

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bacillus thuringiensis 37Q2 ORJİNİLİ BAKTERİYOSİN
BENZERİ İNHİBİTÖR MADDENİN
ANTİMİKROBİYAL, SİTOTOKSİK VE ANJİYOGENİK
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NARİMENE BELKRAOUANE

EKİM 2023

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bacillus thuringiensis 37Q2 ORJİNLİ BAKTERİYOSİN
BENZERİ İNHİBİTÖR MADDENİN
ANTİMİKROBİYAL, SİTOTOKSİK VE ANJİYOGENİK
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NARİMENE BELKRAOUANE

EKİM 2023

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

NARİMENE BELKRAOUANE tarafından hazırlanan *Bacillus thuringiensis* 37Q2 **ORİJİNLİ BAKTERİYOSİN BENZERİ İNHİBİTÖR MADDENİN ANTİMİKROBİYAL, SİTOTOKSİK VE ANJİYOGENİK POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ** başlıklı tezinin, 03/10/2023 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

Prof. Dr. Daniela GIANNETTO (Üye)

İmza:

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Gamze BAŞBULBUL (Üye)

İmza:

Biyoloji Ana Bilim Dalı,
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın

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: 03/10/2023

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, 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 gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Narimene BELKRAOUANE

03/10/2023

(İmza)



ÖZET

***Bacillus thuringiensis* 37Q2 ORJİNALI BAKTERİYOSİN BENZERİ İNİBİTÖR MADDEİNİN ANTİMİKROBİYAL, SİTOTOKSİK VE ANJİYOGENİK POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Narimene BELKRAOUANE

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hatice Güneş

Ekim 2023, 70 sayfa

Bacillus thuringiensis'in çeşitli suşları, sporlanma sırasında Cry ve Cyt gibi toksin proteinlerini sentezleyen ve biyopestisit olarak kullanılan en başarılı entomopatojen bakterilerdir. Enfeksiyon hastalıkları dünyadaki en genel ikinci ölüm nedenidir. Günümüzde antimikrobiyal peptidler (AMPs) yeni generasyon antibiyotikler için önemli alternatiflerdir. Küçük moleküler ağırlıklı AMP'ler bakteriyosinler olarak tanımlanmıştır. *Bacillus* türlerinden izole edilen AMP'ler, mevcut antibiyotik direncine karşı umut verici potansiyele sahiptirler. Bütün bunların yanı sıra, son yıllarda bazı bakteriyosinlerin bazı kanser hücreleri üzerinde seçici olarak sitotoksik etkileri gösterilmiştir. Mevcut kanser ilaçlarının dezavantajlarına karşı yeni etken maddelerin araştırılması giderek artmaktadır. Önceki çalışmalarımızda *Bt* Koleksiyonumuzdaki 100 adet *Bt*'nin *B. cereus* indiktor bakterisine karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve sınırlı sayıda *Bt*'nin etkili olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında *B.cereus*'a karşı antimikrobiyal etkisi en yüksek olan *Bt*-37Q2 suşundan bakteri süpernatantının veya kısmi olarak saflaştırılan bakteriyosinin çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal spektrumu kuyu difüzyon yöntemiyle; çeşitli kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle; ve anjiyogenik özelliği ise ELISA testi ile araştırılmıştır.

Öncelikle *Bt*-37Q2 suşunun büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiği incelendiğinde, en yüksek antimikrobiyal aktivite 8'inci saat içinde gözlenmiştir. Bu suşun kültür süpernatantında (CFS) gözlenen bakteriyosin aktivitesinin sıcaklığa duyarlılığı çalışıldığında: en yüksek antimikrobiyal aktivite 30-40°C'de tespit edilirken, 50°C'de 30 dakikada aktivite azalmış; 50-70°C'de ise 2 saatin sonunda hiç aktiviteye rastlanmamıştır. Bununla birlikte CFS çeşitli pH'de muamele edildiğinde, bakteriyosin aktivitesi pH6'da en yüksek düzeyde bulunurken, pH3 ve pH'10'da hiç aktivite gözlenmemiştir. CFS çeşitli enzimatik işlemlere tabi tutulduğunda, Proteinaz K (PK) ve lipaz gibi enzimlerdeki aktivitenin tamamen kaybolması, BPP'nin bir

lipoprotein çeşidi olarak göstermektedir. Ayrıca, *Bt-37Q2* suşunun *16SrDNA* ve flagellin *Hag* geni PCR analizlerine göre *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* olduğu saptanmıştır. Ayrıca, kısmi olarak saflaştırılan bakteriyosin benzeri protein preparasyonu (BBPP) SDS-PAGE’de görüntülenmiştir. İlave olarak, CFS’in *Bacillus* genusuna ait türler üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği ve kanser hücre hatlarından A549, HT-29 ve PC-3 hücrelerinde % 75 üzerinde sitotoksik etkili olduğu tespit edilmiştir. BBPP’nin 3ug/ml’de dahi %70 üzerinde sitotoksik etkisi olduğu kaydedilmiştir. Son olarak, BBPP (50ug/ml) ile 6 saat muamele edilen A549 hücrelerinde anjiyogenik faktör VEGF salgılanması kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. Elde edilen sonuçlar, *Bt-37Q2* suşunun antimikrobiyal ve antikanser etkili yeni ajanların geliştirilmesinde anlamlı potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, bakteriyosinler, antimikrobiyal, sitotoksosite, kanser hücre hatları, anjiyogenez

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL, CYTOTOXIC AND ANGIOGENIC POTENTIALS OF BACTERIOCIN-LIKE INHIBITORY SUBSTANCE OF 37Q2 ORIGIN OF *Bacillus thuringiensis*

Narimene BELKRAOUANE

Master Thesis (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biological

Supervisor: Prof. Dr. Hatice Güneş

October 2023, 70 pages

Various strains of *Bacillus thuringiensis* are the most successful entomopathogenic bacteria that synthesize toxin proteins, such as Cry and Cyt, during sporulation and are used as biopesticides. Infectious diseases are the second leading cause of death worldwide. Currently, antimicrobial peptides (AMPs) are important alternatives for the development of new generation antibiotics. AMPs with low molecular weight have been defined as bacteriocins. AMPs isolated from *Bacillus* species have promising potential against current antibiotic resistance. Furthermore, in recent years, select cytotoxic effects of certain bacteriocins on certain cancer cells have been demonstrated. The search for new agents to overcome the disadvantages of current cancer drugs is increasing. In previous literature studies, the antimicrobial effects of 100 *Bt* strains from our *Bt* Collection against the indicator bacterium *B. cereus* were investigated, and a limited number of *Bt* strains were found to be effective. Therefore, in this thesis study, the antimicrobial spectrum of bacterial supernatant or partially purified bacteriocin from the *Bt*-37Q2 strain, which exhibited the highest antimicrobial effect against *B. cereus*, was investigated against various microorganisms using the well diffusion method. Cytotoxic effects on various cancer cell lines were assessed using the MTT method, and angiogenic properties were evaluated using the ELISA test.

Firstly, when the growth curve and bacteriocin production kinetics of the *Bt*-37Q2 strain were examined, the highest antimicrobial activity was observed at the 8th hour. The temperature sensitivity of bacteriocin activity observed in the culture supernatant (CFS) of this strain was investigated, and the highest antimicrobial activity was detected at 30-40°C, while activity decreased in 30 minutes at 50°C, and no activity was observed after 2 hours at 50-70°C. Additionally, when CFS was treated at various pH levels, bacteriocin activity was found to be highest at pH6, while no activity was observed at pH 3 and pH 10. When CFS was treated with various enzymes, the

complete loss of activity in Proteinase K and lipase indicates that BPP is a kind of lipoprotein. Moreover, based on *16S rDNA* and flagellin *Hag* gene PCR analyses, the *Bt-37Q2* strain was identified as *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. Furthermore, the partially purified bacteriocin-like protein preparation (BBPP) was visualized on SDS-PAGE. Additionally, it was determined that CFS exhibited antimicrobial effects against species belonging to the *Bacillus* genus and showed more than 75% cytotoxicity in cancer cell lines A549 and PC-3. BBPP exhibited cytotoxic effects of over 70% even at a concentration of 3 µg/ml. Finally, treatment of A549 cells with BBPP (50 µg/ml) for 6 hours resulted in a significant reduction in the secretion of the angiogenic factor VEGF compared to the control. The obtained results demonstrate that the *Bt-37Q2* strain has significant potential for the development of novel antimicrobial and anticancer agents.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, bacteriocins, antimicrobial, cytotoxicity, cancer cell lines, angiogenesis

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca bana her konuda destek olan, kendimi geliştirmem için beni destekleyen değerli danışmanım Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım boyunca tüm yardımları ve desteğiyle yanımda olan değerli arkadaşlarım Nagihan YILDIRIM, Achraf LEHTİHET ve yardımlarını esirgemeyen Cansu KORKMAZ'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 annem Malika BOUNAHAS ve erkek kardeşime Mohamed Salah'a sonsuz teşekkür ederim.



Aileme ve sevdiklerime

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	xi
ŞEKİL DİZİNİ	xiii
TABLO DİZİNİ.....	xv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Genel Özellikleri	7
1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Etki Mekanizması.....	9
1.3. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri	10
1.4. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması	12
1.5. Bakteriyosinlerin Sentezi ve Etki Mekanizması	17
1.6. Bakteriyosinlerin Antikanser Aktivitesi.....	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
2.1. Materyal	23
2.1.1. Antibakteriyal aktivitede kullanılan indikatör suşlar	23
2.1.2. Besiyerleri	24
2.1.2.1 . <i>Trypto-casein soy Broth (TSB)</i>	24
2.1.2.2. <i>Nutrient Broth (NB)</i>	24
2.1.2.3. <i>Luria Bertani Broth (LB)</i>	24
2.1.2.4. <i>Mueller Hinton Broth (MHB)</i>	24
2.1.2.5. <i>Brain Heart Infusion Broth (BHI)</i>	25
2.1.2.6. <i>Potato Dextrose Agar (PDA)</i>	25
2.1.3. Tampon çözeltiler.....	25
2.1.3.1. <i>Antimikrobiyel aktivite için çözelti</i>	25
2.1.3.2. <i>20 mM Tris-HCl Tamponu</i>	25
2.1.3.3. <i>SDS PAGE için kullanılan tampon ve solüsyonlar</i>	25
2.1.3.5. <i>Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	26
2.1.3.6. <i>(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)</i>	26
2.1.4. Kullanılan cihazlar	27
2.1.5. Kullanılan besiyeri ve kimyasallar.....	27
2.2. Yöntem.....	27
2.2.1. Bt-37Q2 örneklerinin hazırlanması.....	27

2.2.2. Bt 37Q2 suşunun BBM üretim kinetiklerinin belirlenmesi	28
2.2.3. Bakteriyosin benzeri maddenin karakterizasyonu.....	28
2.2.3.1. Farklı sıcaklıkların bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi	29
2.2.3.2. Farklı pH değerlerinin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi.....	29
2.2.3.3. Farklı enzimlerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi	30
2.2.4. 16S rDNA ve Hag geni analizi	30
2.2.5. Bakteriyosin benzeri maddenin kısmi pürifikasyonu.....	31
2.2.6. Saflaştırılmış protein aktivitesinin antimikrobiyal spektrumu	32
2.2.7. Ultrafiltasyon.....	32
2.2.8. SDS-PAGE.....	32
2.2.9. BBIM'in kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisinin MTT analizi .	33
2.2.10. BBIM'nin anjiyojenez etkisinin belirlenmesi	33
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	34
3.1. Büyüme Eğrisi ve Bakteriyosin Üretim Kinetiğinin Belirlenmesi	34
3.2. Bakteriyosin Aktivitesinin Karakterizasyonu	35
3.2.1. Bakteriyosin aktivitesi üzerinde pH'nin etkisi	35
3.2.2. Bakteriyosin aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisi.....	36
3.2.3. Bakteriyosin aktiviteleri üzerine enzimlerin etkisi	38
3.2. Bakteriyosinin Amonyum Sülfat ile Kısmi Purfikasyon	39
3.3. SDS-PAGE Analizi.....	39
3.4. 37Q2 Suşunun 16s rDNA Analizi.....	41
3.5. Bt 37Q2 Hag Geni PCR Analizi	41
3.6. Bt37Q2'nin 16S rDNA Analizi.....	42
3.7. Bt 37Q2 Suşunun Hag Geni ile Analizi	44
3.8. Bt 37Q2 Antibakteriyal Ekti Spektrumları	45
3.9. Bt-37Q2 Supernatantının A549 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Aktivitesi.....	46
3.10. Bt-37Q2 Supernatantının ve BBPP Pc-3 Hücrelerinde Sitotoksik Aktivitesi	47
3.11. Bt-37Q2 Supernatantının HT-29 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Aktivitesi ..	50
3.13. Bt-37Q2 Supernatantının Ccd-18 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Aktivitesi .	52
4. TARTIŞMA	56
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
6. KAYNAKÇA	65
ÖZGEÇMİŞ.....	70

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1: <i>B. thuringiensis</i> 'in etki şekli.....	10
Şekil 1.2: Bakteriyosinler için önerilen sınıflandırma şemas.....	14
Şekil 1.3: Bakteriyosinin çeşitli etki şekli.....	18
Şekil 3.1.Bt 37Q2' nin büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiği.....	34
Şekil 3.2. 8. Saatte bakteriyosin aktivitesinin petrideki görünümü.....	35
Şekil 3.3.Bt 37Q2'den elde edilen bakteriyosin aktivitesi üzerinde pH etkisi	36
Şekil 3.4. Bakteriyosin benzeri maddenin farklı pH'lerde <i>B. cereus</i> 'a karşı antimikrobiyal aktivitesinin görünümü.....	36
Şekil 3.5. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin petrideki görünümü...37	
Şekil 3.6. Enzimlerin bakteriyosinin aktivitesi üzerindeki etkilerinin petrideki görünümü.....	38
Şekil 3.7. Kısmi olarak saflaştırılan BBPP'nun antimikrobiyal aktivitesi.....	39
Şekil 3.8. Ultrafiltrasyon yapılan BBPP'nun <i>B. cereus</i> 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi.....	40
Şekil 3.9. 37Q2'den elde edilen bakteriyosin benzeri protein örneğinin	40
Şekil 3.10. 16s rDNA PCR ürünün agaroz jel'de görüntüsü.....	41
Şekil 3.11. 37Q2 <i>Hag</i> geni ile yapılan PCR 'ın agaroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 3.12. 16S rDNA'nın Blast analizi sonucu.....	43
Şekil 3.13. <i>Hag</i> gen Blast analizi.....	44
Şekil 3.14. 37Q2 supernatantının A549 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi24h.....	46
Şekil 3.15. 37Q2 supernatantının A549 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi48h.....	47
Şekil 3.16. 37Q2 supernatantının A549 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi72h.....	47
Şekil 3.17. 37Q2 supernatantının PC-3 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi24h.....	48
Şekil 3.18. 37Q2 supernatantının PC-3 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi48h.....	48
Şekil 3.19. 37Q2 supernatantının PC-3 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi72h.....	49
Şekil 3.20. 37Q2 kısmi saflaştırılan proteinin PC-3 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi24h.....	49
Şekil 3.21. 37Q2 kısmi saflaştırılan proteinin PC-3 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi48h.....	50
Şekil 3.22.37Q2 kısmi saflaştırılan proteinin PC-3 hücrelerinde sitotoksik aktivite72h.....	50
Şekil 3.23. 37Q2 supernatantının HT-29 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi, 24h.....	51
Şekil 3.24. 37Q2 supernatantının HT-29 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi, 48h.....	51

Şekil 3.25. 37Q2 supernatantının HT-29 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 72h.....	52
Şekil 3.26. 37Q2 supernatantının Ccd-18 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 24h.....	53
Şekil 3.27. 37Q2 supernatantının Ccd-18 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 48h.....	53
Şekil 3.28. 37Q2 supernatantının Ccd-18 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 72h.....	54
Şekil 3.29. 37Q2'den elde edilen BBPP'nun A549 hücrelerinde anjiyogenik etkisi....	55



TABLO DİZİNİ

Tablo 1.1. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması.(Open Veterinary Journal 2018).....	15
Tablo 2.1. İndikatör bakterileri	23
Tablo 3.1. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi.....	36
Tablo 3.3. 37Q2 suşuna ait <i>16S rDNA</i> konsensus ve BLAST karşılaştırma sonucu..	37
Tablo 3.4. 37Q2 suşuna ait <i>Hag geni</i> konsensus ve BLAST karşılaştırma sonucu...	44
Tablo 3.5. Bt 37Q2 suşunun antimikrobiyal etki spektrumu.....	45

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AU	Arbitrary Unit
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
BBPP	Bakteriyosin benzeri protein preparasyonu
BGPB	Bakteriyosin gram pozitif bakteri
BGNB	Bakteriosin gram negatif bakteri
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CFS	Hücresiz kültür süpernatantı
Cry	Kristal protein
Cyt	Sitolitik
DNA	Deoksiribonükleik Asit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Tris Borate EDTA
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamid Jel Elektrozef
TEMED	Tetra metilindiamin
Vip	Vejetatif insektisidal protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
MTT Bromide	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium

1. GİRİŞ

Bacillus thuringiensis (Bt) Gram (+), spor oluşturan aerobik veya fakültatif anaerobik bir bakteridir. Büyüme grafiğinin durağan fazında insektisidal kristal proteinleri (ICP) üretirler ve entomopatojenik özellik gösterirler (Bernhard vd., 1997; Crickmore vd., 1998). *B. thuringiensis* (Bt), gıda zehirlenmesinden sorumlu bir bakteri olan *Bacillus cereus* ve anthrax hastalığından sorumlu olan *Bacillus anthracis* ile birlikte *Bacillus cereus* grubunda yer alır. Entomopatojenik bakteri *B. thuringiensis*, dünyada biyopestisit olarak onaylanan ilk mikroorganizmadır. Bt, saprofit olarak yaşayan bir toprak bakterisidir, ölü organizmalardan gelen organik maddeyi ve parazitik, canlı böcekleri kolonize eder (Glazer ve Nikaido, 1994). Bu bakteri tahıllar, toz, böcek çeşitleri, tarım arazileri ve farklı bitki ve su ortamları gibi farklı yaşam alanlarında doğal olarak mevcut olabilir (Martin ve Travers, 1989; Ben Dov vd., 1992; Ben Dov vd., 1997; Bel vd., 1997; Theunis vd., 1998; Mizuki vd., 1999)

Bazı yazarlar, bu farklı türlerin yaygın olarak kullanılan yöntemlerle ayırt edilmesindeki zorluklar nedeniyle tek bir tür oluşturduğunu düşünmektedir (Helgason vd., 2000; Okinaka ve Keim, 2016). Klasik olarak, kültürlerden *B. thuringiensis*'i *B. cereus*'tan ayırt etmeyi mümkün kılan bir protein kristalinin varlığının mikroskopik olarak gözlemlenmesidir (Ankolekar ve Labbé, 2010). Sporlanması sırasında bir protein kristalinin üretimi ile karakterize edilir. Esasen delta-endotoksinlerden oluşan bu protein kristali, Cry proteinlerini ve Cyt proteinlerini birlikte gruplandırır. Bu proteinler, sporlanma sırasında bakterilerin protein bileşiminin yaklaşık %20'sini temsil eder (Aronson 2002). *B. thuringiensis* ve *B. cereus*'ta 150'den fazla Cry proteini keşfedilmiştir (Schnepf et al., 1998). Cry proteinleri, toksik formu 66-67 kDa (öncünün N-terminal yarısı) olan yaklaşık 70 kDa veya 130 kDa'lık protoksinler olarak sentezlenir. Bunlar, helikslerin bir transmembran gözenek oluşturduğu α -sarmal toksinler kategorisindeki PFT (Gözenek Oluşturan Toksin) sınıfına aittir (Parker ve Feil, 2005).

Çeşitli zararlılara karşı seçici toksisiteleri sayesinde Cry proteinleri 1930'lardan beri biyolojik bir insektisit olarak kullanılmaktadır. Bugüne kadar 500'den fazla Cry proteini keşfedilmiş ve 72 aileye sınıflandırılmıştır (Crickmore vd., 2014, <http://www.btnomenclature.info/>). 1980'lerde bir Cry proteininin ilk klonlanması ve dizilenmesinden bu yana, etki tarzlarını ve düzenlemelerini analiz etmek için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar, Cry proteinlerinin böcekler üzerindeki etki mekanizmalarını ve bakterilerin içindeki işlevlerini daha iyi anlamayı mümkün kılmıştır. Cry protein alanlarının (domainlerinin) her birinin benzersiz yapısı, bu alanların farklı hücreler üzerinde toksik etkilerde rol almasını sağlar. Alan I, toksinin oligomerizasyonunda, zararın yerleştirilmesinde ve gözeneklerin oluşumunda yer alır (Bravo, Gomez vd., 2013). Alan II ve III'e gelince, sahaya yönelik mutajenez ve yapılarının kesilmesinin sonuçları, bunların hücre reseptörlerine bağlanmada ve insektisidal aktivitede yer aldıklarını göstermektedir (İbrahim, Griko vd., 2010). Alan II ve III'ün en değişken bölgeleri, böcek öldürücü etkilerinin özgülüğünde büyük bir rol oynar. Bu bölgeler, özellikle amino asit dizilerinin en fazla açığa çıktığı β -tabakalarının sonundaki halkalarda bulunur.

B. thuringiensis, Cry proteinlerinin toksik etkisi sayesinde onlarca yıldır biyolojik bir insektisit olarak biliniyor. Bununla birlikte, *B. thuringiensis*'in doğadaki rolü, özellikle de insektisidal güce sahip *B. thuringiensis* suşlarının sayısı, olmayanlardan daha az olduğu için tam olarak anlaşılamamıştır. İnsektisidal olmayan türlerin insektisidal türlere karşı oranı %90 civarındadır (Ohba, Mizuki vd., 2009). Bu oran, *B. thuringiensis*'in başka veya gerçek biyolojik rolünü bulmak için birçok araştırma çalışmasını motive etti. 1700'den fazla suşun üzerinde yapılan bir çalışmada, 40'tan fazla insektisidal olmayan suşun MOLT-4 lösemi hücreleri üzerinde toksik bir etkiye sahip olduğu bulundu (Mizuki, Ohba vd., 1999). Lösemi hücrelerini normal T hücrelerinden ayırt etme yeteneğinde olan bu protein 81 kDa'luk bir proteindir ve parasporin olarak adlandırılmıştır (Mizuki vd., 2000). Sekans analizleri sonucunda bu proteinin *B. thuringiensis* Cry proteinlerinde bulunan beş korunmuş bölgeyi içerdiği fakat var olan Cry ve Cyt proteinlerle çok az benzerlik (<25 %) gösterdiği bulunmuştur. Parasporinler "hemolitik olmayan fakat ayrıcalıklı olarak kanser hücrelerini hedef alan *B. thuringiensis* ve ilgili bakteriyel proteinler" olarak tanımlanmaktadır (Katayama vd., 2005; Akiba ve Okumura 2016). Parasporinler

etkilerini hücre yüzeyindeki reseptörlerle etkileşime girerek ya apoptotik yolla ya da membran yüzeyinde oligomerizasyon ile hücre membrane geçirgenliğini bozarak gösterir ve hücre ölümüne neden olurlar (Ohba vd., 2009).

Günümüzde patojenik mikroorganizmalar mevcut antibiyotiklere karşı hızlı bir şekilde direnç mekanizması geliştirmektedirler. Bunun üstesinden gelmek için antimikrobiyal etkili yeni bileşiklerin keşfi için çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Antimikrobiyal peptidler (AMPs) yeni jenerasyon antibiyotikler için umut veren alternatif sağlamaktadır (Sumi vd., 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. Geleneksel antibiyotikler direncin gelişiminde rol alan metabolik enzimleri hedef alırken AMP'ler mikrop membranında porlar açarak öldürür ve direnç gelişimini zorlaştırır. *Bacillus* genusu çok sayıda AMP'ler üretme potansiyeline sahip olması nedeniyle yeni inhibitör maddelerin araştırılmasında umut vadeden bir başlangıç olarak görülmektedirler (Bizani vd., 2005; Xie vd., 2009).

Bacillus'un ürettiği antibiyotikler ribozomal olmayan ve ribozomlarda sentezlenen peptidler olmak üzere iki grupta toplanır (Marx vd., 2001; Li vd., 2012). Ribozomal olarak sentezlenen antibiyotikler 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. *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. Laktik asit üreten bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler uzun süredir araştırılmaktadır. Bununla birlikte, yalnızca *Lactococcus lactis* suşları tarafından üretilen bir bakteriyosin olan Nisin, yalnızca gıda koruyucu olarak değil, aynı zamanda hayvan mastitisini önlemek için ticari kullanım için geliştirilmiştir (Cotter vd., 2012).

