanesi canlandırılabilmiş ve geri kalan 20 Bt suşu koleksiyonumuzdaki diğer Bt suşlarından tamamlanmıştır. Tekrar canlandırılan suşların *agar spot assay* ile indikatör bakteri *Bacillus cereus*'a (ATCC 1778) karşı antimikrobiyal aktiviteleri taranmıştır. Bunlardan 35 suşun *B. cereus*'a karşı inhibitör aktivite gösterdiği ancak 17 Bt suşunun çok temiz inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.2). Agar kuyu difüzyon metodu ile bu 17 suşun sadece 9 tanesinin *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği teyit edilmiştir (Tablo 3.3).

Bakteriyosinler kendilerini üreten yakın türleri hedef aldığı için indikatör bakteri olarak *B. cereus* kullanılmıştır. Bu bakteri besinlerde bozulmalara neden olmaktadır. Agar spot testiyle inhibisyon zonu pozitif çıkan suşların bazıları agar kuyu difüzyon yöntemiyle inhibitör aktivite göstermemiştir. Literatürdeki çalışmalara göre bunun bazı nedenleri olabileceği bilinmektedir. Örneğin, Barboza-Corona vd .(Barboza-Corona et al. 2007a) agar spot assay ile Meksika'nın 50 Bt suşundan 11 tanesinin *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini; buna karşın, agar kuyu difüzyon testi ile bunlardan sadece 5 tanesinin *B. cereus*'a karşı inhibitör aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bunun nedeninin, süpernatant pH'sının NaOH ile ayarlanırken organik asitlerin nötralizasyonu sonucu olabileceği belirtilmiştir. Prangishvili vd. (Prangishvili et al. 2000) termofilik suşlarda bakteriyosin aktivitesini

incelediklerinde agar spot testi ile geniş inhibisyon zonu elde ederken, sıvı ortamlardaki aktivite için supernatantı 100 kat konsantre etmeleri gerekmiştir. Yapılan başka bir çalışmada (Compaoré et al. 2013) geleneksel Bikalgadan izole edilen 10 adet *Bacillus* spp. (6 izolat *B. Subtilis* subsp. *subtilis* ve 4 izolat *B. licheniformis*) suşlarının antimikrobiyal aktivitesi agar spot assay ve agar kuyu difüzyon yöntemiyle 36 indikatör organizmalara, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere ve mayalara karşı araştırılmıştır. Spot assayda, *B. subtilis* subsp. *subtilis* C3 hariç, tüm *Bacillus* izolatlarının, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin en az birinin büyümesini inhibe ettiği fakat mayaların hiç birini inhibe etmediği gözlemlenmiştir. Buna karşın, agar kuyu difüzyon yöntemi kullanıldığında sadece Gram pozitif patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterilmiştir. Ayrıca, bazı *Bacillus* izolatlarının agar spot assay testinde inhibitör aktivite gösterdiği ancak agar kuyu difüzyon assayda indikatör suşlara karşı antimikrobiyal etki göstermediği kaydedilmiştir. Bir diğer çalışmada (BAŞBÜLBÜL 2009) ise doğal sıcak su kaynaklarından alınan su, birikinti ve toprak örneklerinden 208 adet termofilik bakteriler agar spot assay ile taranmış ve 45 adet izolatın *G. stearothermophilus* DSMZ 22 suşuna karşı antagonistik etki gösterdiği tespit edilmiştir ancak agar kuyu difüzyon metodu kullanıldığında pozitif çıkan suşlar çoğunda aktivite göstermemiştir. Çeşitli *Lactobacillus* suşu ile yapılan diğer bir çalışmada ise 14 suşdan sadece 3 tanesinin hem agar spot assay'da hem de agar kuyu yöntemiyle denendiğinde pozitif sonuç verdikleri görülmüştür (HARRIS et al. 1989).

Agar spot assay ile pozitif çıkan antimikrobiyal aktivitenin agar kuyu difüzyonunda gözlenmemesinin çeşitli nedenleri olabilmektedir. Örneğin, agar spot yönteminde, üretici koloniler ya daha fazla bakteriyosin üretebilmekte ya da yöntem boyunca sürekli olarak bakteriyosin salgılayabilmektedirler. Agar kuyu yönteminde ise, sınırlı miktarlarda bakteriyosin mevcut olduğundan, besiyerindeki indikatör bakteri ya inhibitörün proteolitik etkisi ile ya da bakteriyosine dirençli mutant bir popülasyonun büyümesi yoluyla bakteriyosin seviyelerinin üstesinden gelmesidir (HARRIS et al. 1989). Compaoré ve arkadaşlarına (Compaoré et al. 2013) göre spot assayda gözlemlenen inhibitör aktivite şu şekilde açıklamıştır: mikroorganizmalar ortamdaki besinler için birbirleriyle rekabet ederek farklı stratejiler geliştirebilmektedir ve bu stratejilerden biri antimikrobiyal madde üretebilmektir. Ek olarak, bir üretici suş,

hassas bir suş nedeniyle mevcut olan ortak bir maddeyi (indükleyici faktör) tanıdığında bakteriyosinlerin sentezini uyarılabilmektedir. Bir diğer araştırmacılar ise bakteriyosin benzeri bileşiğin üretici hücrenin duvarına bağlı olduğu ve bu yüzden, indikatör bakteri ile üretici bakteri temasta olamadığı sürece inhibisyon gözlenmeyeceği açıklanmıştır (Ammor et al. 2006; BAŞBÜLBÜL 2009; Vlaemynck, Herman, and Coudijzer 1994).

Bakteriyosinleri tespit etmek için spot assay yöntemi, çevirmeli plaka veya kuyucuk yöntemlerinden daha tekrarlanabilir, hızlı ve skorlaması kolaydır (Lewus and Montville 1991). Ancak spot assay’de, test edilen bakteriler üzerindeki bakteriyosinin veya benzer metabolitlerin inhibitör aktivitesi diğer metabolitleri de içerebilmektedir. Bu nedenle, antimikrobiyal aktivitenin bakteriyosin veya benzer metabolitler tarafından üretildiğini doğrulamak için agar spot testi ve agar kuyu difüzyon testi birlikte uygulanmalıdır (Çon and Gökalp 2000). Bu nedenle, bu çalışmada her iki yöntem birlikte uygulanmış ve agar kuyu difüzyon testinde en geniş inhibisyon zonuna (17.5 mm) sahip olan 28Q1 Bt suşu daha detaylı karakterizasyon çalışması için seçilmiştir. Öncelikle 28Q1’in büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiği incelenmiştir. TSB’da büyütülen bakterinin ilk 3 saatte lag fazında kaldığı ve 4. saatten itibaren logaritmik faza girdiği ve bu fazın 15. saatte maksimuma ulaştığı (OD 2.20) gözlenmiştir. Durgun fazda hücre büyümesi yavaşlamış ve 30. saatte maksimum OD’ye (2.50) ulaşmış olup 95. saatte OD 2.20’de kalmıştır (Şekil 3.4). Bakteriyosin üretim kinetiğine bakıldığında ise ilk 8 saatte maksimum düzeyde antimikrobiyal aktivite göstermiş olup (178AU/ml) 12. saatte aktivite hızlı bir şekilde düşmüş (20AU/ml) ve 24. saate kadar azalarak devam etmiştir. Aktivite 30. saatte tamamen kaybolmuştur. Diğer bir deyişle, bakteriyosin üretimi erken logaritmik fazda başlamış ve logaritmik fazın sonunda maksimum düzeye çıkmıştır. Durgun fazda üretim tamamen sona ermiştir.