B. thuringiensis, *Serratia entomophila*, *Pseudomonas entomophila* ve *Erwinia cartovora* gibi entomopatojenik bakteriler, sadece böcekleri kontrol etmek için değil, aynı zamanda farmasötikler ve gıda koruyucuları olarak kullanılabilecek çeşitli ikincil metabolitler üretirler (Bode 2009). Cry, Cyt ve Vip'e ek olarak, *B. thuringiensis*

bakteriyosinler, kitinazlar, acil homoserin lakton laktonaz ve zwittermisin üretir ve bunlar toplu olarak böcek konakları ve hedef bakteriler üzerinde zararlı etkiler yaratır (Barboza-Corona vd., 2007; Bode 2009; Barboza -Corona vd., 2012). Daha spesifik olarak, *B. thuringiensis* bakteriyosinlerinin doğadaki rolü esrarengiz olmasına rağmen, rakip endosimbiyotik veya fırsatçı bakterilere saldırarak patogeneze yardımcı olmaları ve bu entomopatojenin duyarlı böceklerin hemolenfinde yayılmasını kolaylaştırmaları mümkündür (Login vd., 2011). Bugüne kadar *B. thuringiensis* alt türlerinden *morrisoni*, *kurstaki*, *kenyae*, *entomocidus*, *tolworthi*, *tochigiensis* tarafından sentezlenen 18 bakteriyosin (*Thuricin Bn1*, *Bacthuricin F103*, *Bacturicin F4*, *Entomocin 9*, *Entomocin 110*, *Entomocin 420*, *Morricin 269*, *Kurstacin 287*, *Kenyacine 404*, *Tolworthicin 524*, *Tochicin*, *Thuricin*, *Thuricin CD*, *Thuricin S*, *Thuricin 17*, *Thuricin 439* ve *Thuricin 7*) tanımlanmıştır. Bunlar arasında, sistein sülfürün α -karbon çapraz bağlarının varlığını ortaya koyan Thuricin CD'sinin sadece 3 boyutlu yapısı aydınlatılmıştır (Sit vd., 2011).

Bakteriyosinler kimyasal yapıya, ısı stabilitesine, moleküler kütleye, enzimatik duyarlılığa, modifiye edilmiş amino asitlerin varlığına ve moduna göre sınıflandırılır (Motta vd., 2008). Bakteriyosin türleri ilk olarak Klaenhammer (1993) tarafından sınıflandırılmıştır. Bakteriyosinler için 4 sınıf önerildi: sınıf I lantibiyotikler (modifiye amino asit lantionin ve <5 kDa küçük peptitler gibi), sınıf II sistibiotikler (aktiviteleri için gerekli olan bir veya daha fazla disülfid bağı içeren küçük peptitler, <10 kDa, ısıya dayanıklı ve membran aktif), sınıf III tiyolbiyotikler (aktif bir $-SH$ grubu, daha yüksek moleküler kütle, <30 kDa ve ısıya dayanıklı) ve sınıf IV (bir veya daha fazla lipid veya karbonhidrat parçası içeren kompleks proteinler) proteinler (Klaenhammer 1993; Rea vd., 2011; Abriouel vd., 2011).

Bakteriyosinleri de içeren AMP'lerin etki mekanizmaları hakkında değişik modeller vardır. Bu mekanizmalar peptidin tipine, konsantrasyonuna ve bakteri tipine göre değişir. Farklı *Bacillus* türleri farklı etki mekanizmasına sahip farklı bakteriyosin ve bakteriyosin-benzeri inhibitör (BLIS) maddeler üretir. Tochicin, lichenin, thuricin 439 ve thuricin S bakteriosidal etki gösterir (Sumi vd., 2015). Genel olarak bakteriyosinler hidrofobik ve amfifilik özellikler gösteren katyonik peptidlerdir; bu nedenle, bakteri membranı onların hedefidir (Sirtori vd., 2006). Birkaç modele göre katyonik etki

mekanizması kanalların oluşumuna ve buradan iyonların geçişini ve sitoplazmik membranın bozulmasına neden olur. Bakteri hücre membranında porların oluşumuyla bakterinin ölümü 3 temel basamağı içerir. Bunlar: Bakteri membranına bağlanma, membranda toplanma, ve kanalların oluşumudur. Kanal oluşumu hücre içeriğinin akmasına ve sonuçta hücre ölümüne yol açar. Bunlara ilaveten, AMP'ler negatif yüklü Gram negatif bakterilerinin LPS içeren dış membranına veya Gram negatif bakterinin asidik polisakkarit içeren dış membranına geçmek zorundadır. Çoğu durumlarda hedef mikroorganizmaların spesifik metabolik aktiviteleri por oluşumu için kritik şartlar sağlar. Örneğin, lantibiyotik amilolysin lipid II ile (peptidoglikan monomerlerinin sitoplazmik membran boyunca taşıyıcısı) etkileşerek hücre duvarı biyosentezini engeller. Buna ilaveten, çoğu katyonik AMP'ler hücre membranıyla direk etkileşime girerek membran bozulmasına ve bakteri hücrelerinin ölümüne neden olur (Shelburne vd., 2007). Buna ilave olarak, *B. amyloliquefaciens* tarafından üretilen AMP 2 çeşit antifungal özellik gösterir. Yüksek konsantrasyonda hücre duvarında por oluşturur ve düşük konsantrasyonda hücre apoptozunu uyarır. Bu antifungal peptid glucan sentezini engeller ve fungal hücre duvarında kalloz sentezinin azalmasına yol açar.

B. thuringiensis kültür ortamında antimikrobiyal peptitler üretebilse de, ortam bileşiminin modifikasyonu, fizikokimyasal koşulların değiştirilmesi (pH, sıcaklık ve havalandırma) ve duyarlı bir bakterinin varlığı dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin biyokütle ve bakteriyosin üretimini iyileştirebileceği açıktır (Keshavarzi, 2005; Zacharof ve Lovitt, 2012). İlginç bir şekilde, *B.thuringiensis*'in Meksika suşlarının bakteriyosinojenik kültürüne duyarlı bir bakterinin varlığının bakteriyosin sentezini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir. Bu özel fenomen, bakteriyosin üreticisi tarafından maksimum bakteriyosin üretime yol açan çekirdek algılama süreçlerini indükleyen hedef bakteri tarafından sentezlendiği varsayılan proteinli bir bileşenin salınmasının bir sonucu olabilir (De la Fuente-Salcido vd., 2008). Ayrıca bakteriyosin sentezinin hem duyarlı bir bakterinin varlığı hem de kültür için kullanılan fiziksel parametrelerin modifikasyonu ile daha da artırılabilceği gözlemlenmiştir (Martínez-Cardenas vd., 2012). Son 25 yılda laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri *Bacillus* kaynaklı AMP'lerden daha çok dikkate alınmasına karşın, *Bacillus* kaynaklı bakteriyosinler ve bakteriyosin-benzeri inhibitör maddeler (BLIS) insan sağlığı alanında hali hazırda umut vadeden sonuçlar göstermiştir. Araştırmalar halen bu

AMP'lerin antimikrobiyal aktivitelerinin mekanizmalarını araştırmakta ve ökaryotik hücrelere ve eritrositlere karşı sitotoksik etkisini değerlendirmektedir. Örneğin, Kaur ve Kaur (2015)'un derleme makalesinde de belirtildiği gibi çeşitli bakteriyosinlerin kanser hücrelerine karşı seçici olarak antikanser etki gösterdiği bulunmuştur. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen microcin ve colisin veya Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen nisin malin hücre hatlarına karşı sitotoksik etki göstermiştir (Joe vd., 2012; Ahmad vd., 2017). Bakteriyosinlerin kanser hücrelerine karşı sitotoksitesisi apoptozun uyarılması ve/veya hücre membran geğirgenliğine neden olan membran depolarizasyonu ile gerçekleşmiştir (Kaur and Kaur, 2015). Örneğin, baş ve boyun yassı hücreli karsinoma hücrelerinde nisin kanser hücrelerinde artan DNA fragmentasyonuna ve apoptoza; ve hücre proliferasyonunun durdurulmasına yol açmıştır (Joe vd., 2012). Diğer bir çalışmada ise, *Pseudomonas aeruginosa* suşu tarafından üretilen bir bakteriyosin olan azurin insan kanser hücrelerine seçici olarak bağlanması nedeniyle potansiyel antikanser ilacı olarak incelenmiştir. (Yamada vd., 2004).

Sonuç olarak, çeşitli *Bacillus* türlerinin ve *B. thuringiensis*'in alt türlerinin çeşitli patojenik ajanlara karşı antibiyotik etki gösteren AMP'ler ürettikleri ve kanser hücreleri üzerinde seçici olarak sitotoksik etki gösterebildikleri kaydedilmiştir (Sumi vd., 2015; Kaur ve Kaur, 2015). Günümüzde mevcut antibiyotiklere karşı direnç mekanizması hızla gelişmektedir. Ayrıca, son yıllarda kanser tedavisinde önemli adımlar atılmış olmasına ragmen birçok mevcut kanser tedavisi hala yüksek sitotoksitesite ile ilişkilidir ve özgülükten yoksundur. Bu bakımdan, yeni anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesine hala ihtiyaç vardır. AMP'ler, özellikle bakteriyosinler, kanser hücrelerine karşı seçicilik gösterir. Böylece bu AMP'ler, mevcut kemoterapötik ajanlara potansiyel alternatif adaylardır. AMP'ler, bu tedavilerin toksisitesini bastırmak amacıyla ihtiyaç duyulan terapötik dozları düşürmek için kemoterapötik ajanlara adjuvanlar olarak da uygulanabilir. Önceki alışmalarımızda, Bt kültür koleksiyonumuzdaki bazı *Bacillus thuringiensis* suşlarının *Bacillus cereus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında, *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal etkisi en yüksek olan Bt (37Q2) suşunun büyüme eğrisi, bakteriyosin üretim kinetiği, çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal spektrumu ve çeşitli kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

1.1. *Bacillus thuringiensis*'in Genel Özellikleri

Bacillus thuringiensis (Bt) ilk kez 1901'de Japon biyolog Ishiwata Shigetane tarafından keşfedildi; bu, daha önce ipek böceklerini etkileyen bir hastalığın etken maddesi olarak tanımlanmamış bir bakteriydi. Aynı bakteri Erste Berliner tarafından, 1911'de akdeniz un güvesi olan *Ephestia kuehniella* dan izole edildi ve ismini enfekte güvelerin bulunduğu Almanya'daki Thüringen eyaletinden almıştır (Roh vd., 2007, Sanahuja vd., 2011). 1915'te Bt'de parasporal inklüzyonun varlığı Berliner tarafından kaydedildi ve daha sonra bunun proteinli bir yapıya sahip olduğu ve alkalın çözeltide çözünür olduğu gösterildi. Kristal oluşumlarının insektisidal özelliklerinin lepidopteran larvalarının alkalın sindirim sıvılarında çözünmediği ve toksisiteden sorumlu olduğu keşfedildi. Bt tarafından üretilen sporlar ve kristalli insektisidal proteinler, 1920'lerden beri böcek zararlılarını kontrol etmek için kullanılmaktadır ve sıklıkla sıvı spreylere olarak uygulanmaktadır (Lemaux 2008). 1981'de, González vd., (1981) tarafından kristalin protein üretiminin kaybı ile spesifik plazmitler arasında korelasyon olduğuna dair güçlü kanıtlar rapor edildi. Aynı yıl, kristal proteinleri kodlayan ilk *cry* geni, Schnepf ve Whiteley(1981) tarafından klonlanmış ve ifade edilmiştir. Şimdiye kadar, yeni *cry* genleri elde etmek amacıyla çeşitli endüstriler tarafından 60.000 Bt toplanmış ve 371'den fazla *cry* geni rapor edilmiştir (Choi vd., 2007; Li-Ming vd., 2008). Bt gram-pozitif, entomopatojen, 5 endospor oluşturan *Bacillus cereus* grubunun bir üyesidir ve Bt sporları toprak, tatlı su, rizosfer, filoplan, tahıl tozları gibi çeşitli ortamlardan ve böceklerden izole edilebilir (Raymond vd., 2010). *B. thuringiensis*, birkaç toksin üretebilen, spor oluşturan Gram pozitif bir bakteridir. Ürettiği toksinler: insektisidal endotoksinler, ekzotoksinler, hemolizinler ve enterotoksinler'dir. Genetik olarak *B. thuringiensis*, insanlarda gastroenterite neden olan toksinler üreten *B. cereus* ile akrabadır, fakat *B. thuringiensis* tipik olarak sporlanma sırasında tek kayda değer fenotipik fark olarak bir veya daha fazla proteinli inklüzyon üretir (Kolsto vd., 1990). Bu inklüzyonlar, faz-kontrast mikroskobu ile belirgin şekilde şekillendirilmiş kristaller olarak ayırt edilebilir. Inklüzyonlar, çok çeşitli önemli tarım ve sağlıkla ilgili böcek zararlıları için oldukça toksik olan kristal proteinler, Cry proteini veya delta-endotoksinler olarak bilinen proteinlerden oluşur. Yüksek özgüllükleri ve çevre için güvenlikleri nedeniyle kristal proteinler, tarım ve

ormancılıkta ve evlerde böcek zararlılarının kontrolü için kimyasal böcek ilaçlarına değerli bir alternatiftir. *B. thuringiensis*'ten elde edilen böcek öldürücü kristal proteinler, birkaç on yıldır yoğun bir şekilde biyopestisit olarak kullanılmaktadır. *B. thuringiensis* toksinlerinin akılcı kullanımının, böcek kontrolü ve böcek ilaçlarına karşı böcek direnci sorununun üstesinden gelmek için çeşitli alternatifler sağlayacağı öne sürülmüştür. *Bt* suşları genellikle H flagellar antijenik determinantlarına göre serotipler halinde sınıflandırılır (de Barjac vd., 1981; de Barjac, 1990). Bugüne kadar, 82 serovar veren 69 farklı serotip ve 13 alt antijenik grup tanımlanmıştır. ve alttür olarak sınıflandırılmıştır (Lecadet vd., 1999). Serotipleme, türün yalnızca bir özelliğini yansıtırken, dünya çapında en yaygın kullanılan 6 sınıflandırma yöntemidir. Bununla birlikte, flagellar serotiplemenin, tekniğin izolatların sınıflandırılmasına büyük ölçüde yardımcı olmasına rağmen, insektisidal aktivitenin bir göstergesi olarak güvenilirmez olduğu ortaya çıkan sınırlamaları vardır. Örneğin, *Bt subsp. morrisoni* (H8a8b), lepidopteran, coleopteran veya dipteran böceklerle karşı aktif izolatları içerir. Ancak bu ürünlerin etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Önerilen iki model vardır: Birincisi, *Bt*'nin hücre zarındaki gözeneklerin oluşumuna yanıt olarak ozmotik bir dengesizliğe neden olması ve ikincisi, hücre ölümü sürecini aktive eden iyon kanallarının açılmasına neden olmasıdır. *Bt* direncinin gelişebileceği çeşitli yollar vardır: Cry toksinini tanımayan reseptörlerdeki değişiklikler, peptitleri sitozolden uzaklaştıran membran taşıyıcıların sentezi ve toksin reseptörlerinin üretimini bozan düzenleyici mekanizmaların gelişimi. Biyopestisitlerin formülasyon potansiyeli ve genetiği değiştirilmiş çeşitlerin geliştirilmesinde kullanımının yanı sıra, *Bt* ile yapılan son araştırmalar, diğer bilim dallarında umut verici uygulamaları tartışmıştır. Kitini parçalayan bir enzim olan Kitinaz, *Bt* insektisitlerin etkinliğini artırır ve substratının doğada aşırı derecede bol olması nedeniyle endüstride artan bir ilgi vardır. Bir başka umut verici alan, *Bt* proteinlerinin kanser hücrelerine karşı hareket etme potansiyelidir. Entomopatojenik etkiye sahip olmayan *Bt* toksinleri olan parasporinler, bazı kanserlerin değiştirdiği hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahiptir. Bu, mikroorganizmanın potansiyelini ve gelecekteki uygulamalar için açılan yeni fırsatları göstermektedir.

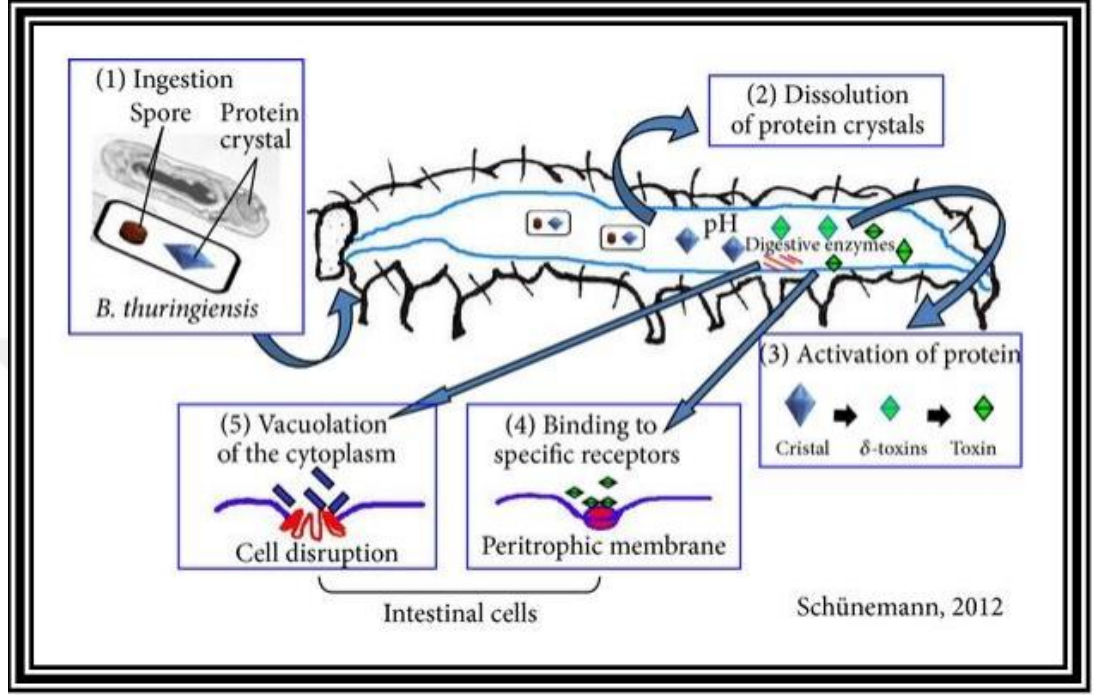
1.2. *Bacillus thuringiensis*'in Etki Mekanizması

Bir *B. thuringiensis* izolatının ürettiği insektisidal proteinleri tam olarak bilmek, izolatın belirli bir böcek veya nematod türüne karşı toksisitesini açıklamak için yeterli değildir. *B. thuringiensis*'in endotoksinleri dışındaki çeşitli elementler bu aktiviteye katkıda bulunur. Bununla birlikte, Cry proteinlerinin önemli rolünden dolayı, bu diğer faktörlerin çoğu yeterince araştırılmamıştır. En önemlileri sporun kendisi, ekzotoksinler, zwittermicin gibi antibiyotikler, vejetatif insektisidal proteinler, fosfolipazlar, kitinazlar ve çeşitli proteazlardır (Lui vd., 1998; Donavan vd., 2001; Lui vd., 2002; Yezza vd., 2006b). Bazı hedef böceklerde, tek başına Cry proteinleri, alkali bağırsak sularının hemolenf içine akmasına ve kan pH'ını yükseltmesine izin vermek için yeterli bağırsak epitel hücrelerini yok ederek larvaları zehirlmek için yeterlidir, bu da felce ve beslenmenin kesilmesine neden olur (Heimpel ve Angus, 1960). Sivrisinek ve karasineklerde olduğu gibi genellikle birkaç gün içinde ölümle sonuçlanır.

Lepidoptera türlerinin çoğunda, ölüm nedeni, proteinin etkisi ile larvanın *B. thuringiensis* tarafından kolonizasyonu ve enfeksiyonu kombinasyonudur. Böylece Pyralidae familyasından Lepidoptera larvaları gibi çok hassas türlerde Cry proteinleri ile zehirlenme sonucu felç geçirdikten sonra sporlar bağırsakta çimlenir ve vejetatif hücreler larvayı istila ederek hemolenf ve diğer dokuları kolonize eder ve o kadar çoğalır ki, ceset pratik olarak saf bir *B.thuringiensis* kültürü haline gelir.

Çoğu Spodoptera türü gibi diğer türlerde ölüm, Cry proteinleri, Vip, β -ekzotoksinler, bağırsak bariyerlerini parçalamaya yardımcı olan çeşitli enzimler ve *B. thuringiensis* ve diğer bağırsak lümeninde mevcut bakterilerle enfeksiyon dahil olmak üzere faktörlerin bir kombinasyonuna bağlı gibi görünmektedir. Örneğin, *B. thuringiensis*'in *Agrotis ipsilon* ve *Spodoptera frugiperda* larvalarına karşı patojenitesi, Vip 3 geni (aynı zamanda bağırsak epitel hücrelerini de hedefleyen bir Vip 3 protein toksinini kodlayan) çıkarıldığında önemli ölçüde azalmıştır (Donovan vd., 2001). Bu faktörler, hedef böcekten bağımsız olarak *B. thuringiensis*'in insektisidal aktivitesi için önemli olmakla birlikte, Cry proteinleri ticari *B. thuringiensis* insektisit formülasyonlarında bulunan bileşenlerin en önemlisidir. Pek çok *B. thuringiensis* izolatının toksisite faktörlerinin karmaşıklığı göz önüne alındığında, Cry proteinleri dışındaki çeşitli

bileşenlerin, bakterinin konağın savunmasını aşma, böceği öldürme ve ardından ölü böcekleri üreme için kullanma şansını optimize etmeyi mümkün kıldığı görülmektedir.



Şekil 1.1: *B. thuringiensis*'in etki şekli: spor/kristal kompleksinin yutulması (1); kristallerin (2) çözünmesi; protein aktivasyonu (3); spesifik reseptörlere protein bağlanması (4); membran gözeneklerinin oluşumu ve hücre parçalanması (5) (Schünemann, 2014).

1.3. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri

Bakteriyosinlerin ilk keşfi, yaklaşık bir asır önce, Gratia'nın (1925) bir *E. coli* kültüründen ısıya dayanıklı bir madde tarafından *Escherichia coli* S suşlarının inhibisyonunu göstermesiyle rapor edilmiştir. Bu inhibe edici maddeler, üreten türlere atıfta bulunarak kolisinler olarak adlandırılmıştır (Frederiq, 1946). Farklı laktik asit bakterilerinin büyümesinin, şimdi *L. lactis* olarak sınıflandırılan *S. lactis* tarafından üretilen bir metabolit tarafından inhibe edildiği bilinmektedir (McAuliffe vd., 2001). Bir laktik asit bakterisi tarafından üretilen ilk bakteriyosinin keşfi 1928'dedir (Rogers, 1928). Bu, Whitehead tarafından beş yıl sonra tanımlanmış ve 1947'de nisin olarak adlandırılmıştır (Mattick & Hirsch, 1947). 1951'de yapılan diğer araştırmalar, bir

peynirin olgunlaşması sırasında clostridia'nın, nisin tarafından inhibe edildiğini kanıtladı (Hirsch vd., 1951). Bu tarihten itibaren gıda kontaminasyonu ile mücadelede bakteriyosinlerin kullanılması önerilmiştir. Klaenhammer (1988) ve Margaret & John'a (2002) göre bakteri türlerinin %99'u en az bir bakteriyosin üretebilir.

Bakteriyosinin tanımı yıllar içinde büyük ölçüde gelişmiştir. Günümüzde bakteriyosinler, kendilerine karşı bağışık olan bakteriler tarafından üretilen ribozomlardan sentezlenen antimikrobiyal peptidler olarak tanımlanmaktadır (Cotter vd., 2013). Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip çeşitli küçük peptit gruplarıdır. İnsanlar, hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar dahil olmak üzere çeşitli organizmalar tarafından üretilirler. AMP'ler, bakteriler, mantarlar ve virüsler dahil olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmaları öldürme veya büyümesini engelleme yeteneğine sahiptir. Doğal bağışıklık yanıtında ve mikrobiyal enfeksiyonlara karşı savunmada çok önemli bir rol oynarlar. Bakteriyosinlerin aktivitesi, aynı türün suşları ile sınırlandırılabilir veya birçok farklı tür ve cinse yayılabilir (Cotter vd., 2005). Etki genellikle bakterisittir, ancak bakteriyostatik bir etki bulunmuştur (Tagg & Wannamaker, 1976; Klaenhammer, 1988). Bakteriyosinler doğada katyoniktir ve genellikle bir veya daha fazla amfifilik sarmal yapı halinde düzenlenirler (Rodriguez vd., 2003; Heng vd., 2007). Protein yapıları, proteolitik enzimler tarafından, özellikle de memelilerin gastrointestinal sisteminin proteazları tarafından parçalanmalarına izin verir, bu da onları insan tüketimi için güvenli kılar (Zacharof & Lovittb, 2012).

Bakteriyosin ailesi çok çeşitlidir, iki büyük grup ayırt edilebilir. Bir yanda Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, esas olarak kolisinler ve mikrosinler tarafından temsil edilmektedir. Moleküler kütleleri 20 kDa'dan büyüktür ve genellikle 449 ila 629 amino asit içerirler (Margaret & John, 2002). Geniş bir aktivite spektrumuna sahiptirler, ısıya, belirli proteazlara ve ayrıca aşırı pH'a dirençlidirler (Baquero & Moreno, 1984; Pons vd., 2002).

Yapı-fonksiyon ilişkileri gibi bakteriyosinler üzerine yapılan çalışmalar için model sistem görevi görürler (Cascales vd., 2007). Birçok araştırma, potansiyel terapötik uygulamalarından dolayı *Enterobacteriaceae* suşları tarafından üretilen mikrosinlere odaklanmıştır (Asensio & Perez-Diaz, 1976).

Öte yandan, laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler, GRAS durumlarından dolayı en fazla bulunanlardır (Margaret & John, 2002) ve en çok çalışılanlardır (Settanni & Corsetti, 2008; Zacharof & Lovittb, 2012).

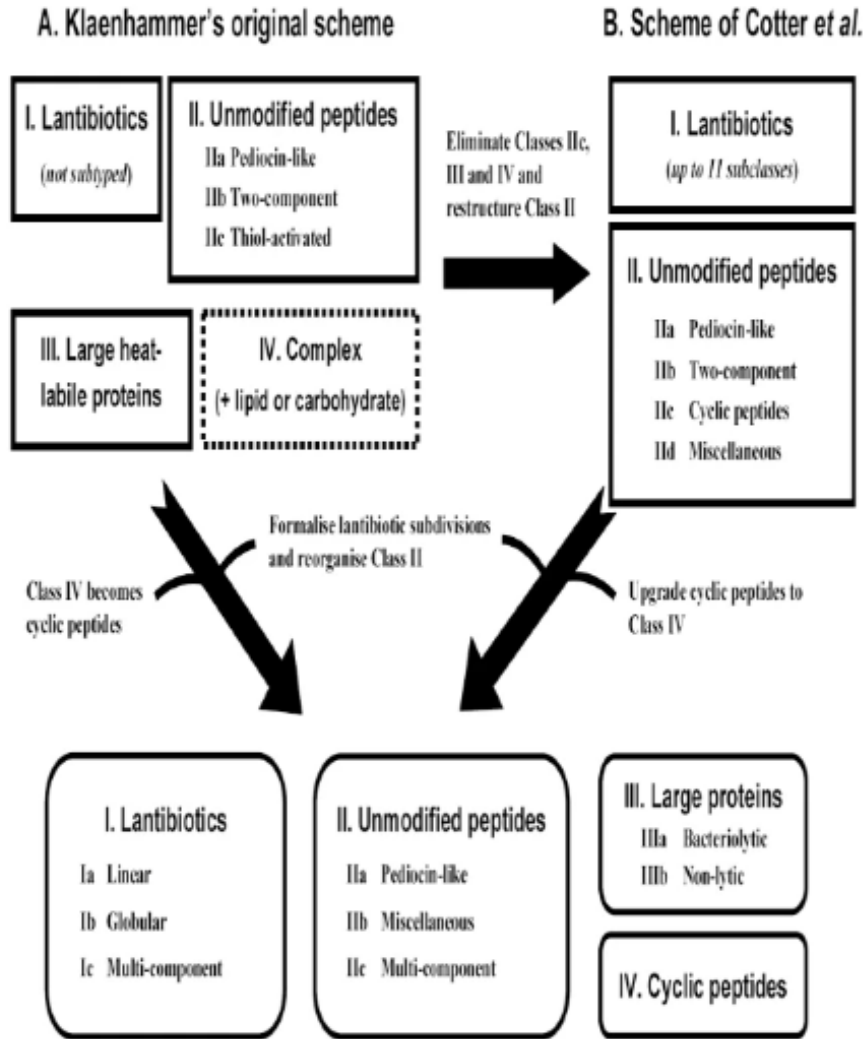
Bu bakteriyosinler genellikle düşük molekül ağırlıklıdır (nadiren 10 kDa'dan fazla) (Heng vd., 2007; Zacharof & Lovittb, 2012). Bakteriyosinler antibiyotik değildir, ancak öte yandan antibiyotiklere uygun bir alternatif olabilir (Cotter vd., 2013). Antibiyotikler ve bakteriyosinler arasındaki en büyük fark, bakteriyosinlerin ribozomal olarak sentezlenmesi ve büyümenin birincil fazı sırasında üretilmesi, oysa antibiyotiklerin çoğunlukla ikincil metabolitler olmasıdır (Zacharof & Lovittb, 2012). Ayrıca bakteriyosinler, antibiyotiklerde gözlenenlere kıyasla nispeten dar aktivite spektrumuna sahiptir (Margaret & John, 2002; Zacharof & Lovittb, 2012).

1.4. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

Gram-pozitif bakterilerin bakteriyosinlerinin sınıflandırması, yeni yapılar keşfedildikçe birkaç kez revize edilmiştir (Klaenhammer, 1993; Ennahar vd., 2000; McAuliffe vd., 2001; Cotter vd., 2005 Nes vd., 2007). Yapısal özelliklerin ötesinde moleküler ağırlık, etki mekanizması ve üreticinin orijini de çeşitli yazarlar tarafından dikkate alınan kriterlerdir (Diep & Nes, 2002; Peschel & Sahl, 2006; Izquierdo vd., 2008).

Klaenhammer'in (1993) sınıflandırması, en çok değiştirilmiş olan temel sınıflandırma olmaya devam etmektedir. Bakteriyosinler dört ana sınıfa ayrılır: lantionin ve 3'-metillantionin kalıntılarının varlığı nedeniyle lantibiyotikler dahil olmak üzere Sınıf I. Post-translasyonel olarak değiştirilmiş bakteriyosinleri içerir ve yapılarına göre birkaç gruba ayrılır: değiştirilmemiş termostabil bakteriyosinler içeren sınıf II, bu sınıf üç alt sınıfa ayrılmıştır, sınıf III büyük ve ısıya dayanıklı bakteriyosinler içerir. Bir diğer sınıf ise proteinlerden oluşan ve bir (veya daha fazla) protein olmayan, lipid ve/veya oligosakarit bileşenleri taşıyan daha karmaşık sınıf IV bakteriyosinlerdir (Klaenhammer, 1993). Bazı yazarlar (Cotter vd., 2005; Nes vd., 2007), bu sınıftaki bakteriyosinlerin aktivitesi, antimikrobiyal etkiden çok enzimatik aktiviteye benzer olduğundan, sınıf III'ün sınıflandırmadan çıkarılmasını önermiştir. Buna karşılık, sınıf

IV açıkça karakterize edilmediğinden, Diep ve Nes (2002) onu reddetmeyi ve bu sınıflandırmada uygun bulmamayı tercih etmiştir. Diğer yazarlar (Diep & Nes, 2002; Drider vd., 2011; Cotter vd., 2013), bakteriyosinleri iki ana gruba ayıran bir sınıflandırma önermişlerdir. Sınıf I, lantibiyotik sınıfı olarak adlandırılır. Bir peptitte lantionin kalıntılarının varlığının onu otomatik olarak bir lantibiyotik yapmadığına dikkat çekmek önemlidir. Gerçekten de, bunlara sahip olan tüm peptidler, antimikrobiyal aktiviteye sahip değildir (Jack vd., 1995). Sınıf I, lantibiyotik sınıfı olarak adlandırılır. Sınıf II ise, standart amino asit kalıntılarını (disülfid köprüleri ile bağlanabilen veya N-terminal ve C-terminal uçları arasında siklize edilebilen) içeren değiştirilmemiş bakteriyosinleri (<10 kDa) içerir (Abdelmajid vd., 2010). Dört alt gruba ayrılır: sınıf IIa "pediyosin benzeri", sınıf IIb "iki peptid", sınıf IIc dairesel bakteriyosinler ve sınıf IId modifiye edilmemiş ve pediyosin benzeri olmayan bakteriyosinlerdir. Sınıf III, bu sınıflandırmada çok marjinal kalırken, sınıf IV yoktur. Bakteriyosinlerin yeni kabul edilen sınıflandırmasına uymazlar.



Şekil 1.2: Bakteriyosinler için önerilen sınıflandırma şeması (Heng & John, 2006)

Class	Nomenclature	Qualities	Examples	Reference
Class-I	Post-translationally modified peptides called Lantibiotics	Characterized by distinctive thioether-based intramolecular rings of lanthionine and β -methyl-lanthionine	Nisin, discovered in 1928, lactacin <i>L. lactis</i> , citolysin of <i>E. faecalis</i> , and lactacin of <i>L. lactis</i>	Xie and van der Donk, 2004
Class-II	Thermostable, non-modified non-lantibiotic linear peptides of <10 kDa. It is recognized as largest class among Gram positive bacteriocins and further divided into three subclasses based on distinctive N-terminal sequence. i. Class II-1-Pediocin-like bacteriocins ii. Class II-2 lacks leader peptide iii. Class II-3 other than above.	Characterized By short cationic peptides with high isoelectric points. It contains potent-antilisteria activity	Pediocin PA-1/AcH produced by <i>Pediococcus</i> , Enterocin EJ97 by <i>E. faecalis</i> and Enterocin L50A by <i>E. faecalis</i> .	Breukink <i>et. al.</i> , 1999
Class-III	Comprises large (> 30 KDa) heat labile proteins like colicin- V and microcins.	Bacteriocins are Gram negative circular peptides characterized by a peptide bond between the C- and N-terminus. It possesses the bacteriolytic extracellular enzymes like hemolysins and muramidases which can mimic the physiological activities of bacteriocins.	Helveticin J of <i>L. helveticus</i> and bacteriocin Bc-48 of <i>E. faecalis</i> .	Wiedemann <i>et al.</i> , 2001

Tablo 1.1 . Bakteriyosinlerin sınıflandırılması. (Open Veterinary Journal, 2018)

Sınıf I: L antibiyotikler, tioeter köprülerinin dahil edilmesi de dahil olmak üzere, çeviri sonrası değişikliklere uğrayan küçük, ısıya dayanıklı peptitlerdir. Ayrıca, spesifik modifikasyonlarına göre alt sınıflara ayrılırlar. Örnekler arasında nisin, laktikin 3147 ve mersasidin bulunur.

Nisin, özellikle Gram-pozitif bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip, iyi bilinen ve yaygın olarak çalışılan bir bakteriyosindir. Süt ürünlerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan *Lactococcus lactis* bakterisinin belirli suşları tarafından üretilir. Nisinin antimikrobiyal aktivitesi, bakteriyel hücre zarlarının bütünlüğünü ve işlevini bozma kabiliyetine bağlanır. Nisin, bakteri hücre duvarlarının sentezinde yer alan bir öncü molekül olan lipid II'ye bağlanarak etki eder. Bu etkileşim hücre zarında gözenek oluşumuna yol açarak hücre içeriğinin sızmasına neden olur ve sonuçta hücre ölümüyle sonuçlanır. Nisin en çok *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria* ve *Clostridium* gibi türler dahil olmak üzere Gram-pozitif bakterilere karşı etkilidir. Gıda endüstrisinde bozulmayı ve patojenik bakterilerin büyümesini önlemek için doğal bir

koruyucu olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Nisin ayrıca, antibiyotiğe dirençli suşlara karşı aktivite gösterdiği için geleneksel antibiyotiklere bir alternatif olarak dahil olmak üzere potansiyel terapötik uygulamaları açısından da araştırılmıştır. Bariyer görevi gören bir dış zarın varlığından dolayı gram negatif bakterilere karşı etkilidir. Ancak nisin, belirli Gram-negatif patojenlere karşı etkinliğini arttırmak için diğer ajanlar veya stratejilerle birlikte kullanılmıştır.

Sınıf II: Bu sınıftaki bakteriyosinler, moleküler kütleleri 10 kDa'nın altında olan geniş ve çeşitli bir antimikrobiyal peptit grubunu oluşturur (Zacharof & Lovittb, 2012). Translasyon sonrası değişiklik göstermeyen termostabil peptitleri bir araya getirirler (Ennahar vd., 2000; Nes vd., 2007; Cui vd., 2012). Bu sınıf en heterojen olanıdır ve çalışması onun ilk olarak üç alt sınıfa (IIa, IIb ve IIc) bölünmesine yol açmıştır (Klaenhammer, 1993)

Sınıf IIa: Bu bakteriyosinler aynı zamanda pediosin benzeri bakteriyosinler olarak da bilinirler ve ortak bir N-terminal konsensüs dizisine sahiptirler. Tipik olarak pozitif bir yüke sahiptirler ve *Listeria monocytogenes* dahil olmak üzere çeşitli Gram-pozitif bakterilere karşı aktiftirler. Örnekler arasında pediocin PA-1, sakacin P ve lökosin A bulunur.

Sınıf IIb: Bu sınıftaki bakteriyosinler büyüktür, ısıya duyarlıdır ve iki peptitli bir sistem gösterir. Peptitler, antimikrobiyal aktivite uygulamak için birlikte çalışır. Örnekler arasında laktokoksin G ve laktokoksin M yer alır.

Sınıf IIc: Bu sınıftaki bakteriyosinler dairesel, değiştirilmemiş peptidlerdir. Örnekler arasında enterosin AS-48 ve karnosiklin A bulunur.

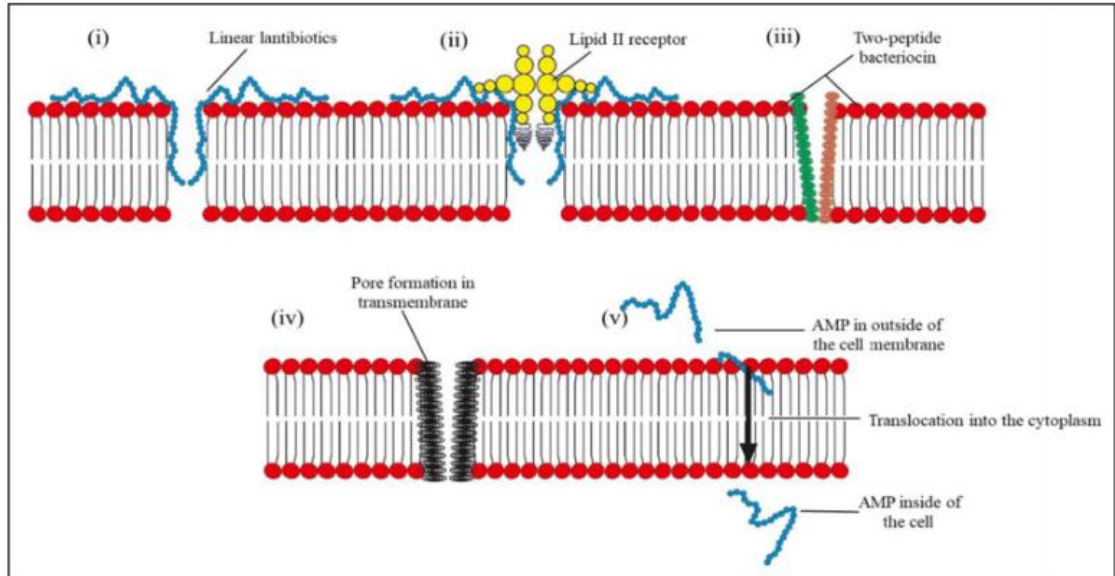
Sınıf III: Bu bakteriyosinler büyüktür, ısıya duyarlıdır ve genellikle bakteriyofajlarla ilişkilidir. Lantibiyotiklere benzer bir lipit II hedefleme mekanizmasına sahiptirler. Örnekler, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pyogenes* tarafından üretilen bakteriyosinleri içerir.

Sınıf IV: Bu sınıftaki bakteriyosinler, kompleks yapıya sahip dairesel peptitlerdir. Genellikle geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler. Örnekler arasında *Bacillus subtilis*'ten subtilosin A ve *Bacillus amyloliquefaciens*'ten amilosiklin yer alır.

1.5. Bakteriyosinlerin Sentezi ve Etki Mekanizması

Aktif bakteriyosinlerin üretimi için genler genellikle genom, plazmit veya diğer mobil genetik elementlerde barındırılan operon kümelerinde bulunur. Bu operonların ekspresyonu indüklenebilir ve indüksiyon için oto-indükleyici peptitlerin varlığını gerektirir. İfade genellikle iki bileşenli düzenleyici sistemle ve bazı durumlarda üç bileşenli düzenleyici sistemle düzenlenir. Nisin'in kendisi, iki bileşenli düzenleyici sistemi etkinleştirerek ifadesi için bir oto-indükleyici görevi görür. Bununla birlikte, bazı bakteriyosinler, ekspresyonlarını düzenlemek için kendilerine özgü bir yolu olan istisnalarlardır. Örneğin, lidersiz bir sınıf II bakteriyosin olan LsbB durumunda, lsbB geninin aşağı akışında yer alan tam transkripsiyon sonlandırıcı, RNA stabilitesini üç kat artırarak ekspresyonunu düzenler ve bu da ekspresyonun 30 kat artmasına neden olur (G. Uzelac vd.,2015). Yakın tarihli bir çalışma, brevicin 174A üretiminin ve kendi kendine direncinin, pozitif otoregülatör olarak hizmet ettikleri iki transkripsiyonel düzenleyici protein tarafından kontrol edildiğini gösterdi (Noda vd.,2018). Bakteriyosinler, işlenen ve çeviri sonrası modifiye edilen öncüller olarak sentezlenir. Daha sonra, bakteriyosinler olgun formu oluşturmak için taşınır ve bölünür. Modifikasyon ve dışa aktarma genleri, bakteriyosin biyosentez geninin yakınında bulunur. Bakteriyosin tipine bağlı olarak modifikasyon değişebilir. Fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilgliserol (PG), lipopolisakarit (LPS), lipoteikoik asit (LTA) ve kardiyolipinden (CL) oluşan bakteri hücre yüzeyinin anyonik özelliği, katyonik bakteriyosinler tarafından yararlanılan ortak hedeftir (López-Lara vd.,2017) Bakteriyosinler, pozitif yüklü gruplar negatif yüklü bakteri hücre yüzeyi ile elektrostatik olarak etkileşime girerken, hidrofobik yüzeyler zara doğru hizalanır ve lipid çift katmanını geçer. Lipid çift katmanını deldikten sonra peptitler, kompleksler oluşturmak için kendi kendine birleşir veya polimerize olur. Bakteriyosinler, muhtemelen proton hareket kuvvetinin dağılmasına ve hücre içi ATP'nin tükenmesine, hücre içi substratların sızmasına ve nihai ölüme neden olan iyon seçici gözenekler oluşturarak hedef bakteri hücre zarının geçirgenliğini indükler. Enterosin, *L. monocytogenes*'in hücre duvarında ve zarında lokalize delikler oluşturur ve böylece proton hareket kuvvetinin çökmesine neden olur. Bakteriyosinler, membranlarla etkileşime girmek için lipid II veya fosfotransferaz sisteminin mannoz permeazı gibi

kenetlenme moleküllerine ihtiyaç duyarlar. Bununla birlikte, bazı bakteriyosinler yerleştirme için hedef reseptörlere ihtiyaç duymayabilir. Garvicin ML, *Lactococcus garvieae* DCC43'ten türetilmiş sirküler bakteriyosin, alıcı olarak maltoz ABC taşıyıcı ve permeaz kullanır. Yerleştirme molekülleri, lantibiyotik gözeneklerin iletkenliğini ve stabilitesini artırırken, hedef zardaki reseptörler, sınıf II bakteriyosinlerin özgüllüğünü belirleyebilir. Birkaç çalışma, bakteriyosinlerin etki şeklinin konsantrasyona bağlı olduğunu göstermektedir. Sınıf I bakteriyosinler, (metil) lantionin kalıntılarına (lantionin ve metillantionin) sahip lantibiyotikler olarak molekül içi tiyoeter halkaları oluşturur. Sınıf II bakteriyosinler küçüktür ve dar bir bakterisidal aktivite spektrumuna sahiptir. Lantibiyotikler 'kama benzeri' modelde gözenekler oluştururken, sınıf II bakteriyosinler 'wedge like' gözenekleri veya bir 'halı' mekanizması ile zar geçirgenliğini artırır (G.N. Moll, W.N. Konings vd.,1999).



Şekil 1.3: Bakteriyosinlerin çeşitli etki şekilleri (Moll vd.,1999).

Antimikrobiyal peptitler veya proteinler olan bakteriyosinler, öncelikle kanser hücrelerinden ziyade bakterilere karşı etkinlikleriyle bilinirler. Bununla birlikte, bazı çalışmaların belirli bakteriyosinlerin potansiyel antikanser etkilerini araştırdığını belirtmekte fayda var. Varsa, bakteriyosinlerin kanser hücrelerine karşı etki şekli muhtemelen antimikrobiyal aktivitelerinden farklı olacaktır. Bakteriyosinler, kanser

hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) tetikleyebilir. Bu, belirli sinyal kaskadlarının aktivasyonunu veya hücrenin hayatta kalması için kritik olan hücresel süreçlerin bozulmasını içeren çeşitli yolaklar yoluyla meydana gelebilir. Bakteriyosinler, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini ve bölünmesini yava latabilir veya engelleyebilir, bu da tümör boyutunun azalmasına yol açar. Bu, hücre döngüsüne müdahale ederek veya hücre proliferasyonunda yer alan hayati hücresel süreçleri bozarak meydana gelebilir. Bakteriyosinler, bağışıklık sistemini uyarabilir ve kanser hücrelerine karşı bağışıklık tepkilerini arttırabilir. Bakteriyosinler, bağışıklık hücrelerini aktive ederek veya ba ı ıklıkla ilgili moleküllerin üretimini etkileyerek, vücudun kansere karşı doğal savunma mekanizmalarını potansiyel olarak arttırabilir. Bakteriyosinler, tümör büyümesini desteklemek için yeni kan damarlarının olu turuldu u süreç olan anjiyogenezi inhibe edebilir. Bakteriyosinler, yeni kan damarlarının oluşumunu baskılayarak, tümörlere besin tedarikini sınırlayabilir ve ilerlemelerini engelleyebilir.

1.6. Bakteriyosinlerin Antikanser Aktivitesi

Kanser, bulaşıcı olmayan hastalıklar arasında tüm dünyada en önemli hastalık ve ölüm nedenlerinden biridir. 2012 yılında, dünya çapında tahminen 14,1 milyon yeni kanser vakası ve 8,2 milyon kanser ölümü meydana geldi (Ferlay vd., 2013). Kanser hücreleri, normal büyüme düzenleyici mekanizmalardan kaçan de i tirilmi  hücrelerdir. Normal  artlar altında hücre yenilenmesi ile hücre ölümü arasındaki denge korunur ve yeni hücrelerin  rimi belirli bir hücre tipinin sayısı sabit kalacak şekilde düzenlenir. Ancak  evre kaynaklı veya kalıtsal genetik mutasyonlar nedeniyle, hücreler normal büyüme kontrol mekanizmalarına yanıt vermeyi durdurur ve tümör veya neoplazm üreten önemli boyutlara ulaşan hücre klonlarına yol açar. Kanser hücreleri, hücre fizyolojisinde aşağıdaki altı temel de i ikli i gösterir: büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyümeyi engelleyen sinyallere duyarsızlık, programlanmış hücre ölümüne direnç, sınırsız replikasyon potansiyeli, sürekli anjiyogenez ve metastaz (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanser tedavisi için mevcut stratejiler, kemoterapinin ana tedavi seçeneği olduğu kemoterapi, cerrahi ve radyasyondur. Ancak, aktif olarak bölünen hücreleri hedef alan geleneksel kemoterapötik ilaçlar, spesifik olarak kanser

hücrelerini hedeflemediklerinden, genellikle sağlıklı hücelere ve dokulara verilen ilaca bağılı hasarla ilişkilendirilir. İkincisi, kanser hüceleri, ilaç detoksifiye edici enzimlerin ve ilaç taşıyıcılarının artan ekspresyonu ve apoptoza aracılık eden hücresel makinelerdeki DNA kusurlarını onarma yeteneğinin artması gibi çeşitli faktörler nedeniyle sıklıkla kemoterapiye dirençli hale gelir (Raguz ve Yagüe, 2008). Bu nedenle, kanseri tek başına tedavi edebilen veya geleneksel antikanser ilaçlarının terapötik dozlarını düşürmek için yardımcı maddeler olarak kullanılabilen kanser hücrelerine özgü hedefli tedavilere acil bir ihtiyaç vardır. Peptit terapötiklerinin artan popülaritesi ile bilimsel topluluk, kansere karşı yeni terapötik ajanlar olarak bakteriyosinleri keşfetmeye başlamıştır. Bakteriyosinlerin ökaryotik hücreler üzerindeki toksik etkileri ilk kez Farkas-Himsley ve Cheung (1976) tarafından gözlemlenmiştir. Bakteriyosinlerin memeli hüceleri üzerindeki etkileri daha önce gözden geçirilmiştir (Cornut vd., 2008).