Literatürde bu konuda yapılan çalışmalara bakıldığında, benzer ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, *Bt subsp. kurstaki*’nin büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiğini inceleyen (Ugras et al. 2013), bakteriyosin üretiminin primer metabolit olarak büyüme döngüsünün erken logaritmik fazında başladığını ve durgun fazın ortasında maksimum seviyeye ulaştığını göstermişlerdir. Bu bakımdan bu veriler bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla uyumludur çünkü bakteriyosin üretimi primer

metabolit olarak erken logaritmik evrede başlamış ve durgun fazın başında bitmiştir. Buna karşın, (Barboza-Corona et al. 2007a)'nın çalışmasında, Bt suşlarında bakteriyosin benzeri madde üretiminin bazı Bt suşlarda logaritmik fazın ortasında, bazılarında ise durgun fazın başlangıcında gerçekleştiği kaydedilmiştir.

Antimikrobiyal aktivitesinin azalması ve daha sonra kaybolmasının nedeni, üretici hücreler tarafından adsorpsiyon veya hücre dışı proteazları tarafından degradasyon ile gerçekleşmiş olabilir. Proteazlar *Bacillus* türleri tarafından sıklıkla üretilmektedir (Bizani and Brandelli 2002). *Bacillus thuringiensis*' den tochisin (Paik et al. 1997), *Bacillus licheniformis* P40' den bakteriosin benzer peptid (Cladera-Olivera, Caron, and Brandelli 2004) ve *Enteromccus fueczum* DPC1146' den enterocin 1146 (Parente and Ricciardi 1994) üretiminde benzer sonuçlar elde edilmiş olup logaritmik fazın başında üretilmeye başlamışlar ve durağan faz esnasında ise azaldıkları belirlenmiştir. F. Cladera-Olivera ve arkadaşlarına (Cladera-Olivera, Caron, and Brandelli 2004) göre bakteriyosin benzeri peptid logaritmik fazda üretilirken birincil metabolit olarak kabul edilebilmektedir.

Bakteriyosin benzeri peptid üretiminde bazı çalışmalar farklı sonuçlar vermiştir. S. Chehimi ve arkadaşları (Chehimi vd. 2007) *B. thuringiensis* HD198 suşu tarafından üretilen thurisin S orta logaritmik fazda (5 saat) saptanabilmiş, durağan fazda maksimum seviyeye ulaşmış ve 40 saat inkübasyona kadar thurisin S seviyesinin değişmeden kaldığı belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada (Chauhan, Maheshwari, and Bajpai 2017) *B. cereus* TSH58 suşu tarafından sentezlenen bakteriyosinin erken durağan fazdan (16 saat) sonra sentezlenmeye başladığı ve 32 ila 36 saatlik inkübasyon arasında maksimum düzeye ulaştığı gözlenmiştir.

Bütün bu çalışmalar Bt suşlarında bakteriyosin benzeri madde üretiminin bazı suşlarda logaritmik fazın başlarında veya ortasında, bazılarında ise durgun fazın başlangıcında gerçekleştiğini göstermektedir. Bu veriler antimikrobiyal etkiye sahip bakteriyosin benzeri maddelerin *Bacillus thuringiensis* suşlarında primer metabolit veya sekonder metabolit olarak üretilbildiğini göstermektedir.

Bacillus thuringiensis 28Q1 suşu tarafından üretilen bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, proteolitik enzim ve organik çözücülerin etkileri araştırılmıştır. Bunun

için 28Q1'deki bakteriyosin üretiminin en yoğun olduğu zaman olan 8 saatlik bakteri kültüründen süpernatant elde edilmiştir.

Farklı sıcaklıkların bakteriyosin benzeri maddenin antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında, 30°C'de ve 40°C'de maksimum aktivite gösterdiği fakat 50°C'de aktivitenin %47'ye düştüğü tespit edilmiştir. Hatta 50°C'de 2 saat tutulan bakteriyosin benzeri maddenin aktivitesinin tamamen kaybolduğu görülmüştür (Şekil 3.6).

Bu veriler bakteriyosin benzeri maddenin sıcaklık toleransının kısmen düşük olduğunu göstermektedir. Literatürde elde edilen bakteriyosin benzeri maddelerin antimikrobiyal etkileri farklı sıcaklıklarda farklı etkiler göstermişlerdir. Örneğin, *Streptococcus thermophilus* 81suşun kültür supernatantındaki antimikrobiyal madde, 70°C, 80°C, 100°C ve 121°C'de tamamen inaktif hale gelmiştir. 60°C'de kritik sıcaklık gözlenmiş ve aktivite 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda 15 dakika sonra tamamen yok olmuştur. Bu yeni bakteriyosinin ısıya karşı duyarlı olduğu belirtilmiştir (Ivanova et al. 1998).

Lactobacillus rhamnosus GP1 tarafından sentezlenen bakteriyosin aktivitesinin 30°C'de diğer inkübasyona kıyasla (20, 25, 35 ve 40°C) maksimum (1200 AU/mL) olduğu kaydedilmiş ve bakteriyosin üretimi için ortam büyüme sıcaklığının önemli bir rol oynadığı gözlenmiştir (Sarika, Lipton, and Aishwarya 2010). Buna karşın, diğer bazı bakteriyosinlerin sıcaklığa dayanıklı olduğu bulunmuştur. *Bacillus thuringiensis* NEB17 suşu bakteriyosininin (thurisin 17) 45, 60, 80°C'de 30 dk ve 100°C'de 15 dk inkübasyondan sonra aktivitesinin stabil olduğu, ancak 121°C'de 5 dk. inkübasyon sonrası aktivitesinin tamamen kaybolduğu belirlenmiştir (Gray et al. 2006). Thuricin 439B'nin, 80°C'ye maruz kaldıktan sonra aktivitesini koruduğu ancak 121°C 15 dk'da aktivitesini tamamen kaybettiği bulunmuştur (Ahern, Verschueren, and Van Sinderen 2003). *Bacillus amyloliquefaciens* B10 tarafından sentezlenen bakteriyosin aktivitesi 30, 45, 60, 90°C 30dk' da stabil iken aktivite 90°C 2 saat'de ve 121°C'de 20 dk'da kaybolmuştur (KARAOGLU, SEVİM, and SEVİM 2014). *Lactobacillus plantarum* suşundan elde edilen bakteriyosin 30 dk boyunca 30, 60,80, 100°C'de inkübasyona tabi tutulduğunda aktivitesini koruduğu; 121°C'de 15 dk bekletildiğinde bile aktivitesini anlamlı bir şekilde devam ettirdiği

fakat 121°C’de 30 dk inkübasyondan sonra aktivitede anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir (Zangeneh, Khorrami, and Khaleghi 2020).