Bazı bakteriyosinler, nano veya mikromolar konsantrasyonlarda kanser hücelere karşı *in vitro* sitotoksikite göstermiştir. Bakteriyosinin sitotoksikitesi ve kanser hücelerini diferansiyel olarak hedefleme yeteneği, pozitif yüklü amino asitlerin sayısı, hidrofobiklik ve amfipatik yapılar oluşturma yeteneği veya diğer antimikrobiyal peptidlerde olduğu gibi oligomerizasyon gibi yapısal özelliklerine bağılı olabilir (Gaspar vd., 2013). Hücre zarı, ökaryotik hücrelerde bakteriyosinlerin ana hedefi gibi görünmektedir. Negatif yüklü hücre yüzeyi moleküllerinin kanser hüceleri üzerinde artan ekspresyonu, onları bakteriyosinlerin sitotoksik aktivitesine eğilimli hale getirir (Zhao vd., 2006). Bakteriyosinlerin sitotoksikite mekanizmaları, geçirgenlik değişikliklerine yol açan hücre zarının apoptoz indüksiyonunu ve/veya depolarizasyonunu içerir. Çok azı hem nekrozu hem de apoptozu indükleyebilir. Membran potansiyeli ölçüm çalışmaları, bakteriyosinin hassas ökaryotik hücre ile etkileşiminden birkaç saniye sonra, yüzeyinde depolarizasyon ve geçirgenliğinde artış meydana geldiğini ve hücre ölümüne yol açtığını göstermiştir. Sitotoksik bakteriyosinler tarafından indüklenen hızlı öldürme, reseptör aracılı olmayan etki tarzını gösterebilir. Membran yüzeyi glikoproteinleri ve glikozaminoglikanların, en azından plnA durumunda kanser hücresi hedefleri olduğu gösterildi (Sand vd., 2013); bununla birlikte, nisin A, plnC ve pediosin glikozaminoglikanlar gibi diğer bakteriyosinler söz konusu olduğunda, kanser hüceleri üzerindeki sitotoksik etkiyi

önlediği görülmüştür (Martín vd., 2015). Diğer sitotoksik bakteriyosinler ile etkileşimlerinde yüzey moleküllerinin rolünü kanıtlamak için daha ileri çalışmalar gereklidir. Bakteriyosinlerin antikanser potansiyeli laboratuvar koşullarında test edilmiştir. Ancak kanser hastalarında etkinliklerine ilişkin herhangi bir veri mevcut değildir. Bakteriyosinlerin terapötik ajanlar olarak avantajları, küçük peptidler olmaları ve dolayısıyla doğaları gereği çoğunlukla immünojenik olmamalarıdır (Bhunja vd., 1990). İkincisi, biyolojik olarak parçalanabilirler ve basit amino asitlere kolayca hidrolize olurlar, ancak bu aynı zamanda o kadar uzun ömürlü olamayacakları anlamına gelir. Bu güvenlik yönlerinden dolayı, nisin dünya çapında 50'den fazla ülkede gıda koruyucu olarak kullanım için onaylanmıştır ve GRAS'a (genellikle güvenli olarak kabul edilir) sahiptir. Bakteriyosinlerin ilaç olarak kullanılmasındaki en büyük zorluklardan biri, bakteriyosinlerin insan bağırsağı veya dokularındaki stabilitesini arttırmaktır. Bağırsakta proteolitik bölünmeye daha az duyarlı olan D-amino asitleri içeren bakteriyosin peptitlerini kimyasal olarak sentezlemek için çaba gösterilmiştir. Laktokoksin G analogları, ekzopeptidazlara karşı daha az duyarlı olan ve aktiviteleri üzerinde fazla bir etkisi olmayan D-amino asitlerle değiştirilen N- ve C-terminal kalıntıları ile sentezlendi (Oppegård vd., 2010). Başka bir çalışmada, salivarisin P'deki tripsin tanıma bölgelerinin sahaya yönelik değişimi, onun anti-listerial aktivitesinde çok az değişikliklerle birlikte tripsin dirençli varyantlarla sonuçlanmıştır (Shea vd., 2010). Antikanser bakteriyosinlerin stabilitesini ve gücünü artırmayı amaçlayan benzer çalışmalar garanti edilmektedir. Ayrıca, bakteriyosinlerin hedeflenen ve kontrollü iletimi için fonksiyonel araçlar, bunların in vivo stabilitelerini de geliştirebilir.

Terapötik bakteriyosinlerin ticarileştirilmesindeki bir diğer engel, bakteriyosinlerin büyük ölçekte üretilmesi ve saflaştırılmasıdır. Bakteriyosinler, katyonik ve hidrofobik kromatografinin bir kombinasyonu kullanılarak kültür süpernatantından saflaştırılır ve saflaştırılmış bakteriyosinlerin tipik konsantrasyonları, kültürün litresi başına bir miligramdan azdır (Carolissen-Mackay vd., 1997). Bununla birlikte, çeşitli bakteriyosinlerin genetik organizasyonu ve biyosentetik yolları hakkındaki bilgi, bakteriyosinlerin farklı konaklarda füzyon proteinleri olarak heterolog üretimini kolaylaştırmıştır. Ayrıca, bakteriyosinler immünojenik olmadığından, biyolojik olarak parçalanabilir olduklarından ve kanser hücrelerine özgü toksisitelere sahip oldukları

gösterildiğinden, bunların geleneksel kanser ilaçlarına sinerjistik ajanlar olarak hizmet etme potansiyelleri de test edilmelidir. İnsanlık için daha güvenli ve daha iyi tedaviler tasarlamak için antikanser ajanlar olarak bakteriyosinlerin potansiyelinin kullanılması gereken aşama günümüzde ele alınmıştır.



2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Antibakteriyal aktivitede kullanılan indikatör suşlar

Bu çalışmada kullanılan mikrobiyal suşlar, besiyerleri ve sıcaklık koşulları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Mikrobiyal organizmalar

Suşların adı	Kod. Numarası	Besiyerir	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>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</i> spp.	Gıda izolatu	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>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 29212	NA	37
<i>Escherichia 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)

1 litre distile su içinde çözülmüş 30gram Trypto-casein soy broth (TSB) çözeltisi, 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavda sterilizasyona tabi tutulmuştur ve ardından 37°C'de 24 saat inkübasyona alınmıştır. Elde edilen TSB, Bt suşunun büyümesinde kullanılmıştır. Katı bir besiyeri oluşturmak için aynı çözeltiye 15gram agar agar eklenmiş ve sterilizasyondan sonra Petri kaplarına dökülmüştür.

2.1.2.2. Nutrient Broth (NB)

8 gr Nutrient broth (NB) 1 litre distile suya çözülmüştür. Ardından sterilizasyon toklavda 121°C 15 dakika uygulanmış. Aynı besiyerine agar agar 15 gr eklenerek katı besiyerine dönüştürülmüş ve steril edildikten sonra petrilere dökülmüştür. 37°C de 24 saat inkübe edilip 4°C'de saklanmıştır.

2.1.2.3. Luria Bertani Broth (LB)

25 gr Luria Bertani Broth (LB) 1 litre distile suda çözülmüştür. Sterilizasyon için 121°C'de 15 dakika otoklavlanmış ve sterilizasyon sonrası stok hazırlanmasında kullanılmıştır. Aynı besiyerine 15gram agar agar eklenmiş ve 37°C'de 24 saat sterilizasyondan sonra inkübe edilerek 4°C'de saklanmıştır.

2.1.2.4. Mueller Hinton Broth (MHB)

21 gr Mueller Hinton Broth (MHB) 1 litre distile suda çözülmüştür. Sterilizasyon için 121°C 15 dakika otoklavlanmış ve 24 saat 37°C inkübe edilmiştir. MHA agar hazırlamak için Aynı besiyerine agar agar 15 gr eklenmiştir ve sterilizasyon sonrası petrilere dökülmüştür.

2.1.2.5. Brain Heart Infusion Broth (BHI)

37 gr Brain Heart Infusion Broth 1 litre distile suda çözülmüştür. Sterilizasyon için 121°C 15 dakika otoklavlanmış ve 24 saat 37°C inkübe edilmiştir. Aynı besiyere 15 gr agar agar eklenmiş ve steril edildikten sonra, 37 °C de 24 saat inkübe edilmiştir.

2.1.2.6. Potato Dextrose Agar (PDA)

39 gr Potato Dextrose Agar 1 litre distile suda çözülmüştür. Sterilizasyon için 121°C 15 dakika boyunca otoklavda sterilizasyona tabi tutulmuş ve daha sonra, 37°C 24 saat inkübe edilmiştir.

2.1.3. Tampon çözeltiler

2.1.3.1. Antimikrobiyel aktivite için çözelti

- Normal salin çözeltisi 0.9 gr NaCl, 100 ml distile su içinde çözülmüştür.
- 0.5 McFarland çözeltisi 0.05 ml %1 BaCl₂.2H₂O ve 10 ml lik H₂SO₄ ile hazırlanmıştır.
- 1 McFarland çözeltisi 0.1 ml %1 BaCl₂.2H₂O ve 10 ml 'ye H₂SO₄ ile hazırlanmıştır.

2.1.3.2. 20 mM Tris-HCl Tamponu

1.211 gr Tris, 400 ml distile su ile çözülmüştür, pH'sı HCL ile ayarlanmış ve 500 ml'ye 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, distile su ilavesiyle toplamda 20 ml hacme ulaştırılmış ve 4°C'de saklanmıştır.

4X Running jel tamponu (1.5M PH 8.8): 9.075 gr Tris, 20 ml distile suya çözülmüştür, pH değeri HCl kullanılarak 8.8 olarak ayarlanmış ve distile su ilavesiyle 50 ml'ye kadar tamamlanmıştır.

4X stacking jel tamponu (0.5M PH 6.8): 3 gr Tris, 20 ml distile suya çözündürülmüş, pH değeri HCl kullanılarak 6.8 olarak ayarlanmış ve distile su ilavesiyle 50 ml'ye kadar tamamlanmıştır.

%10 APS: 1.0 gr APS, 1 ml distile suyla çözündürülmüştür. Bu çözelti taze hazırlanmalıdır.

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

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

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

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

Destaining çözeltisi: 10 ml asetik asit, 25 ml metanol, distile su ilavesiyle 100 ml'ye kadar tamamlanmıştır.

Hücre kültürü için kullanılan çözeltiler

2.1.3.5. Phosphate Buffered Saline (PBS)

0.17gr KH_2PO_4 , 0,79gr K_2HPO_4 , 4gr NaCl, 500 ml dH_2O , pH=7,4 ayarlanmıştır küçük hacimde çözüp sonra suyla tamamlanmıştır. Çözelti otoklavlanıp oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.1.3.6. (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (MTT)

5 mg MTT tartılmış ve 1ml PBS içinde çözölmüştür. 0,22um filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir ve -20°C'de saklanmıştır.

2.1.4. Kullanılan cihazlar

Isıticılı Manyetike karıştırıcı (IKA RH Basic 2 ve wisestir msh-20A), SDS-PAGE Elektroforez Cihazı (ATTO), Otoklav (Hirayama Hv-50L), Thermal cycler PCR (Blue Ray Biotech, TCL9T620), Mikro Santrifüj (Hettich mikro200 ve Thermo), Spektrofotometer (Thermo Scientific), Etüv (Nüve EN500), Terazi (Denver Instrument), Soğutmalı Santrifüj (Nüve NF 1200R ve NF800R) Transilluminator (FRONT), 3.5K MWCO, 16mm Dialysis Tubing (Thermo Scientific), Agaroz Elektroforez Cihazı (Thermo EC320), Distile Su Cihazı (GFL2004), Çalkalamalı Su Banyosu (GFL1003).

2.1.5. Kullanılan besiyeri ve kimyasallar

Brain Heart infusion (BHI) (LAB049), Trypton Soy Broth (Merk ve Biokar), Agar Agar (Oxoid), Mueller Hinton Broth (Biokar), Tripsin, Amonyum persülfat, Bisakrilamid, Amonyum sülfat, Commassie Brillentblue R-250, Gliserol, Tris-Base (NZYTech), Izopropanol, Potatoes Dextrose Agar, MetEtanol, SDS, Phosphate Buffered Saline (PBS), Nutrient Broth, TEMED, HCL, NaOH, Yeast Extract, (Merck), Aseton (Tek-PATH), NaCl, Protein Marker, Agaroz (Sigma), Dream Taq Green PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific), Asetik asit (Riedeldeltaen), (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (MTT).

2.2. Yöntem

2.2.1. Bt-37Q2 örneklerinin hazırlanması

37Q2 suşu, canlandırılması için Nutrient agar'a ekilerek ve gece boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, tek bir koloni seçilerek LB broth'a inoküle edilmiştir. Kültür, 30°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve ardından kültürden 250 µl alınarak eşit hacimde %50 steril gliserol ile stoklar hazırlanmıştır. Elde edilen stoklar, -20°C ve -80°C'de saklanmıştır.

2.2.2. Bt 37Q2 suşunun bakteriyosin benzeri madde üretim kinetiklerinin belirlenmesi

Bakteriyosin aktivitesi göstermiş olan Bt-37Q2 suşunun bakteriyosin üretim kinetiği incelenmiştir. Bunun için, Bt-37Q2 suşu 5 ml'lik TSB içinde 28 °C'de 2-4 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. OD 0.1'e ulaştığında flasklara %5 TSA oranında 250 µl kültür inoküle edilmiş ve 28°C'de 1 gün inkübe edilmiştir. Duplike örneklerden 4 saat aryla (4, 8, 12, 16, 20, 24 saat) 1'er ml 2 adet kültür alınmış olup, 1 ml'si 600 nm'de hücre büyümesinin spektrofotometrik olarak gözlenmesinde kullanılmış; diğer 1 ml'si 8000Xg 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen bu süpernantlar; 0.45 µm filtreden geçirilerek, (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan 90 µl alınarak *B. cereus* içeren soft agar petrilinde açılan kuyucuklara eklenmiştir. Difüzyon olması için 22 saat 4°C de bırakılmış, ardından 28°C de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler en az iki defa tekrarlanarak sonuçların ortalaması verilmiştir.

$$\text{Aktivite (AU/ml)} = \text{En Son Zon Çapı (mm)} \times 1000 / 90 \mu\text{l}$$



Şekil: Otoklavlanmış Besyerleri



Şekil: 37Q2 Stoğu

2.2.3. Bakteriyosin benzeri maddenin karakterizasyonu

Bt 37Q2 suşu en yüksek bakteriyosin üretiminin ve aktivitesinin görüldüğü zaman periyodunda TSB'de kültüre alınmıştır. Farklı sıcaklık ve pH'nın filtre edilen kültür süpernatantları (CFS) üzerindeki etkisi incelenmiştir. Deneyler en az iki defa tekrarlanarak sonuçların ortalaması verilmiştir. Kalan aktivite yüzdesi, işlem görmüş

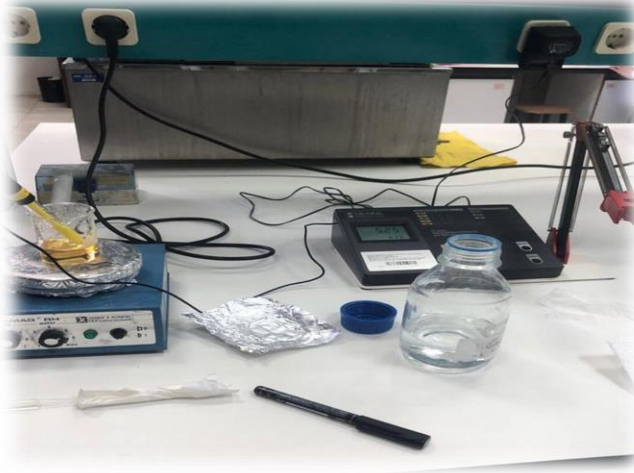
supernatantın oluşturduğu zon çapı 100 ile çarpılıp işlem görmemiş CFS'ye bölünerek elde edilmiştir.

2.2.3.1. Farklı sıcaklıkların bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

Bt 37Q2 suşu, bakteriyosin üretim kinetiğinin en yüksek tespit edildiği 8 saat süresince büyütülmüş ve ardından 8000xg'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu elde edilen CFS, 0.45 mm'lik filtreden geçirilmiş ve 300 l 'lik süpernatantlar alınarak ependorf tüplere ısıtıcı blokta 30 dakika ve 2 saat boyunca farklı sıcaklıklarda (30, 40, 50, 60 ve 70°C) inkübe edilmiş. İşlem görmüş CSF 2 kat dilüsyon (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) hazırlanmıştır. Hazırlanan delisyonlardan 90 l alınarak *B. cereus* içeren soft agar petrilerinde açılan kuyucuklara eklenmiştir. Difüzyon olması için 22 saat 4°C de bırakılmış, ardından 28°C de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.3.2. Farklı pH değerlerinin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

CFS'in aktivitesinin farklı pH değerleri altındaki etkileri belirlemek amacıyla, kültür süpernatantının pH'ını ayarlamak amacıyla HCl ve NaOH tamponları kullanılmıştır. pH değerleri 3, 4, 5 ve 6'ya HCL ile; pH 7, 8, 9 ve 10'a ise NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. CFS'in pH kararlılığı için, 2 saat boyunca buz üzerinde bekletildikten sonra pH değeri tekrar 7'ye ayarlanmıştır. İşlem görmüş CSF 2 kat dilüsyon (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) hazırlanmıştır. Hazırlanan delisyonlardan 90 l alınarak *B. cereus* içeren soft agar petrilerinde açılan kuyucuklara eklenmiştir. Difüzyon olması için 22 saat 4°C de bırakılmış, ardından 28°C de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil : pH ölçüm cihazı

2.2.3.3. Farklı enzimlerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

37Q2 suşundan elde edilen süpernatant farklı enzimlerle muamele edilmiş ve antimikrobiyal aktivite üzerinde etkisi incelenmiştir. Proteinaz K, tripsin, α -amilaz, lipaz enzimleri gibi dört farklı enzim son konsantrasyon 1mg/ml olarak kullanılmış ve örnekler 2 saat enzimle muamele edilmiştir. İşlem görmüş CSF 2 kat dilüsyon (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan 90 μ l alınarak *B. cereus* içeren soft agar petrilerinde açılan kuyucuklara eklenmiştir. Difüzyon olması için 22 saat 4°C de bırakılmış, ardından 28°C de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak enzimlere muamele edilmemiş CFS kullanılmıştır.

2.2.4. 16S rDNA ve Hag geni analizi

Bt-37Q2 suşundan elde edilen genomik DNA, 16SrDNA ve Hag genlerini çoğaltmak için kullanılan primerlerle amplifiye edilmiştir. 16SrDNA geni için kullanılan Forward (F) primeri 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3' ve Reverse (R) primeri 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (10mM) olarak belirlenmiştir. Hag geni için kullanılan primerler ise F: 5'- ATGAGCAATTCTATGGACCG-3' ve R: 5' TTTCAGACATTTCTTTCGCC-3' (10mM) olarak belirlenmiştir (la Cruz D vd.,

2018; León-Galván vd., 2009). Bu primerlerin sentezi Macrogen Europe firması tarafından gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu, Dream Taq enzimi (Thermo scientific PCR master mix (2x) kullanılarak yapılmış 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 ve 8.5 µl ddH₂O içermektedir. DNA içermeyen PCR reaksiyonu negatif kontrol olarak, Bt subsp. *kurstaki* (4D1)'den elde edilen DNA ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

16SrDNA geni, belirtilen PCR programı uygulanarak 30 döngüde çoğaltılmıştır: Ön denatürasyon: 95°C'de 5 dakika; denatürasyon: 95°C'de 1 dakika; bağlanma: 60°C'de 1 dakika; uzama: 72°C 2 dakika; son uzama: 72 °C'de 10 dakika uygulanmıştır. *Hag* geni için uygulanan PCR programı ise şu şekildedir: Ön denatürasyon: 95°C'de 5 dakika; denatürasyon: 95°C'de 1 dakika; bağlanma: 48°C'de 2 dakika; uzama: 72°C'de 2 dakika; son uzama: 72°C'de 7 dakika.

Her bir PCR ürünü, % 1 agaroz jelde 100 voltta 30 dakika boyunca çalıştırılmış ve jel dokümantasyon sistemi (Vilber Lourmat) ile görüntülenmiştir. Moleküler ağırlık markerı olarak O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder kullanılmıştır. PCR ürünleri DNA sekanslayıcı firmaya gönderilmiş ve elde edilen sekanslar NCBI'da yer alan BLAST programı ve BioEdit kullanılarak analiz edilmiştir.

2.2.5. Bakteriyosin benzeri maddenin kısmi pürifikasyonu

En yüksek bakteriyosin üretiminin ve aktivitesinin görüldüğü zaman periyodunda Bt-37Q2 suşu 200 ml'lik TSB'de kültüre alınmıştır. Bakteri süpernatantı (CFS) bakteri kültürünün 8000 rpm'de 4°C'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Her 15 dakikada bir 1 saat boyunca buz üzerinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılıp, uygun miktarda amonyum sülfat (%40, %60 ve %80) CFS'ye ilave edilmiş, daha sonra saturasyon için 4°C'de 22 saat süreyle karıştırılarak konsantre edilmiştir. Çökelmiş proteinler 8000 rpm'de, 4°C'de 30 dakika santrifüjlenmiş ve 20 mM Tris-HCL, pH 7 tamponunda çözülmüştür. Daha sonra, 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 edilmiş ve 0.45 µl'lik filtreden geçirilip, -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.6. Saflaştırılmış protein aktivitesinin antimikrobiyal spektrumu

BBPP'nin kısmi saflaştırılmış etki spektrumunu belirlemek için, Gram (+) ve Gram (-) zelliklere sahip toplamda 10 bakteri türü üzerinde antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu difüzyon yöntemiyle test edilmiştir. Agar plakaları için %0.7 soft agar içeren MHB (25 ml) kullanılarak, 0.5 McFarland yoğunluğuna sahip indikatör bakteri ile karıştırılmış ve petri kaplarına dklmştir. Daha sonra kuyucuklara 50 l BBPP ile karışlaştırmak için 90 l süpernatant (CFS) eklenmiştir ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. *B. cereus* indikatör suşu, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

2.2.7. Ultrafiltasyon

Ultrafiltasyon, Bakteriyosin benzeri protein preparasyonunu (BBPP) konsantre etmek amacıyla uygulanmıştır. Bu işlemde, BBPP, Vivaspin 500 (Sartorius) adlı tüpler içinde bulunan 10.000 MWCO ultrafiltasyon membranına yüklenip, 12.000 rpm hızında 15 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Elde edilen üstteki kısmı (konsantrat) ve alttaki kısmı (filtrat), aktivitelerini belirlemek amacıyla agar kuyu difüzyon yöntemiyle test edilmiştir. Bu amaçla, 25 ml %0.7 oranında soft agar içeren TSB kullanılarak, 50 l indikatör bakteri *B. cereus* ile karıştırılarak petri kaplarına dklmştir. Açılan kuyucuklara 50 l konsantrat ve 50 l filtrat eklenerek antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir.