Bu çalışmada, bakteriyosin benzeri maddenin farklı pH’lerde aktivitesi incelendiğinde, pH 5-10 aralığında %70 üzerinde aktivite gösterdiği; pH 6 ve pH 7’de en iyi aktiviteyi gösterdiği (%100); pH 4’de ise %62 aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.7.). Veriler Bt 28Q1’den elde edilen bakteriyosin benzeri maddenin geniş bir pH aralığına karşı toleranslı olduğunu göstermiştir. Buna karşın, literatürdeki diğer çalışmalarda farklı pH aralıkları tespit edilmiştir. *Bacillus amyloliquefaciens* B10 tarafından üretilen bakteriyosin pH 3-9 arasında aktivite göstermesine rağmen, optimum aktivite pH 7’de gözlenmiştir (KARAOGLU, SEVİM, and SEVİM 2014). *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* tarafından üretilen nisin P geniş bir pH (3–8) spektrumuna sahiptir (Aldarhami et al. 2020). Diğer bazı çalışmalarda bakteriyosinin daha geniş pH aralığında kararlı olduğu bulunmuştur. Örneğin, *Bacillus subtilis* GAS101 tarafından sentezlenen bakteriosinin pH 2-12’de aktivitesinin değişmediği, Thurisin 439’un ise pH 2-9’da aktivitesini koruduğu belirlenmiştir (Gray et al. 2006; G. Sharma et al. 2018). Bir diğer çalışmada kısmi olarak saflaştırılan Bt bakteriyosinin pH 5-11 arasında kararlı olduğu gösterilmiştir (Barboza-Corona et al. 2007a). Bu çalışmamızda elde edilen bakteriyosinin sıcaklık aralığı morricin ve kurtacin’e benzerken, pH aralığı entomicin ve tolworthcin’e daha yakındır (Barboza-Corona et al. 2007a).

Bt 28Q1 suşundan elde edilen CFS Aseton, Metanol, Etanol, DMSO gibi organik çözücülerle muamele edildiğinde aktivitesini koruduğu fakat deterjan Triton X-100 muamele edildiğinde aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Araştırmacılar, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110 suşunun ürettiği bakteriyosin içeren süpernatantı %10 organik çözücüler içinde 25°C’de 1 saat (Aseton, Metanol, Etanol) inkübasyona bıraktıklarında bakteriyosin aktivitesinin hiç etkilenmediğini tespit etmişlerdir (Ameur Cherif et al. 2008). Benzer şekilde, *Bacillus cereus* tarafından üretilen bakteriyosin (cerein7) ile yapılan benzer çalışmada, %10 aseton, metanol veya etanol içinde 1 saat 25°C de muamele edildiğinde aktivitenin etkilenmediği; buna karşın, iyonik olmayan deterjan olan % 0.2 Triton X-100 ile muameleden sonra aktivitenin arttığı gözlenmiştir (Naclerio et al. 1993).

Çeşitli enzimlerin 28Q1 supernatantının antimikrobiyal aktivitesi üzerinde etkisi incelenmiştir. Enzimler son konsantrasyon 1 mg/ml olarak kullanılmış ve örnekler 2 saat enzimle muamele edilmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında Proteinaz K ve lipaz enzimleriyle muamelede aktivitenin tamamen kaybolduğu; tripsin ile aktivitenin kısmen azaldığı; α -amilazda ise aktivitede çok az bir azalma olduğu görülmüştür (Şekil 3.14). Aktivitenin lipazdan sonra kaybının nedeni ise antimikrobiyal aktiviteye dahil olan bir lipid parçasının varlığı olabilir (Jack, Tagg, and Ray 1995; Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn 2006).

Proteinaz K ve lipaz enzimleriyle aktivitenin kaybolması bakteriyosin benzeri maddenin bir lipoprotein olduğunu göstermektedir. Günümüzde bakteriyel lipoproteinlerin (Lpp) bütün bakterilerde bulunduğu ve bunların çeşitli metabolik işlemlerde yer aldığı bilinmektedir (Nguyen et al. 2020), *Bacillus*'u da içeren 7 genustan 14 bakteri türü kıyaslandığında Lpp genlerin sayısının türden türe değişiklik gösterdiği ve bu genlerin bakteriyel genomun %1-3'ünü oluşturduğu açıklanmıştır. Gram + bakteri Lpp'sinin büyük çoğunluğu ABC transport sisteminin substrata bağlanma proteinleridir ve genellikle iyon taşınımında yer alırlar. Aynı zamanda Lpp'lerin belli miktarda çevreye salındıkları da bilinmektedir.

Bt 28Q1 bakteriyosinin tripsin ile muamelede aktivitesinin tamamen kaybolmamasının nedeni *Bacillus* türlerinin sıra dışı aminoasitler içeren halkasal antimikrobiyal maddeler üretmesinden olabileceği düşünülmektedir (Cladera-Olivera, Caron, and Brandelli 2004). Diğer bir çalışmada, *Basillus subtilis* PB6 bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesinin pronaza duyarlı ve tripsine kısmen duyarlı olması proteinli bir yapıya sahip olduğunu düşündürmüştü; ancak, tripsine maruz kaldıktan sonra antimikrobiyal aktivitenin çoğunun korunmuş olması molekülün lipid veya karbonhidrat kısımları da içerebileceğine dair dolaylı kanıt sağlamıştır (Teo and Tan 2005). Benzer şekilde, 28Q1 bakteriyosinin tripsin varlığında aktivitesinin bir kısmını korumasının nedeni molekülün lipid yapısını da içerdiğini göstermektedir.

Bacillus subtilis subsp. *subtilis* H4 suşu ile yapılan başka bir çalışmada ise bakteriyosin çeşitli enzimlere maruz bırakıldığında proteaz ve tripsine duyarlı; proteinaz K ve papaine dirençli; fakat α -amilaz ve lipaz II uygulamaları ile

antimikrobiyal etkinin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, belirtilen antimikrobiyal aktivite için bir lipid ve şeker parçasının sorumlu olduğu anlaşılmıştır (Compaoré et al. 2013). Bakteriyosin aktivitesi üzerine proteolitik ve lipolitik enzimlerin etkisinin denendiği diğer bir çalışmada ise *Lactobacillus plantarum* TF711 suşundan elde edilen bakteriyosin kullanmıştır. Proteinaz K, pepsin, tripsin, α -chromotrypsin, pronaz E, lipaz A, ve α -amilaz enzimleriyle muamele edilen bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesi proteolitik enzimlerle tamamen kaybolmuş; α -amilaz ve lipazda ise aktivite sırasıyla tamamen ve kısmen inaktif hale gelmiştir. Bu durum, bakteriyosinin biyolojik aktivitesi için bir glikozidik ve bir lipidik parçanın gerekliliğini göstermektedir (Hernández, Cardell, and Zárate 2005).

Yukarıdaki çalışmalarda da görüldüğü gibi bakteriyosinlerin antimikrobiyal aktivitesinde rol alan moleküllerin protein, lipid ve karbohidrat yapısında olabildikleri görülmektedir. Benzer şekilde 28Q1 bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesinde protein ve lipid yapıların etki gösterdiği anlaşılmaktadır.