2.2.8. SDS-PAGE

Eşit miktardaki BBPP rnekleri Laemmli tamponunda 15% SDS-PAGE'e yerleştirilerek elektroforeze tabi tutulmuştur (Laemmli 1970). Moleküler ağırlık için hazırlanan jelde BBPP rneği eşit miktarda SDS-PAGE yükleme tamponuyla karıştırılıp 10 dakika kaynatılmıştır. Protein rnekleri kuyucuklara yüklenerek 150V'da yaklaşık 2 saat yrtlmştir. Elektroforez işleminden sonra jel %5 asetik asit çözeltisi ile 15 dakika fiksasyon yapılmıştır. Jel Comassie Brilliant Blue R-250 ile boyanmış ve boyanın uzaklaştırılması için *destaining* solüsyonu kullanılmıştır. Daha sonra, jel transilluminatrde beyaz ışık altında görüntülenmiştir. Moleküler ağırlık marker olarak PageRuler SMO661(Fermentas) kullanılmıştır

2.2.9. BBIM'in kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisinin MTT analizi

Bt-37Q2'den elde edilen BBIM'in kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi Uğur vd. (2017) tarafından kullanılan MTT yöntemine göre incelenmiştir. Bu yöntem, sarı renkli suda çözünabilir substratın [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid] metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondriyal enzimleri tarafından suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşmesine dayanmaktadır. Kısmi olarak saflaştırılan BBIM farklı konsantrasyonlarda akciğer kanser hücre hattı (A549) ve prostat kanseri hücre hattına (PC-3) uygulanmıştır. Daha sonra 24-48 ve 72 saat inkübasyona maruz bırakılmıştır. Ardından, 96 kuyulu hücre kültürü kaplarında bulunan besi ortamı boşaltılarak yerine 100 µl yeni besi ortamı eklenmiştir. Sonrasında MTT solüsyonu (5mg/ml) her bir kuyuya 1:10 oranında eklenmiştir ve 4 saat 37°C'de, %5 CO₂'li ve %96 nemli inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 100µl DMSO eklenmiş ve 150 rpm'lik orbital çalkalayıcıda 5 dakika karışması sağlanmıştır. Her bir kuyudaki Optik yoğunluk (absorbans) 540nm'de mikro plaka okuyucu (Mikroplate reader, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile tespit edilmiştir.

2.2.10. BBIM'nin anjiyojenez etkisinin belirlenmesi

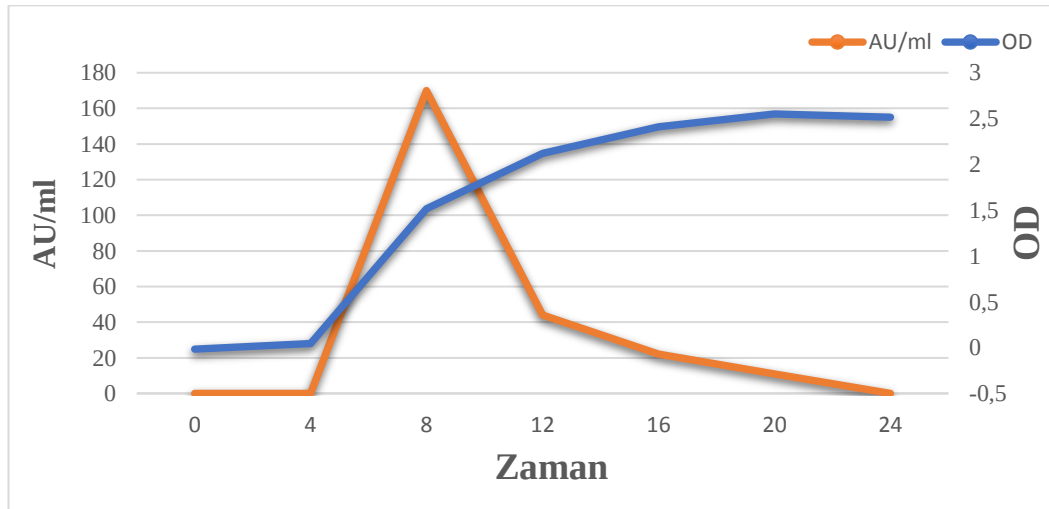
Bt-37Q2'den elde edilen BBIM'nin, hücrelerde damar endotel büyüme faktörü üretimini baskılayıp baskılamadığı Human VEGF Elisa kiti (Boster-PicoKine Elisa Kit) kullanılarak tespit edilmiştir. Deneylerde A549 hücreleri kullanılmıştır. Hücreler 6 kuyulu plakalarda $2,5 \times 10^3$ hücre/ml olacak şekilde, 37°C'de, %5 CO₂'li ve %96 nemli inkübatörde 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Belirlenen dozda (50µg/ml) BBIM eklenmiş ve 6 veya 24 saat inkübe edilmiştir. Hücre süspansiyonu toplanmış ve 14000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Elde edilen supernatant kullanılan kitte verilen talimatlara uygun olarak VEGF salgılanmasının belirlenmesinde kullanılmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

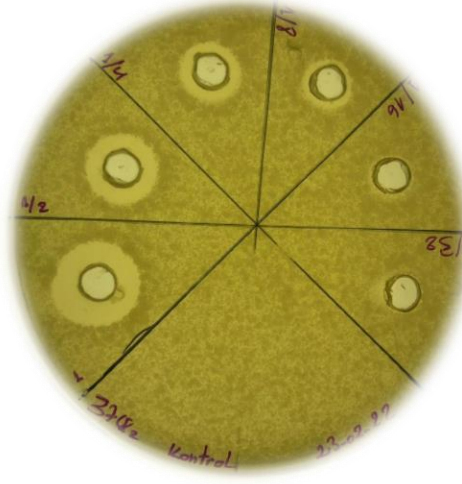
Bu çalışmada önceki çalışmalarımızda *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal etkisi en yüksek olduğu belirlenen Bt-37Q2 suşunun büyüme eğrisi, bakteriyosin üretim kinetiği, çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal spektrumu ve çeşitli kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

3.1. Büyüme Eğrisi ve Bakteriyosin Üretim Kinetiğinin Belirlenmesi

Önceki çalışmada *B. cereus*'a karşı 18 mm inhibisyon zonu gösterdiği tespit edilen Bt 37Q2 suşunun büyüme eğrisi ve antimikrobiyal aktivitesinin kinetiği farklı zamanlarda incelenmiştir. Bunun için 37Q2 suşu 28C°'de TSB'de 24 saat inkübe edilmiştir ve 4 saatte bir örnek alınarak absorbans (OD 600 nm) ölçülmüş ve antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu diffüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bt suşunun büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiği şekil 3.1'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi bakteri büyümesi 4 saat süren lag fazından sonra gözlenmeye başlamış ve 20 saat sonra durgun faza girmiştir. Bakteriyosin aktivitesi ise logaritmik fazın başlarında gözlenmeye başlamış ve 8. saatte maksimum düzeye ulaşmıştır (170AU/ml). Daha sonra bakteriyosin aktivitesi azalmaya başlamış ve 20. saatte (11AU/ml) ulaşmış, 24. saatte ise tamamen kaybolmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bt 37Q2'nin büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiği.

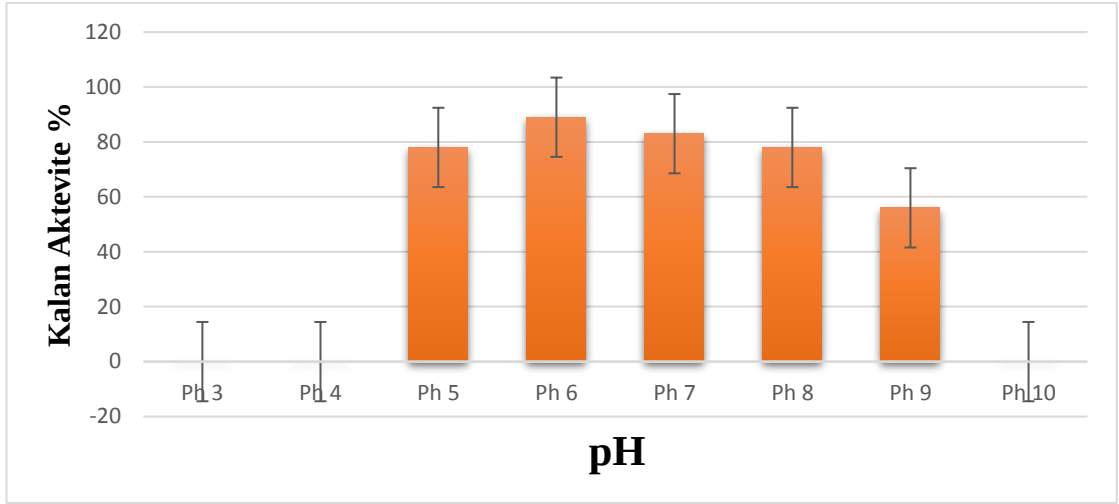


Şekil 3.2. 8. saatte bakteriyosin aktivitesinin petrideki görünümü.

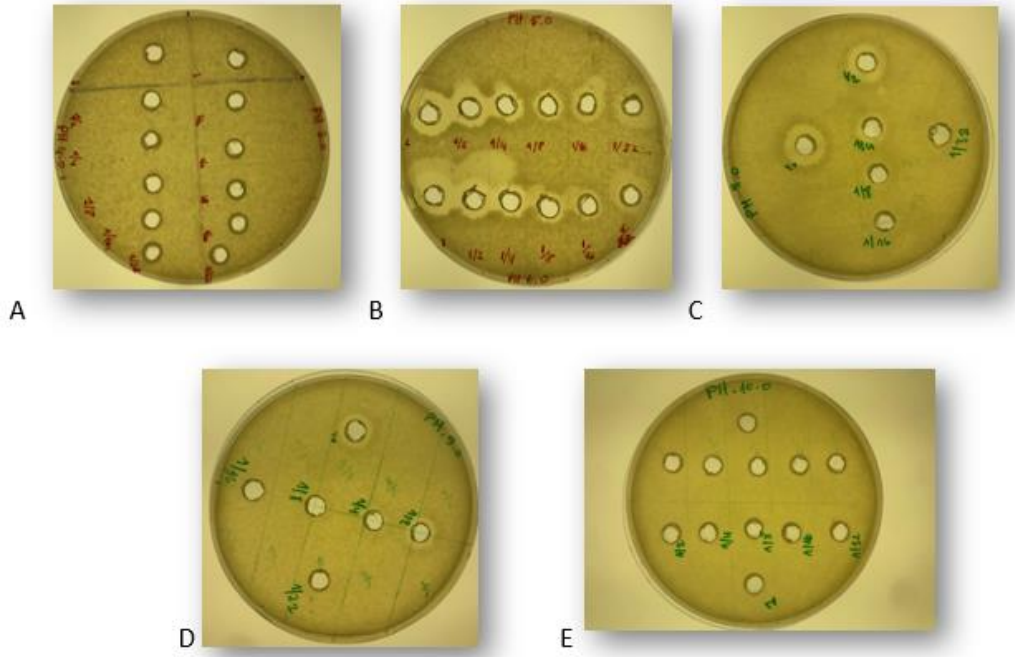
3.2. Bakteriyosin Aktivitesinin Karakterizasyonu

3.2.1. Bakteriyosin aktivitesi üzerinde pH'nin etkisi

37Q2 suşundan elde edilen bakteriyosinin pH'ya karşı dayanıklılığını tespit etmek amacıyla farklı pH değerlerinde bakteriyosin aktivitesinin değişip değişmediği incelenmiştir. Bunun için Bt 37Q2 suşunun kültür süpernatantlarının (CFS) pH değerleri 3-10 arasında ayarlanmış ve bakteriyosin aktiviteleri tespit edilmiştir. Her bir pH değerinde elde edilen zon çapları ölçülmüş ve işlem görmemiş süpernatantların oluşturduğu kontrol grubu ile kıyaslanarak kalan aktivite elde edilmiştir (Şekil 3.3). En yüksek bakteriyosin aktivitesi (%90) pH 6'da gözlenirken en düşük aktivite (%55) pH 9'da tespit edilmiştir. Buna karşın pH 3, pH4 ve pH10'da hiç aktivite gözlenmemiştir.



Şekil 3.3. Bt 37Q2'den elde edilen bakteriyosin aktivitesi üzerinde pH etkisi.



Şekil 3.4. Bakteriyosin benzeri maddenin farklı pH'lerde *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesinin görünümü. A: pH 3 ve 4; B: pH 5 ve 6 ; C: pH 8; D: pH 9; E: pH 10

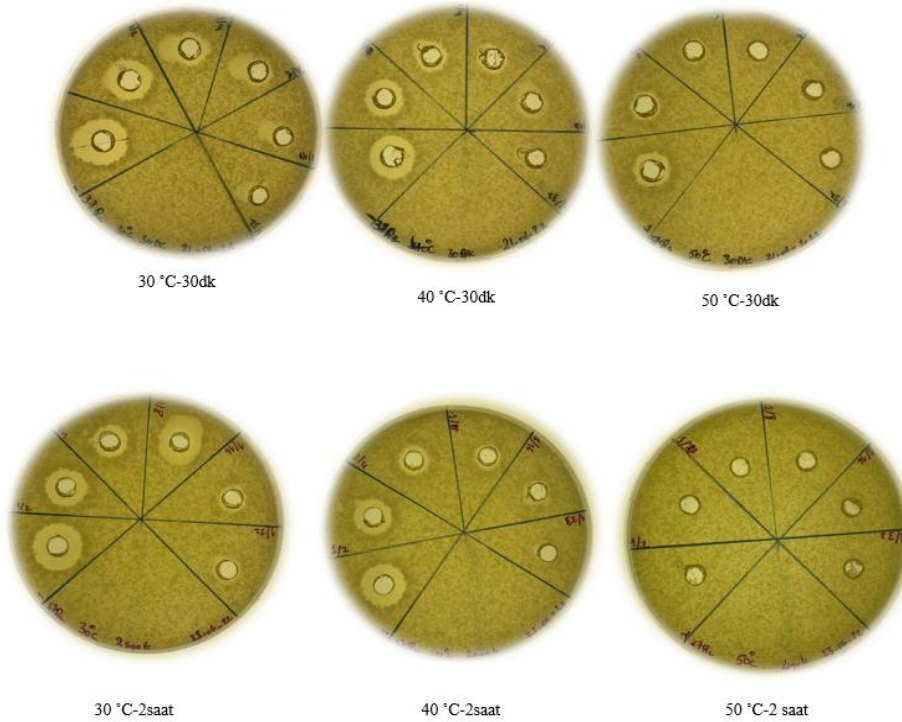
3.2.2. Bakteriyosin aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisi

Bt 37Q2 suşunun bakteriyosin aktivitesinin farklı sıcaklıklarda nasıl değiştiğini tespit etmek amacıyla kültür süpernatantları farklı sıcaklıklara (30-70 °C'de) farklı sürelerde (30 dakika 2 saat) maruz bırakılmıştır. Sıcaklığa maruz bırakılmış süpernatantların *B.*

cereus'a karşı oluşturduğu zon çapları ölçülmüş ve sıcaklık uygulanmamış kontrole kıyaslandığında elde edilen kalan aktivite Tablo 3.4'de verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi kültür süpernatantları en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi 30-40°C'de göstermiştir. 50°C'de 30 dakikada aktivitesinin çoğunu kaybetmiş; ancak 50-70°C'de 2 saatte aktivitesini tamamen kaybettiği görülmüştür (Şekil 3.5).

Tablo 3.1. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi.

Sıcaklık °C	KALAN AKTİVİTE %	
	30 dakika	2 saat
30 °C	94	89
40°C	83	78
50°C	67	—
60°C	0	0
70°C	0	0



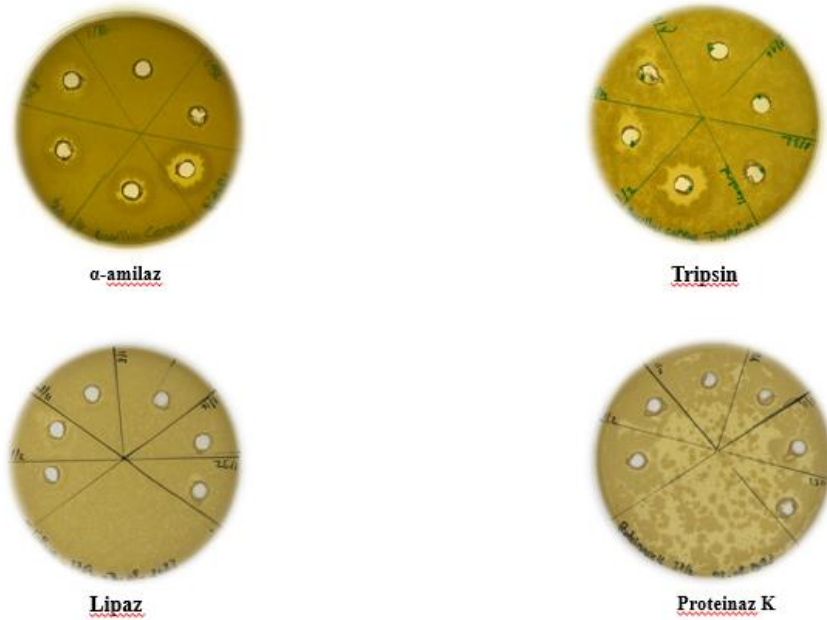
Şekil 3.5. Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin petrideki görünümü.

3.2.3. Bakteriyosin aktiviteleri üzerine enzimlerin etkisi

37Q2 suşundan elde edilen süpernatant farklı enzimlerle muamele edilmiş ve antimikrobiyal aktivite üzerinde etkisi incelenmiştir. Proteinaz K, tripsin, α -amilaz, lipaz enzimleri gibi dört farklı enzim son konsantrasyon 1mg/ml olarak kullanılmış ve örnekler 2 saat enzimle muamele edilmiştir. Proteinaz K (PK) ve lipaz enzimlerdeki aktivitenin tamamen kaybolduğunu görülmüştür, α -amilaz ise aktivitesini koruduğunu gözlenmiştir ancak Tripsin uygulamasının ardından bakteriyosin aktivitesinde kısmi bir azalmanın gözlemlendiği tespit edilmiştir. (Şekil 3.6)

Enzimler	Kalan Aktivite %
Proteinaz K	0
Lipaz	0
α -amilaz	89
Tripsin	67,6

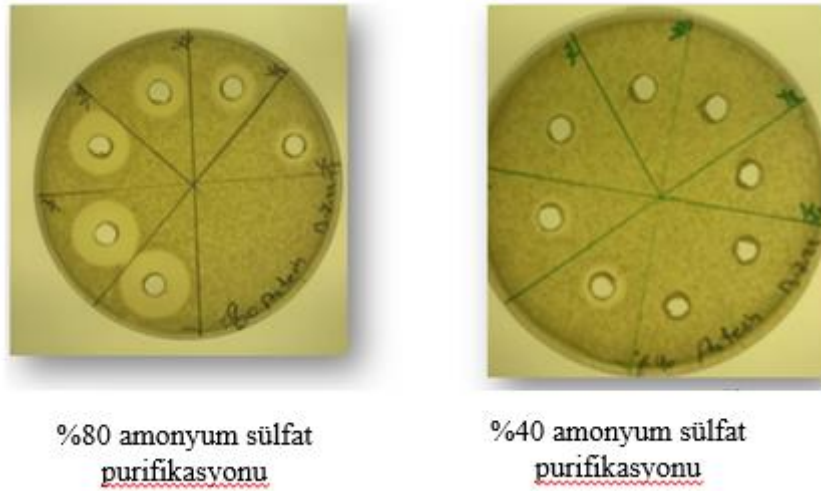
Tablo 3.5. Bakteriyosin aktivitelerine enzimlerin etkisi.



Şekil 3.6. Enzimlerin bakteriyosinin aktivitesi üzerindeki etkilerinin petrideki görünümü.

3.2. Bakteriyosinin Amonyum Sülfat ile Kısmi Purifikasyon

En yüksek bakteriyosin üretiminin ve aktivitesinin görüldüğü zaman periyodunda Bt-37Q2 suşu 200 ml'lik TSB'de kültüre alınmıştır. Bakteri süpernatantı (CFS) bakteri kültürünün 8000 rpm'de 4°C'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Her 15 dakikada bir 1 saat boyunca buz üzerinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılıp, uygun miktarda amonyum sülfat (%40, %60 ve %80) CFS'ye ilave edilmiş, daha sonra saturasyon için 4°C'de 22 saat süreyle karıştırılarak konsantre edilmiştir. Çökelmiş proteinler 8000 rpm'de, 4°C'de 30 dakika santrifüjlenmiş ve 20 mM Tris-HCL, pH 7 tamponunda çözölmüştür. Daha sonra, 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 edilmiş ve 0.45 µl'lik filtreden geçirilip, -20 °C'de saklanmıştır. %80 amonyum sülfat pürifikasyonunda antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir.

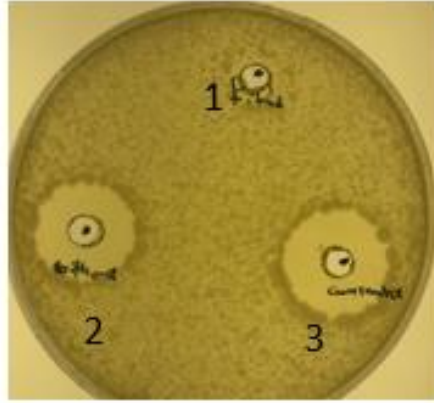


Şekil 3.7. Kısmi olarak saflaştırılan BBPP'nun antimikrobiyal aktivitesi.

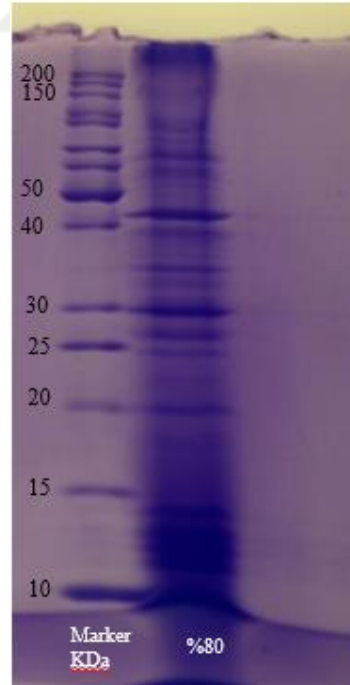
3.3. SDS-PAGE Analizi

Bt 37Q2 suşundan elde edilen supernatant amonyum sülfat (%80) çöktürmesine tabi tutularak kısmi olarak saflaştırma sağlanmıştır. Bakteriyosin benzeri protein preparasyonunu (BBPP) daha yoğun hale getirmek için ultrafiltrasyon (10000 MWCO)

işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7). Filtrasyon sonucu uzaklaştırılan protein bantlarının (filtrate) antimikrobiyal aktivitesini de test etmek amacıyla hem filtratın hem de tüpte kalan konsantratin antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Şekil 3.7’de görüldüğü gibi filtratta hiç antimikrobiyal aktivite gözlenmemiştir. Ayrıca, kısmi olarak saflaştırılan ve ultrafiltrasyona tabi tutulan BBPP’nin protein bantlarını görüntülemek için SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Şekil 3.8).



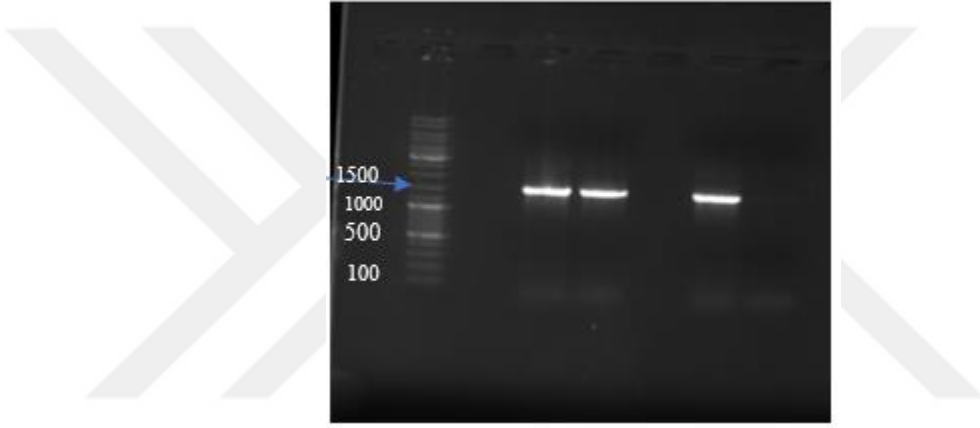
Şekil 3.8. Ultrafiltrasyon yapılan BBPP’nun *B. cereus*’a karşı antimikrobiyal aktivitesi. 1: alt kısım (filtrat); 2: Ultrafiltrasyon uygulanmayan BBPP; 3: üst kısım (konsantrat).



Şekil 3.9. 37Q2’den elde edilen bakteriyosin benzeri protein örneğinin (BBPP) %15 SDS- PAGE analizi. 1- Moleküler ağırlık marker; 2- Konsantre edilen BBPP.

3.4. 7Q2 Suşunun 16s rDNA Analizi

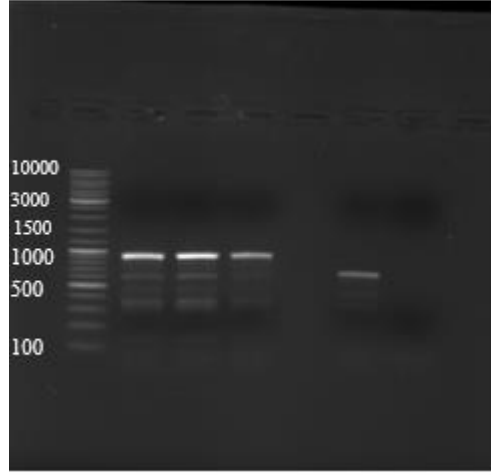
B. thuringiensis içerdiği kristal inklüzyonların varlığı ile *B. cereus*'dan ayrılmaktadır. Bu nedenle faz contrast mikroskonu ile yapılan gözlemler sonucu parasporal kristal yapının varlığı 37Q2 suşunda tespit edilmiştir. İlave olarak, 37Q2 suşunun Bt olduğunu teyit etmek için 16S rDNA gen sekans analizi gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA genine ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonucunda 1500 bp uzunluğunda PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 3.9). Bu analizde pozitif kontrol olarak *B. thuringiensis supsp. kurstaki* (4D1) kullanılmıştır.



Şekil 3.10. 16s rDNA PCR ürünün agaroz jel'de görüntüsü.

3.5. Bt 37Q2 Hag Geni PCR Analizi

Bt'nin alt türünü belirlemek için 37Q2'dan elde edilen DNA, *Hag* geni primerleri ile çoğaltılmış ve beklendiği gibi 900 bp uzunluğunda PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.11. 37Q2 *Hag* geni ile yapılan PCR 'ın agaroz jel görüntüsü.

3.6. Bt37Q2'nin 16S rDNA Analizi

37Q2 suşunda 16S rDNA'yı kodlayan gen bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve MacroGen firması tarafından DNA nukleotid dizisi belirlenmiştir. Bioedit programı kullanılarak Sekans sonuçları birleştirilmiş ve 37Q2 için konsensüs sekansları elde edilmiştir. www.pubmed.com adresindeki Nükleotid blast programı kullanılarak veritabanındaki 16S rDNA dizileri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar 37Q2 bakterisi ile veri tabanında bulunan ve tür olarak teşhis edilen *Bacillus thuringiensis* bakterisi ile %99 homoloji olduğunu göstermiştir. (Tablo 3.3; Şekil 3.11).

Tablo 3.3. 37Q2 suşuna ait 16s rDNA konsensus ve BLAST karşılaştırma sonucu

```
TACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGG
TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTA
ATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACT
TATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGMCGAAKTCTGASGGAGMAACS
CCGCKTGARTGATGAAGGCTTTCGGGTGTAAAYTCTGTTGTTAGGGAAGAMCAAKTG
CTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCASGGCTAAYTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGSCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
GCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT
```

Tablo3.3. (Devam)

TGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAA
 ATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAC TGAC
 ACTGAGGCGCGAAAGCGTG GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
 AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGSTGAAGTTAACGCATTA
 AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGSCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
 CGCACAAGCGGTGGAGCAKKGKGGTTTAATTCGAAGCAACGCGRAGAACCTTACCAGGKC
 TTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGKG
 GTGCATGGKTKTCSTCARCTCSKGKCTGRGATGTTGGGTWAAKYCCCGACCAACGAGCG
 CAACCCTTGATCTTARTTGCCATCATTAAARTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
 AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC
 ACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATA
 AAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAG
 TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
 ACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTNGGAGCCA

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover
☐	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain 206314 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	2128	2128	99%
☐	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain J16OP6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	2128	2128	99%
☐	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain Z88 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	2128	2128	99%
☐	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain Z70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	2128	2128	99%
☐	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain Z64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	2128	2128	99%
☐	Bacillus cereus strain IAM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus cereus	2128	2128	99%
☒	Bacillus thuringiensis strain L33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus thuringiensis	2128	2128	99%
☐	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain CLC-M22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. (in: firmicutes)	2128	2128	99%
☐	Bacillus thuringiensis strain Md1-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus thuringiensis	2128	2128	99%
☐	Bacillus thuringiensis strain Md1-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus thuringiensis	2128	2128	99%
☐	Bacillus toyonensis strain FS-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus toyonensis	2128	2128	99%
☐	Bacillus thuringiensis strain ZLynn500-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus thuringiensis	2128	2128	99%
☐	Rossellomorea oryzaecorticis strain WJB138 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Rossellomorea oryzaecorticis	2128	2128	99%
☒	Bacillus thuringiensis strain C18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus thuringiensis	2128	2128	99%
☐	Bacillus thuringiensis strain M44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus thuringiensis	2128	2128	99%

Şekil 3.12. 16S rDNA'nın Blast analizi sonucu

3.7. Bt 37Q2 Suşunun Hag Geni ile Analizi

Bt 37Q2 suşuna ait *Hag* geni kodlayan gen bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılarak DNA dizisi belirlenmiş ve dizi analizi yapılmıştır. Sekans sonuçları Bioedit programı kullanarak 37Q2 suşunun altsuşı araştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda, 37Q2 suşunun veri tabanında bulunan *Bacillus thuringiensis subsp. tochiensis* bakterisi ile %98 oranında homoloji gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 3.4; Şekil 3.12).

Tablo 3.4. 37Q2 suşuna ait *Hag* geni konsensus ve BLAST karşılaştırma sonucu

TGAGCAATCTCTATGGACCGTTTATCAAGCGGTAAACGTATCAACAACGCTTCTGACGAT
GCAGCAGGTCTTGCAATCGCAACTCGTATGCGTGACATGAAAGTGGTCTTTTCAGTAGCA
GCTCGTAATACATCAGACGGTATTTCTTTAATCCGTACTGCTGATTACGCTTTACAATCTG
TATCTAATATTCTTCTTMTGATGCGTGACATCGCCMACCAAACGAAACGGAACCTAATA
AAGATACTGATATTGAAGCCTTAGGTAAAGAATTTGCCGCTTTAAAAGAACAATTACTT
ATGTTAGCGATAACACAAAATTTAATGGTAGAGAGCTATTAAGGCGGCGGATGATATC
AATATTCAAACGTACGATGGTAGCGACGAGTCCCAACAAATTAATTAATTAATATCTGA
ATTAGACCTTTCAAGTCTAGACACTGGTGAAGTTACAGACTCAGATACTGCTCGTGGAAC
TGTTAGCACACTTGATGACGCTATAACAAATATTGCTTCTAAGCGTGCTGAGTTAGGCGC
TACATTAAATCGTTTAGATTATAACACTCAAATGTAAACAGTGAGGCTGCAAGTATGGC
TGCATCTGCTTCTCAGATTGAAGATGCAGATATGGCGAAAGAATGGGTCTG

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover
☒ Bacillus tropicus strain FDAARGOS_782 chromosome, complete genome	Bacillus tropicus	1155	1155	98%
☒ Bacillus tropicus strain AOA-CPS1 chromosome	Bacillus tropicus	1155	1155	98%
☒ Bacillus thuringiensis strain XL6 chromosome, complete genome	Bacillus thuring...	1155	1155	98%
☒ Bacillus cereus ATCC 4342, complete genome	Bacillus cereus...	1155	1155	98%
☒ Bacillus sp. CRB-7 chromosome, complete genome	Bacillus sp. CR...	1155	1155	98%
☒ Bacillus thuringiensis serovar tochiensis strain IIBC-T19.001 flagellin (hag) gene, partial cds	Bacillus thuring...	1155	1155	98%
☒ Bacillus cereus strain FT9, complete genome	Bacillus cereus	440	440	38%
☒ Bacillus sp. FDAARGOS_235 chromosome, complete genome	Bacillus sp. FD...	296	296	45%
☒ Bacillus thuringiensis serovar neoleonensis strain IIBC-T24.001 soluble lytic murein transglycosylas...	Bacillus thuring...	296	296	45%
☒ Bacillus thuringiensis serovar xianguangensis strain IIBC-T51.001 flagellin (hag) gene, partial cds	Bacillus thuring...	296	296	45%
☒ Bacillus thuringiensis serovar navarrensensis strain IIBC-T50.001 flagellin (hag) gene, partial cds	Bacillus thuring...	292	292	53%
☒ Bacillus albus strain PFYN01 chromosome, complete genome	Bacillus albus	291	291	45%
☒ Bacillus toyonensis strain JAS22/1 chromosome, complete genome	Bacillus toyone...	291	291	45%
☒ Bacillus sp. PGP15 chromosome, complete genome	Bacillus sp. PG...	285	285	45%
☒ Bacillus sp. N5-665 strain N5/665 plasmid p1, complete sequence	Bacillus sp. N5...	285	285	45%
☒ Bacillus thuringiensis strain SCG04-02 chromosome, complete genome	Bacillus thuring...	283	283	45%
☒ Bacillus cereus strain NR1 chromosome, complete genome	Bacillus cereus	283	283	45%
☒ Bacillus thuringiensis serovar azorensis strain IIBC-T64.001 flagellin (hag) gene, partial cds	Bacillus thuring...	283	283	45%

Şekil 3.13. Hag gen Blast analizi.

3.8. Bt 37Q2 Antibakteriyal Etki Spektrumları

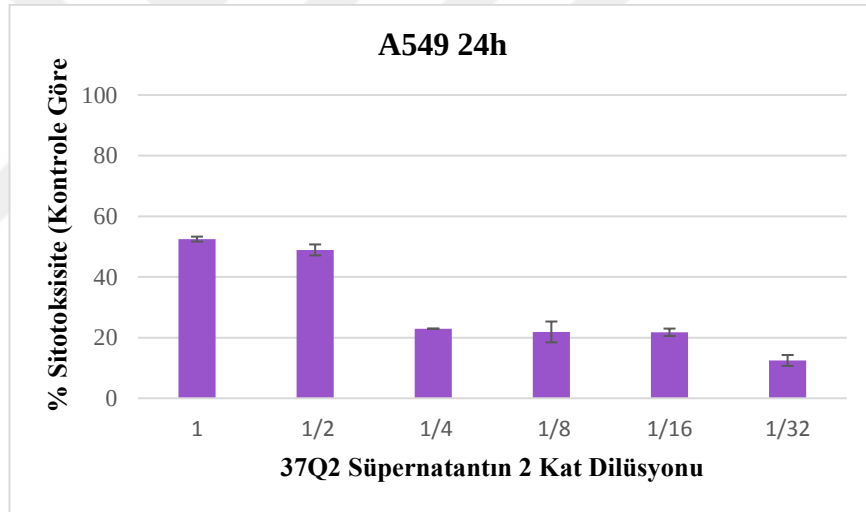
Bt-37Q2 suşundan elde edilen kültür süpernatantının ve kısmi olarak amonyum sülfat ile saflaştırılan BBPP'nin antimikrobiyal spektrumları çeşitli *Bacillus* türleri, Gram pozitif bakteriler ve Gram negatif bakteriler üzerinde kuyu difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.8'de verilmiştir. Hem süpernatant hem BBPP *Bacillus subtilis* hariç tüm *Bacillus* türleri üzerinde antimikrobiyal etki gösterirken diğer bakteriler ve *Candida albicans* üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir.

Suşların adı	Zon Çapları (mm)	
	Süpernatant	BBPP
Gram pozitif		
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>finitimus</i>	12	15
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>	17	19
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>galleriae</i>	16	20
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thompsoni</i>	15	20
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>	19	21
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>azawai</i>	19	22
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	-	15
<i>Bacillus cereus</i>	18	20
<i>Listeria</i> spp.	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-
Gram negative		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-
Fungal		
<i>Candida albicans</i>	-	-

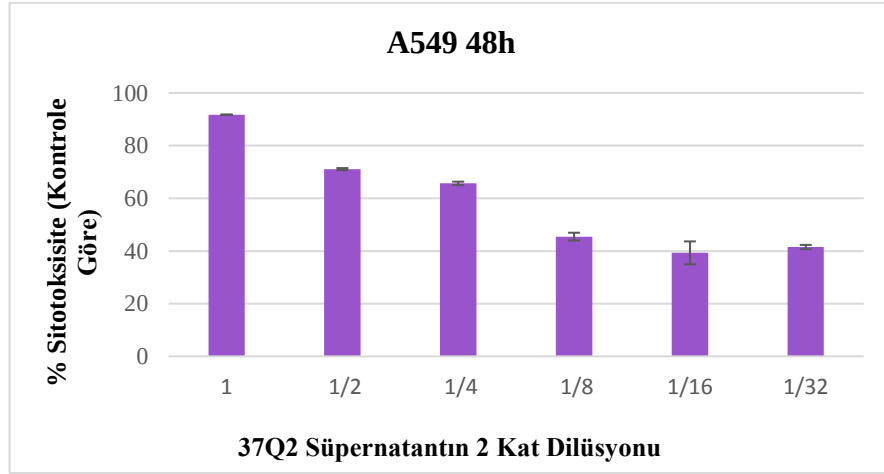
Tablo 3.5. Bt 37Q2 suşunun antimikrobiyal etki spektrumu.

3.9. Bt-37Q2 Supernatantının A549 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Aktivitesi

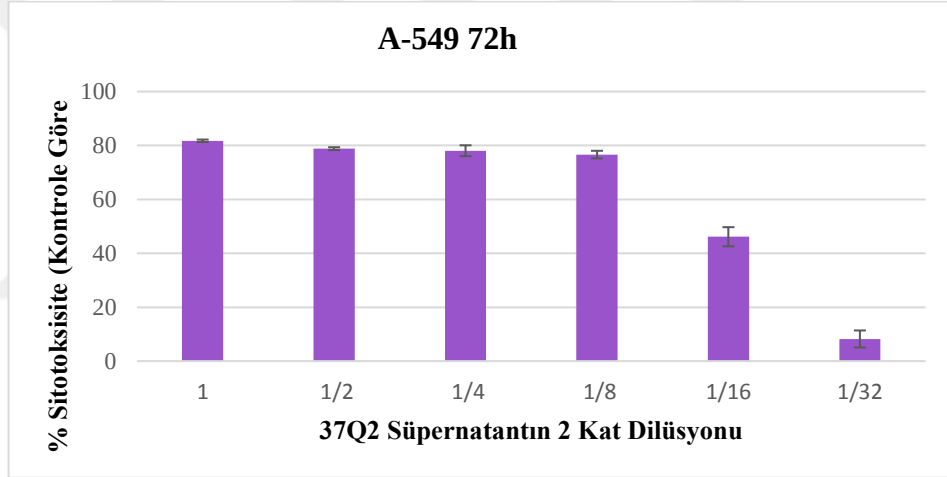
37Q2 süpernatantın iki kat dilüsyonunun, A549 hücresinde 24, 48 ve 72 saat sürede kontrole göre % sitotoksitesi incelenmiştir. 24 saat süre sonunda bu süpernatantın ilk 1 ve 1/2 dilüsyonlarında %50 oranında en yüksek sitotoksosite göstermiştir (şekil3.13). Buna karşın azalan konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir. 48 saat süre sonunda bu süpernatantı ilk konsantrasyon olan 1’de %90 oranında en yüksek, 1/2 ve 1/4 dilüsyonlarındada sırasıyla %70, %65 oranında sitotoksosite göstermiştir (şekil3.14) . 72 saat süre sonunda 37Q2 nin ilk dört konsantrasyonundaki (1-1/8) dilüsyonunda ortalama %80 oranında sitotoksik aktivite göstermiştir (şekil3.15).



Şekil 3.14. 37Q2 süpernatantının A549 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 24h.



Şekil 3.15. 37Q2 süpernatantının A549 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 48h.



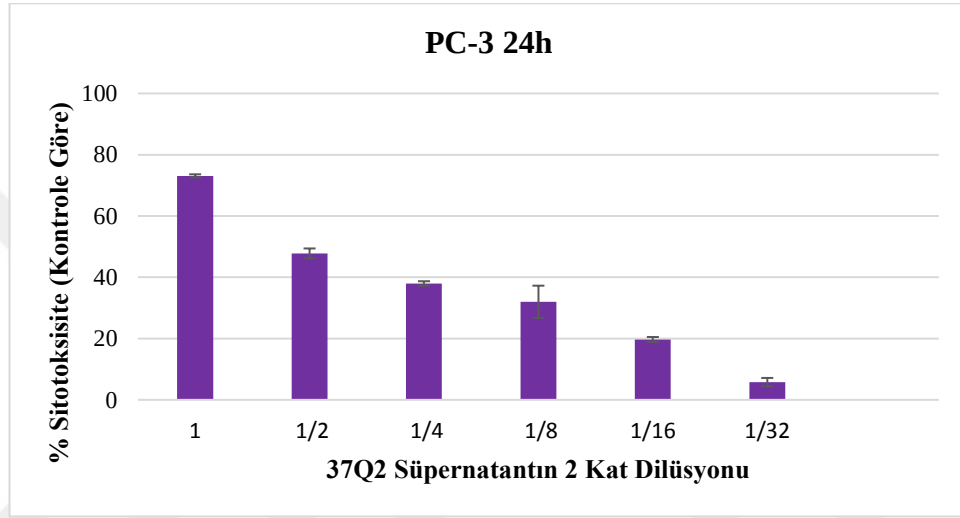
Şekil 3.16. 37Q2 süpernatantının A549 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 72h.

3.10. Bt-37Q2 Süpernatantının ve Kısmi Olarak Saflaştırılan Proteinin Pc-3 Hücrelerinde Sitotoksik Aktivitesi

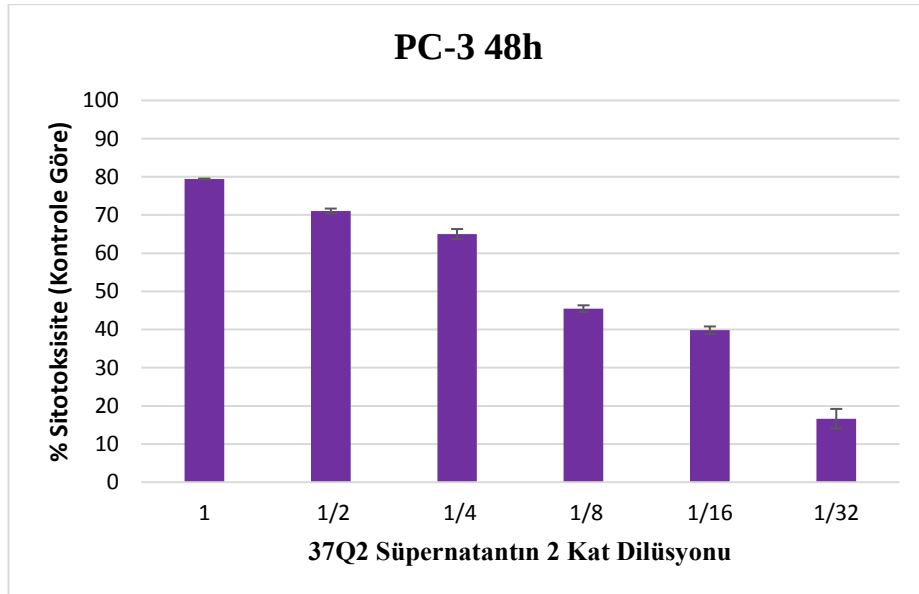
37Q2 süpernatantın iki kat dilüsyonunun, PC-3 hücresinde 24, 48 ve 72 saat sürede kontrole göre % sitotoksitesi incelenmiştir. 24 saat süre sonunda bu süşün süpernatantı şekil 3.16 verilen ilk konsantrasyonda %73 oranında en yüksek sitotoksosite göstermiştir. Buna karşın azalan konsantrasyonlardaki dilüsyonlarda sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir. 48 saat süre sonunda bu süşün süpernatantı ilk üç konsantrasyonda (1, 1/2 ve 1/4 dilüsyonunda) sırasıyla %79, %70 ve %65 oranında

sitotoksiste göstermiştir (şekil3.17). 72 saat süre sonunda 37Q2 nin sitotoksik aktivitesinin 48 saat süredeki ile benzer sonuç vermiştir (Şekil3.18).

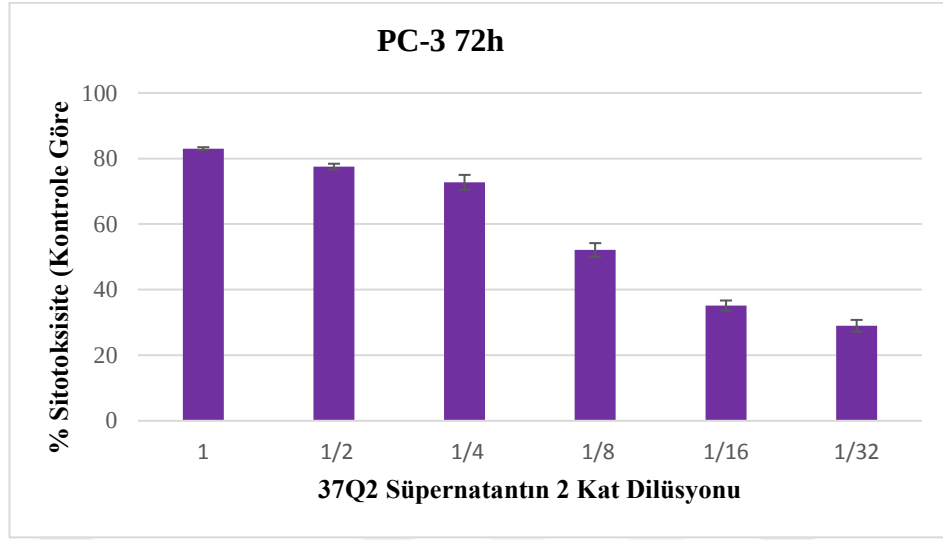
Kısmi saflaştırılan 37Q2 Proteinin 2 kat dilüsyonu PC-3 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat saat sürede kontrole göre % sitotoksitesi incelenmiştir. 24 saatte tüm dilüsyonlarda kontrole göre %70-79 oranlarında sitotoksik aktivite gözlenmiştir (şekil3.19). 48 ve 72 sürede tüm dilüsyonlarda kontrole göre ortalama %80-87 oranlarında sitotoksiste göstermiştir (şekil3.20).



Şekil 3.17. 37Q2 süpernatantının PC-3 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 24h.

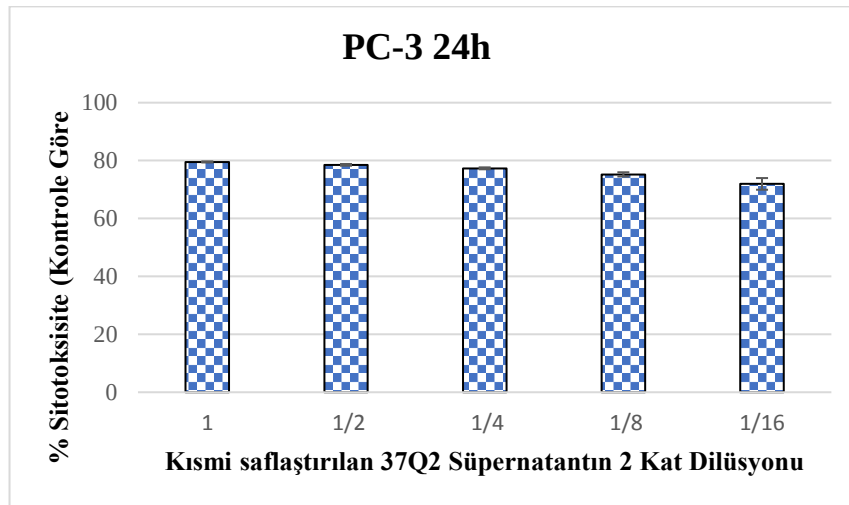


Şekil 3.18. 37Q2 süpernatantının PC-3 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 48h.