Değişik besi ortamlarının Bt 28Q1 suşu bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde TSB besiyerinde ilk 8 saatte aktivite maksimumken, 16 ve 24 saatte sırasıyla 22 AU/ml 'e ve 11 AU/ml'ye düşmüştür (3.12). Buna karşın, ilk 8 saatte MHB besiyerinde 22 AU/ml aktivite; NB besiyerinde ise 11AU/ml aktivite tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite 16 ve 24 saatte MHB ve NB'da tamamen yok olmuştur. Diğer *Bacillus* türlerinden *B. amyloliquefaciens* B10 tarafından üretilen bakteriyosin benzeri peptitin en yüksek antimikrobiyal aktivitesinin MHB'da; en düşük aktivitenin ise TSB'de görüldüğü kaydedilmiştir (KARAOGLU, SEVİM, and SEVİM 2014). Diğer bir çalışmada, *Klebsiella pneumoniae* 158 suşu farklı besi yerlerinde (TSB, LB, BHI, THB, N.B, ve PW'de) büyütülmüş ve maksimum bakteriyosin üretiminin TSB'de olduğu gözlenmiştir (Chhibber and Vadehra 1989). Benzer şekilde, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* tarafından entomocin 110 üretimi üzerinde yapılan çalışmada LB, T3 ve BHI besiyerlerine kıyasla TSB ve LB besiyerlerinde entomocin 110 üretimi daha yüksek düzeyde gerçekleştiği tespit edilmiştir (Ameur Cherif et al. 2008). Bütün bu çalışmaların ışığında, farklı besi yerlerinin değişik düzeyde bakteriyosin üretimine yol açması, bakteriyosin gen ekspresyonuna neden olan optimum etmenlerdeki

farklılıklardan veya bakteriyosin sentezini baskılayan inhibitör içeriklerinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Bacillus thuringiensis'de *hag* geni H serotiplemesinde immünolojik reaksiyondan sorumlu bir protein olan flagellin'i kodlar. Spesifik flagellin aminoasit sekansı spesifik Bt serotipiyle korelasyon gösterir. Bt 28Q suşunun Bt olduğunu teyit etmek ve alt türünü belirlemek amacıyla hem 16S rDNA hem de *hag* geni dizi analizi yapılmıştır. Gerçekleştirilen biyoinformatik analizler sonucu 28Q1 suşunun %99 benzerlik ile *Bacillus thuringiensis subsp. tochiensis* olduğu bulunmuştur.

Kısmi olarak saflaştırılan BBPP'nin moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla %15'lik SDS-PAGE gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda gerçekleştirilen %15'lik SDS-PAGE jel *overlay* deneyinde, *B. cereus*'a karşı oluşan antikikrobiyal aktivite bantı moleküler ağırlık kuyucuğundaki bantlarla kıyaslandığında yaklaşık 12 kDa ağırlığındaki banta karşılık geldiği görülmektedir (Şekil 3.21). Dolayısıyla, BBPP'nin moleküler ağırlığının yaklaşık 12 kDa'luk bir bakteriyosin benzeri peptid olduğu söylenebilir. Diğer araştırmacılar (Barboza-Corona et al. 2007a; De La Fuente-Salcido et al. 2008), Meksika'nın *Bacillus thuringiensis* suşlarından elde ettikleri tolworthcin 524, entomocin 420, kenyacin 404, kurstacin 287, morricin 269 isimli bakteriyosinlerin 10kDa'luk protein hizasında antimikrobiyal aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir.

B. thuringiensis'in farklı suşları tarafından sentezlenen toplam 18 bakteriyosin tanımlanmış bulunmaktadır (Salazar-Marroquín et al. 2016). Bakteriyosinlerin moleküler ağırlıkları 1 kDa'dan (thuricin) 12.4 kDa'a kadar (entomicin 9) değişmektedir. Araştırmacılar (Su et al. 2020) Bt 4AJ1 tarafından sentezlenen bir bakteriyosin olan thuricin 4AJ1'in 6.5 kDa'luk yeni bir thuricin olduğunu göstermişlerdir. Bt'nin bir alt türü *entomocidus* 3 farklı peptid (thuricin S, entomocin110 ve entomocin 9) sentezleyebileceği gibi, aynı peptid farklı alt türler tarafından da sentezlenebilmektedir. Dolayısıyla, bu çalışmada elde edilen BBPP, moleküler ağırlık bakımından birbirine benzediği için entomicin 9 olabilir. İlerde yapılacak protein sekansı ve proteomik çalışmalar BBPP'nin tam karakterizasyonunu sağlayacaktır.

Bunlara ilaveten, literatürde çeşitli Bt suşlarının farklı moleküler ağırlıkta bakteriyosin ürettikleri tespit edilmiştir. Örneğin, *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* 'den yaklaşık 10.5 kDa (Paik et al. 1997); Bt'nin CF13 ve CF42 toprak suşlarından 10 kDa ve 15kDa (la Cruz D et al. 2018); Bt BMG1.7 tarafından sentezlenen (thuricin 7) ve 11.6 kDa (A. Cherif et al. 2001) ağırlığında olan bakteriyosinler tanımlanmıştır. Ayrıca, mangodan izole edilen *Bacillus subtilis* VS suşunun ürettiği bakteriyosinin 31.2 kDa olduğu açıklanmıştır (V. Sharma et al. 2021).

B. thuringiensis tarafından sentezlenen bakteriyosinlerin mikroorganizmalara karşı geniş antimikrobiyal spektrum gösterdiği bilinmektedir (Salazar-Marroquín et al. 2016). Buna karşın, bu çalışmada elde edilen 28Q1 BBPP sadece gram pozitif bakterilerden, farklı *Bacillus* türleri üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Tablo 3.5). Diğer Gram + ve Gram- bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki gözlenmemiştir. Ayrıca, *C. albicans* üzerinde de etki kaydedilmemiştir. Gram+ bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler genellikle Gram+ mikroorganizmalar üzerinde etkilidirler. Gram- bakterilerin dış membranı geçirgenlik bariyeri oluştursa da bazı bakteriyosinlerin Gram- bakteriler üzerinde de etkili olduklarını gösteren çalışmalar bilinmektedir (Salazar-Marroquín et al. 2016). Bununla birlikte, Bt 28Q1 bakteriyosinin sadece Gram + olan farklı *Bacillus* türleri üzerinde etkili olması (Riley and Wertz 2002) destekler niteliktedir. Şöyle ki, bakteriyosinler geleneksel antibiyotiklerden önemli bir ölçüde farklılık gösterirler, nispeten dar öldürme spektrumuna sahiptirler ve yalnızca bakteriyosini üreten suş ile yakından ilişkili bakteriler için toksiktirler (Riley and Wertz 2002).

Benzer sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir. Örneğin, Bt subsp. *tochigiensis* HD868 tarafından üretilen tochisin test edilen tüm *B. thuringiensis* suşlarına ve *B. cereus* KCTC 1014'e karşı dar bir aktivite spektrumu göstermiş; buna karşın, *B. subtilis*, *B. megaterium* ve *B. sphaericus* gibi *Bacillus* suşlarına, laktik asit bakterilerine, *Escherichia coli*, Gram negatif bitki patojenlere ve mayalara karşı etkili olmadığı kaydedilmiştir (Paik et al. 1997). Buna ilaveten, G. Naclerio ve arkadaşları (Naclerio et al. 1993) gıdalardan izole edilen *Bacillus cereus* 'un ürettiği bakteriyosin olan cerein'nin diğer *B. cereus* suşlarına karşı spesifik olarak aktif ve test edilen diğer tüm bakterileri türlerine karşı inaktif olduğunu bildirmişlerdir.

Cerein'in dar spektrum özgüllüğü, besinlerde normalda bulunan bakterilere müdahale etmeden *Bacillus cereus* büyümesini baskılamak için fayda olabildiğı açıklanmıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bacillus türleri, hücre dışı ortama protein salgılama konusundaki güçlü kapasiteleri, mükemmel güvenlik kayıtları ve hızlı büyüme oranlarının neden olduğu hızlı fermantasyon döngüleri gibi bir dizi avantajları nedeniyle gıda endüstrisi için çok önemlidir.

Antibiyotiklere dirençli bakteriyel hastalıkların artması, dünya çapında hem insanlar hem de hayvanlar için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Basillerden üretilen AMP'ler bakteriyosin gibi geniş özgüllükleri ve çeşitli enfeksiyonlara karşı spesifik ve hızlı öldürme etkileri nedeniyle, geleneksel antibiyotiklerin yerine kullanılmaktadır. Ayrıca, bakteriyosinler gıdaları patojenik mikroorganizmalara karşı korumak için önemli rol oynarlar.