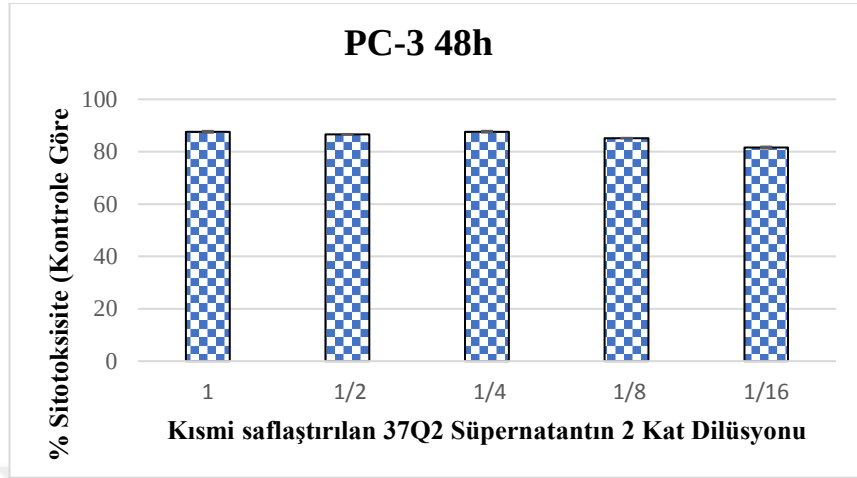


Şekil 3.19. 37Q2 süpernatantının PC-3 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi, 72h

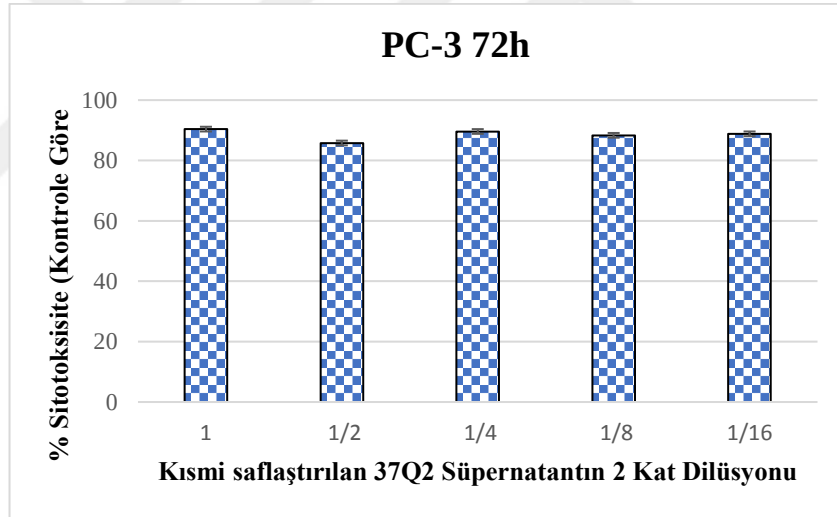
Bt-37Q2 suşu kültür süpernatantı %80 amonyum sülfat ile kısmi olarak saflaştırılmış ve protein konsantrasyonu Bradford yöntemiyle 0.378 mg/ml olarak bulunmuştur. Bu bakteriyosin benzeri protein preparasyonun (BBPP) doz ve zaman etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, BBPP 50 µg/ml ile başlanıp iki kat dilüsyon yaparak hücre kültürüne eklenmiştir. Şekil 3.19, 3.20 ve 3.21’de görüldüğü gibi BBPP 3.1 µg/ml konsantrasyonda dahi, incelenen tüm zaman periyotlarında (24,48 ve 72 saat) sırasıyla %70, %80 ve %90 düzeyinde sitotoksik aktivite sergilemiştir.



Şekil 3.20. 37Q2 kısmi saflaştırılan proteinin PC-3 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi, 24h.



Şekil 3.21. 37Q2 kısmi saflaştırılan proteinin PC-3 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi, 48h.

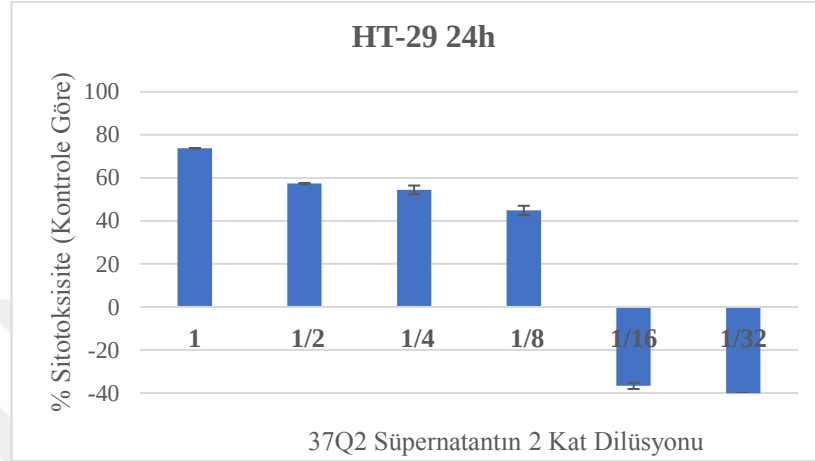


Şekil 3.22. 37Q2 kısmi saflaştırılan proteinin PC-3 hücrelerinde sitotoksik aktivite, 72h.

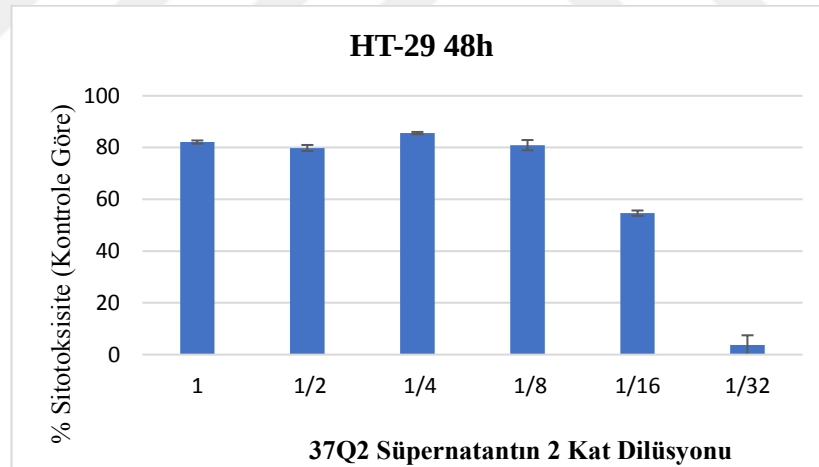
3.11. Bt-37Q2 Supernatantının HT-29 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Aktivitesi

37Q2 süpernatantın iki kat dilüsyonunun, HT-29 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sürede kontrole göre % sitotoksitesi incelenmiştir. 24 saat süre sonunda bu süşun süpernatantının ilk 1 ve 1/2 dilüsyonlarında sırayla %75 ve %60 oranında en yüksek sitotoksosite göstermiştir (şekil3.22). Buna karşın azalan konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir. 48 saat süre sonunda bu süşun

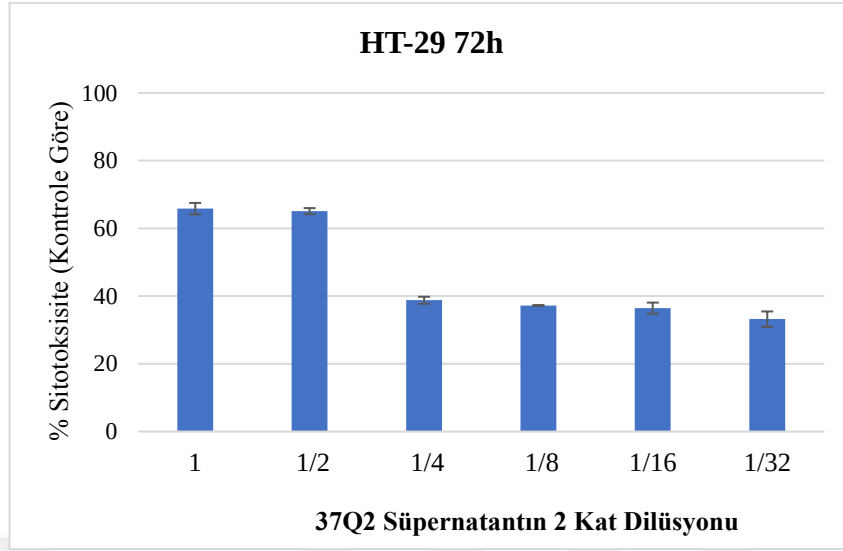
süpernatantı $\frac{1}{4}$ dilüsyonunda %85 oranında en yüksek, $\frac{1}{2}$ ve $\frac{1}{8}$ dilüsyonlarındada %80 oranında sitotoksikite göstermiştir (şekil3.23). 72 saat süre sonunda bu süşun süpernatantının ilk olan konsantrasyon 1’de ve $\frac{1}{4}$ dilüsyonlarındada %65 oranında sitotoksik aktivite göstermiştir (şekil3.24).



Şekil 3.23. 37Q2 süpernatantının HT-29 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 24h.



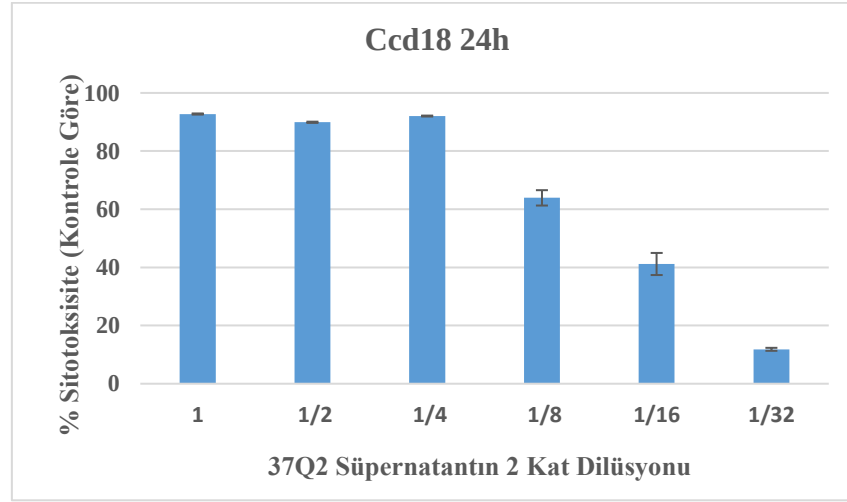
Şekil 3.24. 37Q2 süpernatantının HT-29 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 48h.



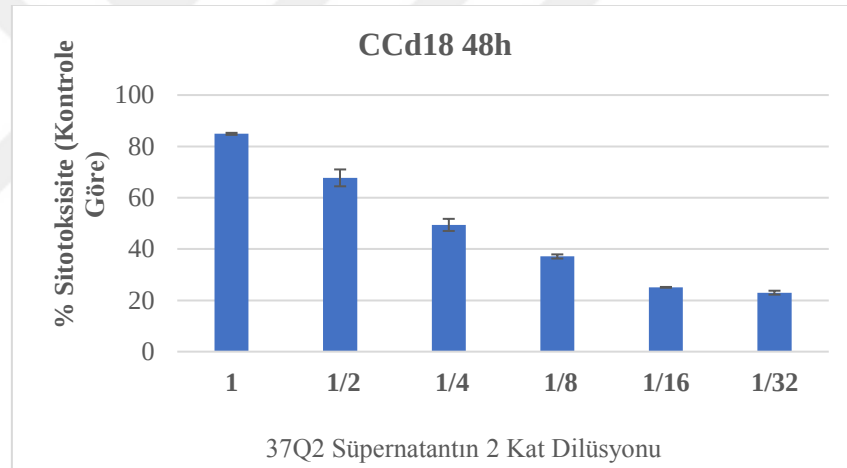
Şekil 3.25. 37Q2 süpernatantının HT-29 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 72h.

3.13. Bt-37Q2 Süpernatantının Ccd-18 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Aktivitesi

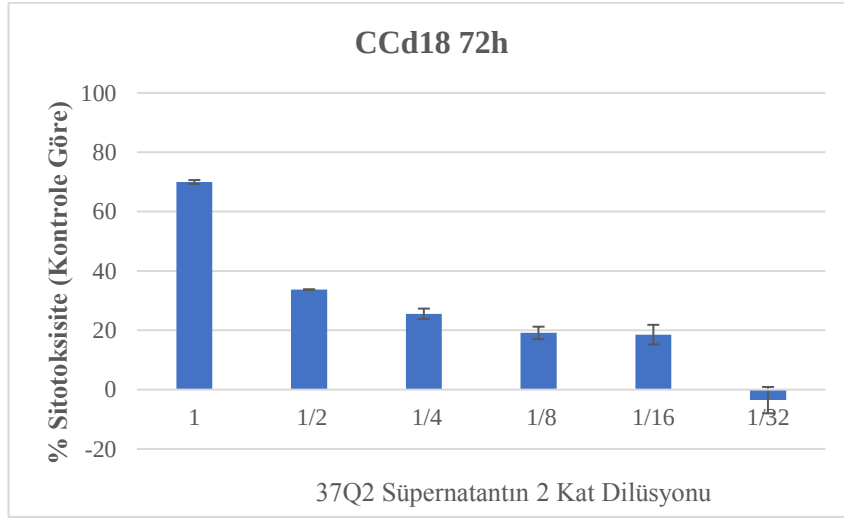
37Q2 süpernatantın iki kat dilüsyonunun, Ccd-18 hücresinde 24, 48 ve 72 saat sürede kontrole göre % sitotoksitesi incelenmiştir. 24 saat süre sonunda 37Q2 nin ilk üç konsantrasyonundaki (1-1/4) dilüsyonunda ortalama %90 oranında sitotoksik aktivite göstermiştir (şekil3.25). 48 saat süre sonunda bu süşün süpernatantı ilk konsantrasyon olan 1’de %85 oranında en yüksek, 1/2 dilüsyonunda %65 oranında sitotoksosite göstermiştir (şekil3.26) 72 saat süre sonunda 37Q2 nin ilk konsantrasyonunda %70 oranında sitotoksik aktivite göstermiştir (şekil3.27).



Şekil 3.26. 37Q2 süpernatantının Ccd-18 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 24h.



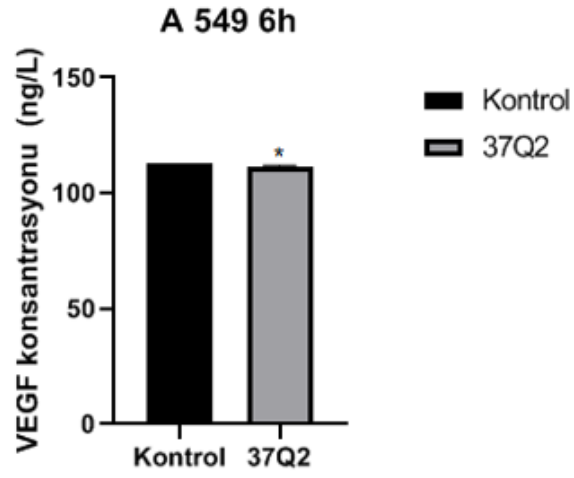
Şekil 3.27. 37Q2 süpernatantının Ccd-18 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 48h.



Şekil 3.28. 37Q2 supernatantının Ccd-18 hücresinde sitotoksik aktivitesi, 72h.

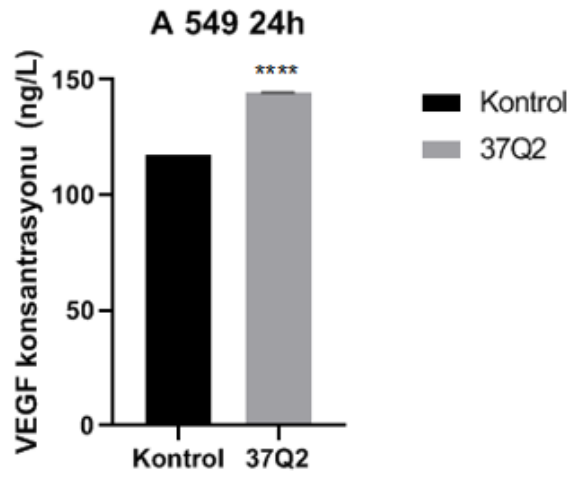
3.14 Bt-37Q2 supernatantından ve kısmi olarak saflaştırılan proteinin A549 hücrelerinde anjiyogenik etkisi

Anjiyogenik etki önemli bir anjiyogenik faktör olan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) salgılanması ölçülerek tayin edilmiştir. Kısmi olarak saflaştırılan protein preparasyonu (BBPP) 50 µg/ml olacak şekilde A549 hücre kültürüne eklenmiştir. 6 saat ve 24 saat inkübasyon sonucu hücre kültürü supernatantı elde edilmiştir. ELİSA kiti ile yapılan deney sonucunda, BBPP 50 µg/ml konsantrasyonda 6 saat süreyle uygulandığında kontrole göre VEGF salgılanmasını çok az düşürmüştür (Şekil 3.27). Buna karşın, BBPP varlığında 24 saat uygulama sonucunda ise VEGF salgılanması kontrole göre anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 3.27).



A 549 hücre hattı

*: $p < 0.05$ (Paired t test)



A 549 hücre hattı

****: $p < 0.0001$ (Paired t test)

Şekil 3.29. 37Q2'den elde edilen BBPP'nun A549 hücrelerinde anjiyogenik etkisi.

4. TARTIŞMA

Entomopatojen bakteri *Bacillus thuringiensis* dünyada bir biyopestisit olarak onaylanan ilk mikroorganizmadır. *B. thuringiensis* sporulasyon sırasında ürettiği Cry ve Cyt'in moleküler biyolojisi hakkında çok şey bilinmesine rağmen, *B. thuringiensis* tarafından sentezlenen diğer proteinler ve metabolitler hakkında daha az bilgi mevcuttur. Antimikrobiyal peptidler (AMP'ler), doğal olarak mikroorganizmalar tarafından üretilen küçük moleküllerdir ve bakteriyosinler olarak da adlandırılır. Genellikle bakteriyel hücre duvarlarını hedef alarak mikroorganizmaların büyümesini ve çoğalmasını engellerler. Ayrıca, başta nisin olmak üzere bazı bakteriyosinlerin bazı kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiğine dair çalışmalar vardır. Önceki çalışmalarımızda, *Bt* koleksiyonumuzdaki 100 adet *Bt*'nin *B. cereus* indikator bakterisine karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve *Bt*-37Q2 suşunun bu konuda en etkili şuslardan biri olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, bu çalışmada *Bt*-37Q2 suşundan bakteri süpernatantının veya kısmi olarak saflaştırılan bakteriyosinin çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal spektrumu ve çeşitli kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik ve anjiyogenik etkileri araştırılmıştır.

Öncelikle *B. cereus*'a (ATCC 1778) karşı antimikrobiyal etkisi en yüksek olan *Bt*-37Q2'nin büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiği farklı zamanlarda incelenmiştir. Bakteri büyümesi 4 saat süren lag fazından sonra gözlenmeye başlamış (OD 0,05), 4 saatten sonra logaritmik faza girmiştir ve 20. saatte maksimum düzeye (OD 2.54) ulaşmıştır. 20 saat sonra bakteri büyümesi durgun faza girmiştir ve OD'si 2.51'e inmiştir. Bakteriyosin aktivitesi ise ilk 8 saat içinde en yüksek seviyeye ulaşmıştır ve antimikrobiyal aktivite 200 AU/ml olarak gözlenmiştir. Daha sonra Bakteriyosin aktivitesi zamanla azalmaya başlamıştır. 20. saatte ise antimikrobiyal aktivite yarıya inmiştir ve 100 AU/ml olarak ölçülmüştür. Bakteriyosin aktivitesi 24 saatte tamamen kaybolmuştur. Sonuç olarak, 37Q2 suşu tarafından üretilen bakteriyosin büyüme eğrisinin ilk 8 saatinde maksimum düzeyde üretilmiştir.

Bu konuda literatürde mevcut olan çeşitli çalışmalarda benzer ve farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Cladera-Olivera vd., (2004) *Bacillus licheniformis* P40 suşunun büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiğini incelediklerinde, bakteriyosin aktivitesi

logaritmik fazın başlarında gözlenmeye başlamış ve 15. saatte maksimum düzeye ulaşmıştır. Daha sonra bakteriyosin aktivitesi hızlıca azalmaya başlamış ve 20. saatte ise tamamen kaybolmuştur. Farklı bir çalışmada (Parente and Ricciardi 1994) *Enteromccus fueczum DPC1146* ,*enterocin 1146* suşu tarafından benzer sonuçlar elde edilmiştir. *Enterocin 1146*'nın üretimi, erken logaritmik fazda başladığını ve durağan fazda azaldığını göstermektedir.

Sarah Basim (2022) tarafından yapılan çalışmada, *B.thuringiensis* 28Q1'in büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiği incelendiğinde bakteriyosin üretiminin erken logaritmik fazda başladığı ve logaritmik fazın sonunda maksimum düzeye ulaştığı gösterilmiştir. Durgun fazda ise üretimin tamamen durduğu belirtmiştir. Barboza-Corona ve diğerleri (2007) yaptığı araştırmaya göre, bazı *Bt* suşlarda bakteriyosin benzeri maddelerin üretimi logaritmik fazın ortasında gerçekleşirken, diğer bazı suşlarda ise durgun fazın başlangıcında tespit edilmiştir. Diğer bir deyişle, *Bt* tarafından üretilen bakteriyosin benzeri maddelerin çalışılan suşa bağlı olarak genellikle logaritmik fazın başlarında veya ortalarında gerçekleştiği görülmektedir.

B.thuringiensis 37Q2 suşu, bakteriyosin üretiminin en yüksek olduğu 8 saatlik sürede büyütülmüş ve farklı sıcaklık, proteolitik enzim ve pH'nın kültür süpernatantları (CFS) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bakteriyosin benzeri maddenin farklı sıcaklık koşullarında nasıl değiştiğini belirlemek amacıyla, kültür süpernatantları farklı sıcaklık aralıklarına (30°C - 70°C) ve değişen süreler boyunca (30 dakikadan 2 saate kadar) maruz bırakılmıştır. Önemli bir şekilde, antimikrobiyal aktivite en yüksek 30°C - 40°C arasındaki sıcaklık aralığında sergilemiştir. Bununla birlikte, 50°C'de aktivitede belirgin bir düşüş 30 dakika içinde gözlemlenirken, 2 saat sonunda tamamen kaybolmuştur. 60 ve 70°C'de ise hiçbir aktivite gözlenmemiştir.

Farklı pH değerlerinde *Bt* 37Q2 suşundan elde edilen bakteriyosinin dayanıklılığı araştırılmıştır. Bu amaçla, kültür süpernatantlarının (CFS) pH değerleri 3-10 arasında ayarlanarak bakteriyosin aktivitesinin nasıl değiştiği belirlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesi, pH 6'da en yüksek (%90) seviyede gözlenirken, en düşük aktivite (%55) pH 9'da tespit edilmiştir. Ancak, pH 3, pH 4 ve pH 10 değerlerinde herhangi bir aktivite tespit edilmemiştir.

Literatürde bu konuda yapılan çalışmalara bakıldığında, benzer ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örnek olarak, *Bac217* suşunun antimikrobiyal aktivitesi, 100°C'deki 15 dakikalık işlemde etkilenmemiştir. Ancak, 100°C'de 60 dakika veya 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavlanması durumunda aktivitesinin tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir. Bu nedenle, *Bac217*'nin sıcaklık değişimlerine karşı nispeten stabil bir molekül olduğu belirlenmiştir. Buna karşın *Bac217* tarafından üretilen bakteriyosin, pH 3 ila 12 aralığında antimikrobiyal aktivitesini korumuştur. *Bac217*, pH 2'de antimikrobiyal aktivite göstermemektedir, ancak pH 2'de önceden işlem görmüş olan *Bac217*'nin pH 7'ye yükseltilmesiyle, tam aktivitesi 15 dakika içinde geri kazanılmıştır (Jelena Iozo vd., 2004). Sharma ve diğerleri (2018) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus subtilis* GAS101 tarafından üretilen bakteriyosinin, geniş bir pH aralığı olan 2-12 ve 20°C ila 121°C sıcaklık aralığında maruz kalındığında herhangi bir değişiklik göstermediği belirtilmiştir.

Sarika, vd., (2010) yapmış oldukları çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus* GP1 tarafından üretilen bakteriyosinin aktivitesinin, diğer inkübasyon sıcaklıklarına (20, 25, 35 ve 40°C) göre en yüksek olduğu 30°C'de tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, bakteriyosin üretimi için ortamın büyüme sıcaklığının önemli bir rol oynadığını tespit etmişler. Buna karşın en yüksek bakteriyosin aktivite pH aralığı 5.5 ile 7.5 arasında gözlenirken, en düşük aktivite pH 9.5-10.5 arasında tespit edilmiştir.

Gray vd., (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus thuringiensis* NEB17 suşu tarafından üretilen bakteriyosin (thuringisin 17) 45, 60 ve 80°C'de 30 dakika, ayrıca 100°C'de 15 dakika inkübasyon sonrasında stabil aktivite sergilediği bulunmuştur. Ancak, 121°C'de 5 dakika inkübasyon sonrasında aktivitenin tamamen kaybolduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca Thuringisin 439'un antimikrobiyal aktivitesinin pH 2-9 aralığında korunduğu tespit etmişler.