Bacillus thuringiensis sporlanma sırasında insektisidal kristal proteinler ve büyümenin vejetatif fazı sırasında Vip proteinler oluşturma kabiliyeti nedeniyle biyopestisit olarak kullanılan en değerli entomopatojenik bakterilerden biridir. Ayrıca, Bt özellikle bakteriyosinler olmak üzere antimikrobiyal madde üretme konusunda önemli bir kapasiteye sahiptir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, Bt koleksiyonumuzda bulunan ve zeytin alanlarında toplanıp karakterize edilmiş olan 100 adet Bt suşunun bakteriyosin üretme potansiyelleri araştırılmıştır.

Yapılan çalışmada, 9 adet Bt suşu hem agar spot hem de agar kuyu difüzyon yöntemiyle indikatör bakteri *Bacillus cereus* ATCC 11778'e karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu suşlar arasından en geniş inhibisyon zonu (17.5 mm) oluşturan 28Q1 suşu seçilerek bakteriyosin üretimi ve karakterizasyonunda kullanılmıştır. Büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiğine göre, maksimum bakteriyosin üretimi ilk 8 saatte ve logaritmik fazın başlarında gerçekleşmiştir. Bakteri kültüründen elde edilen supernatantın (CFS) en yüksek antimikrobiyal aktivitesi 30°C ve 40°C'de gözlenmiş ve 50°C'de aktivite yarıya inmiştir. CFS'nin antimikrobiyal aktivitesinin geniş bir pH aralığına (4-10) sahip olduğu ve çeşitli organik çözücülere karşı kararlı olduğu görülmüştür. Bakteriyosin benzeri antimikrobiyal madde üretiminde TSB'nin en etkili besi yeri olduğu tespit edilmiştir.

Çeşitli enzimlerle muamele edildiğinde inhibitör maddenin protein ve lipid içeren bir lipoprotein olduğu anlaşılmıştır. CFS'daki inhibitör maddenin nispeten dar bir antimikrobiyal spektruma sahip olduğu ve sadece yakın akrabaları inhibe ettiği gözlenmiştir. Ayrıca, 16SrDNA ve *hag* geni dizi analizleri Bt 28Q1 suşunun *Bacillus thuringiensis* subsp. *tocheigensis* olduğunu göstermiştir. Son olarak, SDS-PAGE analizi ve *Jel overlay assay* sonuçlarına göre, antimikrobiyal aktivite gösteren proteinin yaklaşık 12 kDa moleküler ağırlıkta olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, *B. thuringiensis* 28Q1 suşundan elde edilen ve geniş pH aralığı ve belirli sıcaklık toleransına sahip olan bakteriyosin benzeri protein (BBPP) besin paketlenmesinde, *B. cereus* gibi toksin üreten ve ishale yol açan bakterilerin büyümesini engellemek için koruyucu veya biyoaktif molekül olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Gelecekte yapılacak protein saflaştırma, sekans analizleri ve proteomik çalışmalar BBPP'nin daha detaylı karakterizasyonuna ve ilgili genin klonlanmasına önemli katkı sağlayacaktır. Ayrıca, BBPP'nin antimikrobiyal etki mekanizmalarını açıklığa kavuşturacak ilave çalışmalara gereksinim vardır. Genetik mühendisliği ve protein mühendisliği teknikleriyle yapılacak çalışmalar bakteriyosinin sıcaklık spektrumunu genişletebilecektir.

KAYNAKÇA

- Abdelmalek, Nouha et al. 2016. "Molecular Characterisation of *Bacillus Thuringiensis* Strain MEB4 Highly Toxic to the Mediterranean Flour Moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)." *Pest Management Science* 72(5): 913–21.
- Abriouel, Hikmate, Charles M A P Franz, Nabil Ben Omar, and Antonio Gálvez. 2011. "Diversity and Applications of *Bacillus* Bacteriocins." *FEMS microbiology reviews* 35(1): 201–32.
- Ahern, Melissa, Saskia Verschuere, and Douwe Van Sinderen. 2003. "Isolation and Characterisation of a Novel Bacteriocin Produced by *Bacillus Thuringiensis* Strain B439." *FEMS Microbiology Letters* 220(1): 127–31.
- Aldarhami, Abdu, Arif Felek, Vikram Sharma, and Mathew Upton. 2020. "Purification and Characterization of Nisin P Produced by a Strain of *Streptococcus Gallolyticus*." *Journal of Medical Microbiology* 69(4): 605–16.
- Ammor, Salim, Grégoire Tauveron, Eric Dufour, and Isabelle Chevallier. 2006. "Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria against Spoilage and Pathogenic Bacteria Isolated from the Same Meat Small-Scale Facility. 1 - Screening and Characterization of the Antibacterial Compounds." *Food Control* 17(6): 454–61.
- Baindara, Piyush et al. 2013. "Characterization of Two Antimicrobial Peptides Produced by a Halotolerant *Bacillus Subtilis* Strain SK. DU. 4 Isolated from a Rhizosphere Soil Sample." *AMB express* 3(1): 1–11.
- Balciunas, Eduardo Marcos et al. 2013. "Novel Biotechnological Applications of Bacteriocins: A Review." *Food Control* 32(1): 134–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>.
- Barboza-Corona, J. Eleazar, Herminia Vázquez-Acosta, Dennis K. Bideshi, and Rubén Salcedo-Hernández. 2007a. "Bacteriocin-like Inhibitor Substances Produced by Mexican Strains of *Bacillus Thuringiensis*." *Archives of Microbiology* 187(2): 117–26.
- Barboza-Corona, J. Eleazar, Herminia Vázquez-Acosta, Dennis K. Bideshi, and Rubén Salcedo-Hernández. 2007b. "Bacteriocin-like Inhibitor Substances Produced by Mexican Strains of *Bacillus Thuringiensis*." *Archives of Microbiology* 187(2): 117–26.
- BAŞBÜLBÜL, G. 2009. "Çeşitli Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Ürettikleri Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması." : 223.
- Bizani, D., and A. Brandelli. 2002. "Characterization of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated *Bacillus* Sp. Strain 8 A." *Journal of Applied Microbiology*

93(3): 512–19.