Bu çalışmada antimikrobiyal aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık aralığı 30-40°C iken, 50°C'de aktivite azalmıştır. Ancak, 50°C'de 2 saatlik süre sonunda aktivite tamamen kaybolmuştur. Bu çalışmanın bulguları, diğer çalışmaların bulgularına göre bakteriyosin benzeri maddenin sıcaklığa karşı kısmen düşük bir toleransa sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca CFS'nin antimikrobiyal aktivitesi, geniş bir pH aralığına (pH 5-9) sahip olduğu gözlenmiştir.

37Q2 suşundan elde edilen süpernatant farklı enzimlerle muamele edilmiş ve antimikrobiyal aktivite üzerinde etkisi incelenmiştir. Proteinaz K, tripsin, α -amilaz, lipaz enzimleri gibi dört farklı enzim son konsantrasyon 1mg/ml olarak kullanılmış ve örnekler 2 saat enzimle muamele edilmiştir. Bu çalışmada Proteinaz K ve lipaz ile muamele sonrasında bakteriyosin aktivitesinin tamamen kaybolduğu, α -amilaz muamelesinin ise aktiviteyi koruduğu görülmektedir. Ancak tripsin muamelesi sonucunda bakteriyosin aktivitesinin kısmen azaldığı gözlenmiştir. Bu veriler, 37Q2 suşunun antimikrobiyal aktivitesini oluşturan maddenin hem protein hem de lipid yapılarını içeren bir lipoprotein olduğunu göstermektedir.

Literatürde bakteriyosin benzeri maddelerin enzim duyarlılıkları incelenmiştir. Piyush Baidara ve diğerleri (2013) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus subtilis* SK.DU.4 tarafından üretilen bakteriyosin farklı proteolitik enzimler olan, pepsin, tripsin, kimotripsin, proteinaz K ve pronaz E ile 37°C'de 6 ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 6 saat inkübasyon sonucunda antimikrobiyal aktivitede önemli bir azalma gözlenmiştir buna karşın 24 saat inkübasyon sonucunda ise antimikrobiyal aktivitenin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Hikmate Abriouel ve diğerleri (2010) yapılan çalışmada *B. thuringiensis* ssp'nin *Thuricin S*'si, *B. polyfermenticus* suşu *SCD* ve *Gentamisin* 9'un, Proteinaz K'ye duyarlı olduğunu tespit edilmişlerdir. Buna karşın *Bacillus subtilis* LFB112'nin proteinaz K ve pronaz E'ye duyarlı ancak papain, tripsin ve pepsin'e dirençli olduğu, *Tochicin* ve *Thuricin 7*'nin proteinaz K'ya duyarlı olduğu ve *Bacillus licheniformis* ZJU12 suşunun proteinaz K, tripsin ve pronaz E tarafından inaktive edildiği bulunmuştur.

Bacillus subtilis PB6 suşu ile yapılan başka bir çalışmada ise bakteriyosin çeşitli enzimlere maruz bırakıldığında pronaz'a duyarlılık ve tripsine kısmi duyarlılık, incelenen molekülün protein yapısına işaret etmiştir. Bununla birlikte, tripsin maruz bırakıldıktan sonra antimikrobiyal aktivitesinin büyük bir kısmının korunmuş olması, molekülün muhtemelen lipid veya karbonhidrat bileşenlerini içerdiğine dair dolaylı bir gösterge sunmuştur (Teo ve Tan, 2005). Diğer bir çalışmada, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4 suşu bakteriyosinin antimikrobiyal aktivitesinin tripsin ve proteaz'a duyarlı; proteinaz K ve papain'e dirençli; yalnız α -amilaz ve lipaz II'ye maruz bırakıldığında antimikrobiyal aktivitesini tamamen kayborduğu saptanmıştır. (Compaoré vd. 2013)

Başka bir çalışmada *BtCspB*'nin enzimatik proteolize karşı hassasiyeti, her biri son konsantrasyonu 1 mg/mL olan α -amilaz, lipaz VII, lipaz II, RNase A, lizozim, katalaz, tripsin, proteinaz K, α -şimotripsin-VII veya α -şimotripsin II ile muamele edilerek test edilmiştir. *BtCspB*'nin proteinaz K ile işlem gördükten sonra aktivitesini kaybettiğini gösterdi. Lipaz II ve katalaz işlemlerinden sonra gözlenen aktivitedeki kısmi azalmanın muhtemelen *BtCspB* yapısındaki değişiklikler ve molekülün kısmi bozunmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. (Tianpei Huang, XiaojuanZhang, 2016).

Yukarda bahsedilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar antimikrobiyal aktivite gösteren maddenin protein, lipid veya karbohidrat yapıları içerebildiğini göstermektedir.

37Q2 suşunun *Bt* olduğunu doğrulamak ve alt türünü belirlemek için hem 16S rDNA hem de *Hag* geni dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, 37Q2 bakterisinin *Bacillus thuringiensis* olarak tanımlanan ve veri tabanında bulunan bakteriyle %99 homoloji paylaştığını göstermiştir. Bioedit programı kullanılarak yapılan dizi karşılaştırması sonucunda, 37Q2 suşunun *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* bakterisiyle %98 oranında homoloji gösterdiği belirlenmiştir.

Bt 37Q2 suşundan elde edilen süpernatant, %80 amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutularak kısmen saflaştırılmıştır. Bakteriyosin benzeri protein preparasyonunu (BBPP) yoğunlaştırmak için ultrafiltrasyon işlemi uygulanmıştır. Protein filtrasyon sonucunda uzaklaştırılmıştır ve hem filtratın hem de konsantratın antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. Sonuç olarak, filtratta herhangi bir antimikrobiyal aktivite gözlenmemesi, antimikrobiyal aktivite gösteren proteinin moleküler ağırlığının 10 kDa'dan büyük bir protein olduğunu işaret etmektedir.

Paik ve ark. (1997) *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* suşundan elde edilen ve antimikrobiyal aktivite gösteren proteinin moleküler ağırlığının yaklaşık 10,5 kDa olduğunu belirlemişlerdir. La cruz ve ark.,(2018) yapmış oldukları çalışmada *Bt*'nin CF13 ve CF42 toprak suşların antimikrobiyal aktivite gösteren proteinlerin moleküler ağırlıkları yaklaşık 10 kDa ve 15kDa olduğunu belirlemişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen 37Q2 BBPP'nin farklı *Bacillus* türleri üzerinde belirgin bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Gram pozitif ve Gram negatif diğer bakterilerde ise antimikrobiyal etki gözlenmemiştir. Ayrıca, *Candida albicans*

üzerinde de herhangi bir etki kaydedilmemiştir. Bu sonuçlar, elde edilen inhibitör maddenin nispeten dar bir antimikrobiyal spektruma sahip olduğunu ve sadece *Bacillus* genusuna ait türler üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, Bt-37Q2 suşundan elde edilen bakteri CFS'nin ve BBPP'nin çeşitli kanser hücre hatları (A549, HT29 ve PC-3) üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bunun için hücreler ilgili maddelerin varlığında 24,48 ve 72 saat inkübe edilmiş ve MTT yöntemi kullanılarak sitotoksik aktivite araştırılmıştır. CFS'in kanser hücre hatlarından A549, HT29 ve PC-3 hücrelerinde %75 üzerinde sitotoksik etkili olduğu tespit edilmiştir. BBPP'nin 3µg/ml'de dahi %70 üzerinde sitotoksik etkisi olduğu kaydedilmiştir. Son olarak, BBPP (50µg/ml) ile 6 saat muamele edilen A549 hücrelerinde anjiyogenik faktör VEGF salgılanması kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır.

Benzer şekilde, literatürde antimikrobiyal peptidlerin veya bakteriyosinlerin çeşitli kanser hücreleri üzerinde etkilerine bakılmıştır. Örneğin, Abasaleh Avand ve ark., (2018) yapmış oldukları çalışmada Nisin'in MCF-7 ve HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesini MTT (metiltiyazol tetrazolyum) testi kullanarak değerlendirmişlerdir. İlginç bir şekilde, bu etki hücre tipine bağımlı olup, MCF-7 hücrelerinde %.75 sitotoksik aktivite gözlenirken, HUVEC hücre hattında daha düşük bir toksisite (%40) tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada, hücresiz süpernatant (CFS) ve kurkumin ile modifiye edilmiş CFS (cur-CFS) preparatlarının HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlar, hem CFS'nin hem de cur-CFS'nin HT-29 hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı sitotoksik etkiler sergilediğini göstermiştir. MTT sonuçları, CFS'nin ve cur-CFS'nin HT-29 hücrelerinin büyümesini doza bağlı olarak bastırdığını ve 48 saatte sırasıyla 181.7 ve 116.3 µL/mL olan LC50 inhibisyon konsantrasyonlarına sahip olduğunu göstermiştir (Faranak Gholipour ve ark., 2023).

Dodamin vd. (2021) *Lactococcus garvieae*'den elde edilen bakteriyosinin antikanser etkilerini kolorektal adenokarsinoma hücre hattı olan HT-29 üzerinde incelemişlerdir. MTT ile yapılan sitotoksik çalışmalar ilgili bakteriyosinin hücre ölümünü başlatmak için 2 µg/ml konsantrasyonun yeterli olduğunu ve böylece bakteriyosinin düşük konsantrasyonlarda antikanser etkisini gösterdiğini tespit etmişlerdir. Kanser hücreleri

üzerinde apoptotik etkileri ise 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

Bir diğer çalışmada, Adiyago vd. (2022) *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus*'dan elde etikleri intrasellüler ve ekstrasellüler ekstrelerin WiDr insan karsinoma hücre hattında sitotoksik etkilerini araştırmışlar ve 15 µg/ml 'de hücre büyümesini engellediğini gözlemişlerdir. İntrasellüler ekstreler 50 µg/ml 'de pozitif kontrol doxorubicine benzer şekilde % 90 üzerinde sitotoksik etkiye yol açmıştır. Konsantrasyon 100 µg/ml ve 200 µg/ml 'e çıktığında hem intrasellüler hem de ekstrasellüler ekstreler doxorubicine düzeyinde inhibitör etki göstermiştir.

Başka bir çalışmada, Chunguang Yang vd. (2017) CRPC hücreleri, curcuminin yalnızca tek başına uygulanması veya ferrik amonyum sitrat (FAC) ile birleştirilmesi sonucu yüklendi. Sitotoksikite, MTT deneyi ile ölçülmüştür. Bulgular, curcuminin DU145 ve PC3 hücrelerinde etkili bir şekilde demir eksikliği oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca, curcuminin in vitro koşullarda apoptozis oluşturma ve koruyucu otofajiyi tetikleme konusunda son derece etkili olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, Bt-37Q2 suşundan elde edilen BBPP'nin A549 hücrelerinde anjiyogenik faktör VEGF salgılanması araştırılmıştır. BBPP (50ug/ml) ile 6 saat muamele edilen A549 hücrelerinde anjiyogenik faktör VEGF salgılanması kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. Tümör hücreleri ve çevresel stroma tarafından salgılanan VEGF, yeni kan damarlarının oluşumuna yol açarak endotel hücrelerinin çoğalmasını ve hayatta kalmasını uyarır, bu da yapısal olarak anormal ve sızdıran kan damarlarının oluşmasına neden olabilir (Ferrara, 2010; Jain, 2003; Nagy vd., 2009). VEGF mRNA, insan tümörlerinin çoğunda aşırı ifade edilir ve invazivlik, vasküler yoğunluk, metastaz, nüks ve prognoz ile ilişkilidir (Kerbel, 2008). Kanser tedavisi için VEGF-VEGFR sinyal yolunu inhibe etmek için birçok strateji geliştirilmiştir (Ferrara ve Adamis, 2016 Jayson ve ark., 2016). Bu bakımdan, Bt-37Q2 suşundan elde edilen BBPP'nin anti-anjiyogenik etkisinin gözlenmesi, bu maddenin kanser metastazını engellemede potansiyel teşkil ettiğini göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bacillus thuringiensis (Bt), spor oluşturunken insektisidal kristal (Cry) ve sitolitik (Cyt) protein toksinlerini üretebilme yeteneği ile tanınan ve ticari bir biyopestisit olarak kullanılan en başarılı entomopatojenik bakterilerden biridir. Cry ve Cyt proteinlerinin moleküler biyolojisi hakkında birçok bilgi bulunsa da, *B. thuringiensis* tarafından üretilen ve potansiyel olarak uygulama değeri taşıyabilecek diğer proteinler ve metabolitler hakkında daha az bilgi mevcuttur. Enfeksiyon hastalıkları dünyada ikinci en yaygın ölüm nedeni olup, mikrobiyal patojenlere karşı yeni ilaçların keşfine ihtiyaç vardır. Antimikrobiyal peptidler (AMP'ler), günümüzde yeni nesil antibiyotikler için umut vadeden bir alternatif olarak ön plana çıkmaktadır. Küçük molekül ağırlıklı AMP'ler, bakteriyosinler olarak bilinir ve insan antimikrobiyal savunma sisteminin doğal bir parçasıdır, bu nedenle kimyasal antibiyotiklere göre istenmeyen yan etkiler geliştirme olasılıkları daha düşüktür. *Bacillus* türlerinden elde edilen AMP'ler, mevcut antibiyotiklerin eksikliklerini gidermek için umut verici adaylar olarak kabul edilmektedir.

Bununla birlikte, son yıllarda bazı bakteriyosinlerin, özellikle nisin'in, bazı kanser hücreleri üzerinde seçici olarak sitotoksik etkiler gösterdiği çalışmalarla da dikkat çekmektedir. Bilindiği gibi, kanser dünya genelinde önemli bir ölüm nedenidir. Mevcut kanser ilaçlarının, kanser hücrelerine karşı yetersiz seçicilik, yüksek toksisite ve ilaçlara karşı direnç gelişimi gibi sorunları bulunmaktadır. Bu nedenle, daha seçici ve etkili yeni etken maddelerin keşfedilmesi giderek artan bir ihtiyaç haline gelmektedir.

Önceki çalışmalarımızda Bt Koleksiyonumuzdaki 100 adet Bt'nin *B. cereus* indik特or bakterisine karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve sınırlı sayıda Bt'nin etkili olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal etkisi en yüksek olan Bt-37Q2 suşundan bakteri süpernatantının veya kısmi olarak saflaştırılan bakteriyosinin çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal spektrumu kuyu difüzyon yöntemiyle; çeşitli kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle; ve anjiyogenik özelliği ise ELISA testi ile araştırılmıştır.

İlk olarak, *Bt-37Q2* suşunun büyüme eğrisi ve bakteriyosin üretim kinetiği incelendiğinde, en yüksek bakteriyosin üretimi ilk 8 saat içinde, logaritmik büyüme fazın başlangıcıyla aynı zamana denk geldiği gözlemlenmiştir. Bu suşun kültür süpernatantında (CFS) gözlenen bakteriyosin aktivitesinin sıcaklığa duyarlılığı araştırıldığında, en yüksek antimikrobiyal etkinliğin 30-40 °C arasında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, CFS farklı pH değerlerinde incelendiğinde, bakteriyosin aktivitesinin pH 5-8 aralığında en yüksek düzeyde olduğu, pH 3 ve pH 10'da ise hiçbir aktivite görülmediği görülmüştür. Çeşitli enzimlerle muamele edildikten sonra, inhibe edici maddenin protein ve lipid bileşenlerini içeren bir lipoprotein olduğu anlaşılmıştır. *Bt-37Q2* suşunun 16S rDNA ve flagellin *Hag* geni PCR analizlerine göre *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* alt türü olduğu belirlenmiştir. CFS'deki inhibe edici maddenin, gözlenen dar bir antimikrobiyal spektruma sahip olduğu ve sadece *Bacillus* cinsine ait türleri etkilediği gözlenmiştir.

Ayrıca, A549, HT-29 ve PC-3 kanser hücre hatlarında %75'in üzerinde sitotoksik etkisi olduğu bulunmuştur. BBPP'nin 3 µg/ml konsantrasyonda bile %70'in üzerinde sitotoksik etkisinin olduğu kaydedilmiştir. Son olarak, BBPP (50ug/ml) ile 6 saat muamele edilen A549 hücrelerinde anjiyogenik faktör VEGF salgılanması kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. Elde edilen sonuçlar, *Bt-37Q2* suşunun antimikrobiyal ve antikanser etkili yeni ajanların geliştirilmesinde önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Gelecekte, protein saflaştırma deneyleri gerçekleştirilerek kısmen saflaştırılmış ve diyalize edilmiş BBPP'nun ayrıntılı karakterizasyonu yapılacak ve tam moleküler ağırlığı kesin olarak belirlenecektir. Bununla birlikte, BBIM'nin antimikrobiyal ve antikanser etkilerinin moleküler mekanizması daha ayrıntılı çalışmalar yaparak belirlenecektir. Bu çalışmalar, hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve iyileştirilmesine önemli katkılar sunacaktır.

6. KAYNAKÇA

Adiyoga, R., Arie, I.I., Budiman, C., Zaenal Abidin, Z. (2022) *In vitro* anticancer potentials of *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 and *Lactobacillus acidophilus* IIA-2B4 extracts against WiDr human colon cancer cell line. *Food Sci. Technol*, 42, e87221.

Ahern, M., Verschueren, S., Van Sinderen, D. (2003). Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiol. Lett.* 14;220(1):127-31.

Baindara, P., Mandal, S.M., Chawla, N., Singh, P.K., Pinnaka, A.K., Korpole, S. (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.

Barboza-Corona, J.E., Vazquez-Acosta, H., Bideshi, D.K., Salcedo Hernandez, R. (2007). Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol* 187:117–126.

Barboza-Corona, J.E., De la Fuente-Salcido N.M., and León-Galván F. (2012). Future challenges and prospects of *Bacillus thuringiensis*. In: Sansinenea E, editor. *Bacillus likethuringiensis* Biotechnology. New York: Springer p. 367-384.

Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidolactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 261-268.

Sumi. S.D., Yang, B.W., Hahm, Y.T. (2014). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new area for antibiotics. *NCR Research Pres.*

Cladera-Olivera, F., Caron, G. R., Brandelli, A. (2004). "Bacteriocin-like Substance Production by *Bacillus Licheniformis* Strain P40." *Letters in Applied Microbiology* 38(4): 251–56.

Compaoré, C. S., Nielsen, D. S., Ouoba, L. I. I., Berner, T. S., Nielsen, K. F., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Ouédraogo, G. A., Jakobsen, M., & Thorsen, L. (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. ,

Corona, J.E.B., Acosta, H.V., Bideshi, K.D., Hernández, R.S. (2007) Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol* 187: 117-126

Lafuente-Rincon, F., Chavez, E. V., De la Fuente-Salcido, M.N. (2016). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria: Features and Biotherapeutic Approach. *African Journal of Microbiology Research* 10(45): 1873–79.

Djenane, Z., Nateche, F., Amziane, M., Gomis-Cebolla, J., El-Aichar, F., Khorf, H., & Ferré, J. (2017). assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of bacillus thuringiensis isolates from Algeria. *Toxins*. University of Yahia Frés, Media, Algeria.

Dodamani, S., Kaliwal, B.B., Tendulkar, S., Hattiholi, A. (2021) Evaluation of Antimicrobial and Anticancer Activity of *Lactococcus garvieae* Derived Bacteriocin. *Arch Can Res*. 9(3):002.

Dzung, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Nes, I.F. (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.

Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation,. *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 76: 185–198.

Gray, E. J., Lee, K. D., Souleimanov, A. M., Di Falco, M. R., Zhou, X., Ly, A., Charles, T. C., Driscoll, B. T., & Smith, D. L. (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.

Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., & Lotfipour, F. (2012). Natural Antimicrobial Peptides from Bacteria: Characteristics and Potential Applications to Fight against Antibiotic Resistance.” *Journal of Applied Microbiology* 113(4): 723–36

Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Ben Omar, N., & Galvez, A. (2010). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev.* (1):201-32.

López-Lara, I. M., Geiger, O. (2017) Bacterial lipid diversity, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1862 1287–1299.

José E. Dennis K. (2008). Molecular and biochemical characterization of an Endochitinase (ChiA-HD73) from *bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. *California Baptist University*.

Klaenhammer, Todd R. (1993). “Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria.” *FEMS Microbiology Reviews* 12(1–3): 39–85.

Chatterjee, M. Raichaudhuri, A. (2017) Bacteriocin in harmony with ABC transporter exhibits 5 antimicrobial activity, *EC Microbiol.* 3–10

Noda, M., Miyauchi, R., Danshiitsoodol, N. Y., Matoba, T., Kumagai, M., & Sugiyama, M. (2018) Expression of genes involved in bacteriocin production and self-resistance in *Lactobacillus brevis* 174A is mediated by two regulatory proteins, *Appl. Environ. Microbiol.* 84 e02707-e02717.

Ohba, M., Mizuki, E., & Uemori, A. (2009). Parasporin, a New Anticancer Protein Group from *Bacillus Thuringiensis*. *Anticancer Research* 29(1): 427–33.

Paik, H.D., Bae, S.S., Park, S.H., Pan, J.G. (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.

Parente, E., Ricciardi, A. (1994). Influence of PH on the Production of Enterocin 1146 during Batch Fermentation. *Letters in Applied Microbiology* 19(1): 12–15.

- Park, H., Bideshi, D. K., Johnson, J. J., & Federici, B. A. (1999). Differential enhancement of Cry2A versus Cry11A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of the cry3A STAB mRNA sequence. *FEMS Microbiology Letters*, 181(2), 319-327.
- Prangishvili, D., Holz, I., Stieger, E., Nickell, S., Kristjansson, J. K., & Zillig, W. (2000). Sulfolobocins, Specific Proteinaceous Toxins Produced by Strains of the Extremely Thermophilic Archaeal Genus *Sulfolobus*.” *Journal of Bacteriology* 182(10): 2985–88.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (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, M. A., & Wertz, J. E. (2002). “Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application.” *Annual Review of Microbiology* 56: 117–37.
- Olsen, M. G., & Bourdon, C. J. (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, A. M., & Montville, T. J. (1991). “Improved Agar Diffusion Assay for Nisin Quantification.” *Food Biotechnology* 5(2): 161–68.
- Rotem, S., Mor, A. (2009). “Antimicrobial Peptide Mimics for Improved Therapeutic Properties. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes* 1788(8): 1582–92.
- Salazar-Marroquin EL, Galan-Wong LJ, Moreno-Medina VR, Reyes-Lopez MA, Pereyra-Alferez B. (2016). Bacteriocin synthesized by *Bacillus thuringiensis* and potential applications. *Reviews in Medical Microbiology* 27: 95-1001.
- Salazar-Marroquín, E.L., Galán-Wong,, L.J., Moreno-Medina, V.R., Reyes-López M.A, Pereyra-Alféreza, B. (2016). Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*. Potential applications. *FEMS Microbiol Lett* 181:319–327.
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., & Fliss, I. (2020). Bacteriocin as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and generation. *FEMS Microbiol Rev* 8;45(1).

Sarika, A. R., Lipton, A. P., & Aishwarya, M. S. (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., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. 9 *Microbiol. Mol. Rev.* 62: 775-806.

Shiyu, S., Miza, S., Mintao, Z. (2018). The role of the bacteria in cancer therapy enemies in the past, but allies at present. *Infectious Agents and Cancer* 15(13):9.

Stein, T., Heinzmann, S., Solovieva, I., Entian, K.D. (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.

Sumi CD, Yang BW, Yeo I, Hahm YT. 2015. Antimicrobial peptides of genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can. J Microbiol.* 61: 93-100.

Teo, A. Y. L., & Tan, H. M. (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, S., Kazim, S. Kati, H., Demirbag, Z. (2012). 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* (2):167-76.

Uzelac, G., Miljkovic, M., Lozo, J., Radulovic, Z., Tosic, N., & Kojic, M. (2015). Expression of bacteriocin LsbB is dependent on a transcription terminator, *Microbiol. Res.* 179 (2015) 45-53.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad: N*****e B*****E

Uyruk: C*****r

Doğum Yeri ve Tarihi: B***a 1*/0*/1**8

Medeni Hali: Bekar

Telefon: 055*****

E-posta: m*****a@g***l.c*m

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Aicha Lisesi	2016
Lisans	Mostefa Ben Boulaid Ünivesitesi	2019
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2023

Yabancı Dil(ler)

Dil (İngilizce,Türkçe....vs)	Başlangıç	Orta	İleri
İngilizce			X
Türkçe		X	
Fransızca			X
Arapça			X
İspanyolca/almanca		X	

Bilimsel Faaliyetler

1. Belkraouane N., Güneş, H. (2023). *Bacillus thuringiensis* 37Q2 orijinli bakteriyosin benzeri inhibitör maddenin antimikrobiyal, sitotoksik ve anjiyogenik potansiyellerinin belirlenmesi, Fen Bilimleri XV. Araştırma E-Sempozyumu (Çevrimiçi), 2 Haziran 2023 (sözlü sunum).