- Bizani, D., A. P.M. Dominguez, and Adriano Brandelli. 2005. “Purification and Partial Chemical Characterization of the Antimicrobial Peptide Cerein 8A.” *Letters in Applied Microbiology* 41(3): 269–73.
- Bode, Helge B. 2009. “Entomopathogenic Bacteria as a Source of Secondary Metabolites.” *Current Opinion in Chemical Biology* 13(2): 224–30.
- Cascales, Eric et al. 2007. “Colicin Biology.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71(1): 158–229.
- Castiglione, Franca et al. 2008. “Determining the Structure and Mode of Action of Microbisporicin, a Potent Lantibiotic Active Against Multiresistant Pathogens.” *Chemistry and Biology* 15(1): 22–31.
- Cavera, Veronica L., Timothy D. Arthur, Dimitri Kashtanov, and Michael L. Chikindas. 2015. “Bacteriocins and Their Position in the next Wave of Conventional Antibiotics.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 46(5): 494–501. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.07.011>.
- Chauhan, Ankit Kumar, Dinesh Kumar Maheshwari, and Vivek K. Bajpai. 2017. “Isolation and Preliminary Characterization of a Bacteriocin-Producer Bacillus Strain Inhibiting Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus.” *Acta Biologica Hungarica* 68(2): 208–19.
- Chehimi, Sonia et al. 2007. “Purification and Partial Amino Acid Sequence of Thuricin S, a New Anti-Listeria Bacteriocin from Bacillus Thuringiensis.” *Canadian Journal of Microbiology* 53(2): 284–90.
- Cherif, A. et al. 2001. “Thuricin 7: A Novel Bacteriocin Produced by Bacillus Thuringiensis BMG1.7, a New Strain Isolated from Soil.” *Letters in Applied Microbiology* 32(4): 243–47.
- Cherif, Ameer et al. 2008. “Characterization and Partial Purification of Entomocin 110, a Newly Identified Bacteriocin from Bacillus Thuringiensis Subsp. Entomocidus HD110.” *Microbiological Research* 163(6): 684–92.
- Chhibber, S., and D. V. Vadehra. 1989. “Effect of Medium on the Bacteriocin Production by Klebsiella Pneumoniae.” *Folia Microbiologica* 34(2): 99–105.
- Cladera-Olivera, F., G. R. Caron, and A. Brandelli. 2004. “Bacteriocin-like Substance Production by Bacillus Licheniformis Strain P40.” *Letters in Applied Microbiology* 38(4): 251–56.
- Coates, Anthony, Yanmin Hu, Richard Bax, and Clive Page. 2002. “The Future Challenges Facing the Development of New Antimicrobial Drugs.” *Nature Reviews Drug Discovery* 1(11): 895–910.
- Collins, Barry et al. 2010. “TelA Contributes to the Innate Resistance of Listeria Monocytogenes to Nisin and Other Cell Wall-Acting Antibiotics.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(11): 4658–63.

- Compaoré, Clarisse S. et al. 2013. "Co-Production of Surfactin and a Novel Bacteriocin by *Bacillus Subtilis* Subsp. *Subtilis* H4 Isolated from Bikalga, an African Alkaline Hibiscus Sabdariffa Seed Fermented Condiment." *International Journal of Food Microbiology* 162(3): 297–307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.013>.
- Çon, Ahmet Hilmi, and Hüsnü Yusuf Gökalp. 2000. "Production of Bacteriocin-like Metabolites by Lactic Acid Cultures Isolated from Sucuk Samples." *Meat Science* 55(1): 89–96.
- Cooper, Lisa E., Bo Li, and Wilfred A. van der Donk. 2010. "Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics." *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology* 5: 217–56.
- Cotter, Paul D., Colin Hill, and R. Paul Ross. 2005. "Food Microbiology: Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food." *Nature Reviews Microbiology* 3(10): 777–88.
- la Cruz D, Lopez de et al. 2018. "Antibacterial Activity of Native *Bacillus Thuringiensis* Strains from Fernandez Canyon State Park, Mexico." *Journal of Antimicrobial Agents* 04(01).
- David, Francisco Lafuente-Rincon, Elizabeth Velasquez Chavez Tania, and M. De la Fuente-Salcido Norma. 2016. "Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria: Features and Biotherapeutic Approach." *African Journal of Microbiology Research* 10(45): 1873–79.
- Delves-Broughton, Joss. 2012. *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings Natural Antimicrobials as Additives and Ingredients for the Preservation of Foods and Beverages*. Woodhead Publishing Limited. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-84569-811-9.50006-2>.
- Diaz, Marta et al. 2003. "Characterization of a New Operon, as-48EFGH, from the as-48 Gene Cluster Involved in Immunity to Enterocin AS-48." *Applied and Environmental Microbiology* 69(2): 1229–36.
- Diep, Dzung B. et al. 2007. "Common Mechanisms of Target Cell Recognition and Immunity for Class II Bacteriocins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(7): 2384–89.
- Drider, Djamel et al. 2006. "The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(2): 564–82.
- Duquesne, Sophie, Delphine Destoumieux-Garzón, Jean Peduzzi, and Sylvie Rebuffat. 2007. "Microcins, Gene-Encoded Antibacterial Peptides from Enterobacteria." *Natural product reports* 24(4): 708–34.
- Favret, Montgomery E., and Allan A. Yousten. 1989. "Thuricin: The Bacteriocin Produced by *Bacillus Thuringiensis*." *Journal of Invertebrate Pathology* 53(2): 206–16.
- Feldgarden, Michael, and Margaret A. Riley. 1998. "High Levels of Colicin

- Resistance in *Escherichia Coli*.” *Evolution* 52(5): 1270–76.
- de Freire Bastos, Maria Do Carmo, Marcus Lívio Varella Coelho, and Olinda Cabral da Silva Santos. 2015. “Resistance to Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria.” *Microbiology (United Kingdom)* 161(4): 683–700.
- Gautam, Neha, Hitender Kumar Sharma, and Nivedita Sharma. 2020. “Efficacy of Purified Bacteriocin of ‘*Brevibacillus Laterosporus* TK3’ against *Listeria Monocytogenes* and *Staphylococcus Aureus* in Chicken.” *Asian Journal of Dairy and Food Research* I(OFF): 1–6.
- Gharsallaoui, Adem, Nadia Oulahal, Catherine Joly, and Pascal Degraeve. 2016. “Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(8): 1262–74.
- Gillor, Osnat, Benjamin C Kirkup, and Margaret A Riley. 2004. “Colicins and Microcins: The next Generation Antimicrobials.” *Advances in applied microbiology* 54(18): 129–46.
- Gray, E. J. et al. 2006. “A Novel Bacteriocin, Thuricin 17, Produced by Plant Growth Promoting Rhizobacteria Strain *Bacillus Thuringiensis* NEB17: Isolation and Classification.” *Journal of Applied Microbiology* 100(3): 545–54.
- Hancock, Robert E.W., and Daniel S. Chapple. 1999. “Peptide Antibiotics.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(6): 1317–23.
- HARRIS, L. J., M. A. DAESCHEL, M. E. STILES, and T. R. KLAENHAMMER. 1989. “Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria Monocytogenes*.” *Journal of Food Protection* 52(6): 384–87.
- Hassan, M. et al. 2012. “Natural Antimicrobial Peptides from Bacteria: Characteristics and Potential Applications to Fight against Antibiotic Resistance.” *Journal of Applied Microbiology* 113(4): 723–36.
- Hernández, D., E. Cardell, and Victoria Zárate. 2005. “Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Tenerife Cheese: Initial Characterization of Plantaricin TF711, a Bacteriocin-like Substance Produced by *Lactobacillus Plantarum* TF711.” *Journal of Applied Microbiology* 99(1): 77–84.
- Hill, Colin, Lorraine Draper, R. Ross, and Paul Cotter. 2008. “Lantibiotic Immunity.” *Current Protein & Peptide Science* 9(1): 39–49.
- Hill, Colin, Mary C. Rea, and R. Paul Ross. 2008. “Thuricin CD, an Antimicrobial for Specifically Targeting *Clostridium Difficile*.” 2(12). <https://patents.google.com/patent/US8852917B2/en>.
- Hoover, Dallas G, and Larry R Steenson. 2014. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press.
- Islam, Mohammad R., Jun Ichi Nagao, Takeshi Zendo, and Kenji Sonomoto. 2012. “Antimicrobial Mechanism of Lantibiotics.” *Biochemical Society Transactions* 40(6): 1528–33.

- Ivanova, I. et al. 1998. "Characterization of a Bacteriocin Produced by *Streptococcus Thermophilus* 81." *International Journal of Food Microbiology* 42(3): 147–58.
- Izquierdo, Esther et al. 2008. "Production of Enterocins L50A, L50B, and IT, a New Enterocin, by *Enterococcus Faecium* IT62, a Strain Isolated from Italian Ryegrass in Japan." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52(6): 1917–23.
- Jack, Ralph W., John R. Tagg, and Bibek Ray. 1995. "Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria." *Microbiological Reviews* 59(2): 171–200.
- Jianhua, Xie, Zhang Rijun, Shang Changjiang, and Guo Yaoqi. 2009. "Isolation and Characterization of a Bacteriocin Produced by an Isolated *Bacillus Subtilis* LFB112 That Exhibits Antimicrobial Activity against Domestic Animal Pathogens." *African Journal of Biotechnology* 8(20): 5600–5608.
- Johnsen, Line, Gunnar Fimland, and Jon Nissen-Meyer. 2005. "The C-Terminal Domain of Pediocin-like Antimicrobial Peptides (Class IIa Bacteriocins) Is Involved in Specific Recognition of the C-Terminal Part of Cognate Immunity Proteins and in Determining the Antimicrobial Spectrum." *Journal of Biological Chemistry* 280(10): 9243–50. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M412712200>.
- Jouzani, Gholamreza Salehi, Elena Valijanlian, and Reza Sharafi. 2017. "Bacillus Thuringiensis: A Successful Insecticide with New Environmental Features and Tidings." *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(7): 2691–2711.
- KARAOGLU, Seyma SENSOY, Ali SEVİM, and Elif SEVİM. 2014. "Production and Characterization of Bacteriocin-like Peptide Produced by *Bacillus Amyloliquefaciens* B10." *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi* 30(5): 338–45.
- Kaur, Gurpreet et al. 2011. "Nisin and Class IIa Bacteriocin Resistance among *Listeria* and Other Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria." *Microbial Drug Resistance* 17(2): 197–205.
- Klaenhammer, Todd R. 1993. "Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria." *FEMS Microbiology Reviews* 12(1–3): 39–85.
- Kumariya, Rashmi et al. 2019. "Bacteriocins: Classification, Synthesis, Mechanism of Action and Resistance Development in Food Spoilage Causing Bacteria." *Microbial Pathogenesis* 128(January): 171–77. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>.
- De La Fuente-Salcido, N. et al. 2008. "Enhanced Synthesis and Antimicrobial Activities of Bacteriocins Produced by Mexican Strains of *Bacillus Thuringiensis*." *Archives of Microbiology* 190(6): 633–40.
- de la Fuente-Salcido, Norma M, Luz Edith Casados-Vázquez, and J Eleazar Barboza-Corona. 2013. "Bacteriocins of *Bacillus Thuringiensis* Can Expand the Potential of This Bacterium to Other Areas Rather than Limit Its Use Only as Microbial Insecticide." *Canadian journal of microbiology* 59(8): 515–22.
- Laemmli, Ulrich K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of

- the Head of Bacteriophage T4.” *nature* 227(5259): 680–85.
- León-Galván, Ma Fabiola, Noel Carbajal, Tancred Frickey, and Leticia Santos. 2009. “Microbial Identification of the Nichupte-Bojorquez Coastal Lagoon in Cancun, Mexico.” *Aquatic Ecology* 43(2): 197–205.
- Lewus, Catherine B., and Thomas J. Montville. 1991. “Detection of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria.” *Journal of Microbiological Methods* 13(2): 145–50.
- Li, Guiguan et al. 2012. “Novel Activity Evaluation and Subsequent Partial Purification of Antimicrobial Peptides Produced by *Bacillus Subtilis* LFB112.” *Annals of microbiology* 62(2): 667–74.
- Lisboa, Márcia P. et al. 2006. “Characterization of a Bacteriocin-like Substance Produced by *Bacillus Amyloliquefaciens* Isolated from the Brazilian Atlantic Forest.” *International Microbiology* 9(2): 111–18.
- Marx, Raimund, Torsten Stein, Karl Dieter Entian, and Steffen J. Glaser. 2001. “Structure of the *Bacillus Subtilis* Peptide Antibiotic Subtilisin A Determined by 1H-NMR and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry.” *Journal of Protein Chemistry* 20(6): 501–6.
- Mathavan, Indran, and Konstantinos Beis. 2012. “The Role of Bacterial Membrane Proteins in the Internalization of Microcin MccJ25 and MccB17.” *Biochemical Society Transactions* 40(6): 1539–43.
- Medine Güllüce, Mehmet Karadayı, and Özlem Barış. 2015. “Bacteriocins : Promising Natural Antimicrobials Bacteriocins : Promising Natural Antimicrobials.” *Formatex* (January 2013): 1016–27.
- Michel-Briand, Yvon, and Christine Baysse. 2002. “The Pyocins of *Pseudomonas Aeruginosa*.” *Biochimie* 84(5–6): 499–510.
- Naclerio, G., E. Ricca, M. Sacco, and M. De Felice. 1993. “Antimicrobial Activity of a Newly Identified Bacteriocin of *Bacillus Cereus*.” *Applied and Environmental Microbiology* 59(12): 4313–16.
- Najjar, Mohamed Badaoui, Michael Chikindas, and Thomas J. Montville. 2007. “Changes in *Listeria Monocytogenes* Membrane Fluidity in Response to Temperature Stress.” *Applied and Environmental Microbiology* 73(20): 6429–35.
- Nguyen, Minh Thu et al. 2020. “Lipoproteins in Gram-Positive Bacteria: Abundance, Function, Fitness.” *Frontiers in Microbiology* 11(September): 1–15.
- Nishie, Mami, Jun-Ichi Nagao, and Kenji Sonomoto. 2012. “Antibacterial Peptides ‘Bacteriocins’: An Overview of Their Diverse Characteristics and Applications.” *Biocontrol science* 17(1): 1–16.
- Nissen-Meyer, Jon, and Ingolf F. Nes. 1997. “Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides: Their Function, Structure, Biogenesis, and Mechanism of Action.” *Archives of Microbiology* 167(2–3): 67–77.

- Novikova, Maria et al. 2007. "The Escherichia Coli Yej Transporter Is Required for the Uptake of Translation Inhibitor Microcin C." *Journal of Bacteriology* 189(22): 8361–65.
- Ohba, Michio, Eiichi Mizuki, and Akiko Uemori. 2009. "Parasporin, a New Anticancer Protein Group from Bacillus Thuringiensis." *Anticancer Research* 29(1): 427–33.
- Paik, H. D., S. S. Bae, S. H. Park, and J. G. Pan. 1997. "Identification and Partial Characterization of Tochicin, a Bacteriocin Produced by Bacillus Thuringiensis Subsp Tochigiensis." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19(4): 294–98.
- Palma, Leopoldo et al. 2014. "Bacillus Thuringiensis Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity." *Toxins* 6(12): 3296–3325.
- Parente, E., and Annamaria Ricciardi. 1994. "Influence of PH on the Production of Enterocin 1146 during Batch Fermentation." *Letters in Applied Microbiology* 19(1): 12–15.
- Parisien, A. et al. 2008. "Novel Alternatives to Antibiotics: Bacteriophages, Bacterial Cell Wall Hydrolases, and Antimicrobial Peptides." *Journal of Applied Microbiology* 104(1): 1–13.
- Patzer, S. I. et al. 2003. "The Colicin G, H and X Determinants Encode Microcins M and H47, Which Might Utilize the Catecholate Siderophore Receptors FepA, Cir, Fiu and IronN." *Microbiology* 149(9): 2557–70.
- Prangishvili, David et al. 2000. "Sulfolobocins, Specific Proteinaceous Toxins Produced by Strains of the Extremely Thermophilic Archaeal Genus Sulfolobus." *Journal of Bacteriology* 182(10): 2985–88.
- Rattanachaikunsopon, Pongsak, and Parichat Phumkhachorn. 2006. "Isolation and Preliminary Characterization of a Bacteriocin Produced by Lactobacillus Plantarum N014 Isolated from Nham, a Traditional Thai Fermented Pork." *Journal of Food Protection* 69(8): 1937–43.
- Riley, Margaret A., and John E. Wertz. 2002. "Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application." *Annual Review of Microbiology* 56: 117–37.
- Rodríguez, Eliana, and Magela Laviña. 2003. "The Proton Channel Is the Minimal Structure of ATP Synthase Necessary and Sufficient for Microcin H47 Antibiotic Action." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(1): 181–87.
- Rogers, Ann M, and Thomas J Montville. 1991. "Improved Agar Diffusion Assay for Nisin Quantification." *Food Biotechnology* 5(2): 161–68.
- Rotem, Shahar, and Amram Mor. 2009. "Antimicrobial Peptide Mimics for Improved Therapeutic Properties." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1788(8): 1582–92.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.020>.
- Sabaté, Daniela C., and M. Carina Audisio. 2013. "Inhibitory Activity of Surfactin,

- Produced by Different *Bacillus Subtilis* Subsp. *Subtilis* Strains, against *Listeria Monocytogenes* Sensitive and Bacteriocin-Resistant Strains.” *Microbiological Research* 168(3): 125–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.11.004>.
- Salazar-Marroquín, Elma Laura et al. 2016. “Bacteriocins Synthesized by *Bacillus Thuringiensis*: Generalities and Potential Applications.” *Reviews and Research in Medical Microbiology* 27(3): 95–101.
- Saleem, Farah, Samia Ahmad, Zobia Yaqoob, and Sheikh Ajaz Rasool. 2009. “Comparative Study of Two Bacteriocins Produced by Representative Indigenous Soil Bacteria.” *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22(3): 252–58.
- Sarika, A. R., A. P. Lipton, and M. S. Aishwarya. 2010. “Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus Rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions.” *Advance Journal of Food Science and Technology* 2(5): 291–97.
- Schnepf, E. et al. 1998. “*Bacillus Thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins .” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 775–806.
- Sharma, Basista Rabina, Prakash M. Halami, and Jyoti Prakash Tamang. 2022. “Novel Pathways in Bacteriocin Synthesis by Lactic Acid Bacteria with Special Reference to Ethnic Fermented Foods.” *Food Science and Biotechnology* 31(1): 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00986-w>.
- Sharma, Garima, Shweta Dang, Sanjay Gupta, and Reema Gabrani. 2018. “Antibacterial Activity, Cytotoxicity, and the Mechanism of Action of Bacteriocin from *Bacillus Subtilis* GAS101.” *Medical Principles and Practice* 27(2): 186–92.
- Sharma, Vishakha et al. 2021. “Production, Purification And Characterization Of A Novel Bacteriocin Produced By *Bacillus Subtilis* Vs Isolated From Mango (*Mangifera Indica* L.)” *Brazilian Archives of Biology and Technology* 64: 1–13.
- Simons, Alexis, Kamel Alhanout, and Raphaël E. Duval. 2020. “Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria.” *Microorganisms* 8(5).
- Skaugen, Morten, Luis M. Cintas, and Ingolf F. Nes. 2003. “Genetics of Bacteriocin Production in Lactic Acid Bacteria.” *Genetics of Lactic Acid Bacteria* (225): 225–60.
- Stachelhaus, Torsten, and Mohamed A. Marahiel. 1995. “Modular Structure of Genes Encoding Multifunctional Peptide Synthetases Required for Non-Ribosomal Peptide Synthesis.” *FEMS Microbiology Letters* 125(1): 3–14.
- Stein, Torsten, Stefan Heinzmann, Irina Solovieva, and Karl Dieter Entian. 2003. “Function of *Lactococcus Lactis* Nisin Immunity Genes *NisI* and *NisFEG* after Coordinated Expression in the Surrogate Host *Bacillus Subtilis*.” *Journal of Biological Chemistry* 278(1): 89–94.
- Su, Xiaoyu et al. 2020. “Identification and Partial Purification of Thuricin 4AJ1

Produced by *Bacillus Thuringiensis*.” *Archives of Microbiology* 202(4): 755–63.
<https://doi.org/10.1007/s00203-019-01782-1>.

- Sumi, Chandra Datta, Byung Wook Yang, In Cheol Yeo, and Young Tae Hahm. 2015. “Antimicrobial Peptides of the Genus *Bacillus*: A New Era for Antibiotics.” *Canadian Journal of Microbiology* 61(2): 93–103.
- Tenover, Fred C. 2006. “Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria.” *American Journal of Medicine* 119(6 SUPPL. 1).
- Teo, Alex Yeow Lim, and Hai Meng Tan. 2005. “Inhibition of *Clostridium Perfringens* by a Novel Strain of *Bacillus Subtilis* Isolated from the Gastrointestinal Tracts of Healthy Chickens.” *Applied and Environmental Microbiology* 71(8): 4185–90.
- Ugras, Serpil, Kazim Sezen, Hatice Kati, and Zihni Demirbag. 2013. “Purification and Characterization of the Bacteriocin Thuricin Bn1 Produced by *Bacillus Thuringiensis* Subsp. *Kurstaki* Bn1 Isolated from a Hazelnut Pest.” *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(2): 167–76.
- Vlaemynck, Geertrui, Lieve Herman, and Katleen Coudijzer. 1994. “Isolation and Characterization of Two Bacteriocins Produced by *Enterococcus Faecium* Strains Inhibitory to *Listeria Monocytogenes*.” *International Journal of Food Microbiology* 24(1–2): 211–25.
- Wang, Gaoyan, David C. Manns, John J. Churey, and Randy W. Worobo. 2014. “Development of a Homologous Expression System for and Systematic Site-Directed Mutagenesis Analysis of Thurincin H, a Bacteriocin Produced by *Bacillus Thuringiensis* SF361.” *Applied and Environmental Microbiology* 80(12): 3576–84.
- Wiedemann, Imke et al. 2006. “The Mode of Action of the Lantibiotic Lacticin 3147 - A Complex Mechanism Involving Specific Interaction of Two Peptides and the Cell Wall Precursor Lipid II.” *Molecular Microbiology* 61(2): 285–96.
- Zangeneh, Mina, Sadegh Khorrami, and Moj Khaleghi. 2020. “Bacteriostatic Activity and Partial Characterization of the Bacteriocin Produced by *L. Plantarum* Sp. Isolated from Traditional Sourdough.” *Food Science and Nutrition* 8(11): 6023–30.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : S***h B***m J***d Al *****i

Uyruk : I**k

Doğum Yeri ve Tarihi: 2*/1*/1**5

Medeni Hali : Bekar

Telefon : 0*****5

E-posta : s*****m@ y**oo.c*m

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Al mustanseriyelisesi	2003
Lisans	Baghdad Ünivesitesi	2007
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2022

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2010-2015	Abo garib / Baghdad/ Irak	Al- kindi Veterinerlik ve Aşı Üretim Şirketinde görev alma.

Yabancı Dil(ler)

Dil (İngilizce, Türkçe)	Başlangıç	Orta	İleri
İngilizce	X		
Türkçe		X	

Bilimsel Faaliyetler

1. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, XI. Fen Bilimleri Enstitüsü Sempozyumu, MUĞLA, 28 Mayıs 2021.