

**ORDU İLİ VE İLÇELERİNDEN TOPLANAN
TOPRAK NUMUNELERİNDEN *BACILLUS* SP.
SUŞLARININ İZOLASYONU VE İNSEKTİSİDAL
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ
DUYGU ODABAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORDU İLİ VE İLÇELERİNDEN TOPLANAN TOPRAK NUMUNELERİNDEN
***BACILLUS* SP. SUŞLARININ İZOLASYONU VE İNSEKTİSİDAL**
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

DUYGU ODABAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Ömer ERTÜRK

ORDU – 2011

ÖZ

Bu çalışmada Ordu ili ve ilçelerinden alınan farklı toprak numunelerinden izole edilen *Bacillus* cinsi izolatların morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyonu yapılmış, bu izolatların bazı tarım zararlısı böcek grupları üzerinde herhangi bir insektisidal etkisinin olup olmadığı araştırılarak bu zararlı böceklere karşı etkin bir şekilde kullanılabilen bir bakteriyel kontrol ajanının varlığı belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca izolatlara antimikrobiyal aktivite testleri yapılmıştır.

Morfolojik olarak tanımlanan *Bacillus* cinsine ait örneklerin tür tayinlerini yapabilmek amacıyla Vitek 2 sistemi ve Toplam hücresel yağ asidi profilleri yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca *Bacillus thuringiensis* türü bakteri olup olmadığının tespiti için kristal boyama tekniği kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda bu izolatların patojen mikroorganizmalar üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkisinin olmadığı ancak tarım ve orman zararlısı bazı böcek grupları üzerinde öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar bu çalışma kapsamında izole edilen *Bacillus* izolatlarının biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabilmesine işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus*, insektisidal aktivite, Vitek 2, yağ asidi, biyolojik kontrol.

ABSTRACT

In this study, morphological and biochemical characterisation of the *Bacillus* type isolates which were isolated from different soil samples taken from Ordu Province and towns was carried out. The existence of a bacterial control agent that can be used against these pests efficiently was tried to be identified by searching if there is any insecticidal effect of these isolates on some agricultural pest insect groups. Besides, antimicrobial activity tests were applied to these isolates.

For the purpose of determining the types of samples belonging to *Bacillus* type defined as morphological, Vitek 2 system and Total Cellular Fatty Acid Profiles Method were used. In addition to this, crystal staining technique was applied for determining whether there is *Bacillus thuringiensis* type bacteria or not.

The consequences of the researches conducted have shown that there is not any antimicrobial effect of these isolates on pathogen microorganisms; however, they have lethal effect on some insect groups that are agriculture and forest pests.

The results obtained point that *Bacillus* isolates which were isolated within the scope of this study can be used as biological control agent.

Key Words: *Bacillus*, insecticidal activity, Vitek 2, fatty acid, biological control.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve her konuda kılavuzluk eden, eşsiz tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Ömer ERTÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda dostluk ve yardımlarını esirgemeyen Amasya Ünv. Biyoloji Bölümü Arş. Gör. Ceren YAVUZ ve Eskişehir Osmangazi Ünv. Biyoloji Bölümü Arş. Gör. Deniz KARA'ya, toprak numunelerinin toplanmasında emeği geçen Giresun Ünv. Eğitim Fak. Öğretim Gör. Fikret USTAOĞLU'na, Giresun Gıda Kontrol Laboratuvarı'ndaki Vitek 2 çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Canan TÜRKER'e, tez yazım aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen Yeditepe Ünv. Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Arş. Gör. Ahmet KATI'ya ve tüm arkadaşlarıma,

Tüm öğrenim hayatımda olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarımda da maddi ve manevi destekleri ve ilgileri ile hayatım boyunca yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Patates Böceği (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) Hakkında Genel Bilgi.....	5
2.2. Dev Soymuk Böceği (<i>Dendroctonus micans</i>) Hakkında Genel Bilgi.....	6
2.3. Büyük Bal Mumu Güvesi (<i>Galleria mellonella</i>) Hakkında Genel Bilgi	7
2.4. Zararlı Böcekler ile Mücadele Yöntemleri	8
2.4.1. Kimyasal Mücadele	10
2.4.1.1. İnsektisidlerin Yan Etkileri	10
2.4.1.2. İnsektisitlerin Böcekler Üzerine Etkileri	11
2.4.1.3. İnsektisitlerin Faydalı Böceklere Etkileri	12
2.4.1.4. İnsektisitlerin Çevreye Olan Etkileri	13
2.4.1.5. İnsektisitlerin İnsanlar Üzerine Olan Etkileri	14
2.4.2. Biyolojik Mücadele	16
2.4.2.1. Biyolojik Mücadelenin Amacı ve Önemi	17
2.4.2.2. Biyolojik Mücadele Materyalleri.....	17
2.5. Bakteriler ve Biyolojik Mücadele	21
2.6. <i>Bacillus</i> Türlerinin Biyolojik Mücadelede Kullanımı.....	23
2.7. <i>Bacillus</i> Türlerinin Genel Özellikleri.....	24

2.8. Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler	25
2.8.1. Nümerik Taksonomi	25
2.8.2. Yağ Asitleri Profillerine Göre Bakterilerin Tanısı ve Karakterizasyonu	27
2.8.3. Metabolik Enzim Profilleri ve Biyokimyasal Özelliklerine Göre Bakterilerin Tanımlanması	28
2.9. Bakterilerin İnsektisidal Özelliklerinin ve Patojen Bazı Mikroorganizmalar Üzerinde Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması	29
2.9.1. Mikroorganizmaların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	29
2.9.2. Mikroorganizmaların Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Antimikrobiyal Etkileri	30
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	31
3.1. Toprak Örneklerinin Alınması	31
3.2. Alınan Toprak Örneklerinden <i>Bacillus</i> Cinsine Ait Bakterilerin İzolasyonu	31
3.3. Saf Kültürlerin Hazırlanması	31
3.4. Bakteriyel İzolatların Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi.....	32
3.4.1. Basit Boyama.....	32
3.4.2. Gram Boyama.....	32
3.4.3. Endospor Boyama	32
3.4.4. Kristal Boyama.....	33
3.5. Bakteriyel İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Vitek 2 Sistemiyle Belirlenmesi	33
3.6. Bakteriyel İzolatların Yağ Asidi Profillerinin Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS) Kullanılarak Belirlenmesi.....	34
3.6.1. Yağ Asiti Metil Esterlerinin Saflaştırılması	34
3.7. İzolatların İnsektisidal ve Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi	36
3.7.1. Böceklerin Toplanması.....	36
3.7.2. İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.....	36

3.7.3. İzolatların Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması	37
4. BULGULAR.....	39
4.1. Toprakta Alınan Bakterilerin İzolasyonu.....	39
4.2. İzolatların Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	39
4.2.1. İzolatların Morfolojik Özellikleri	39
4.2.2. İzolatların Toplam Hücresel Yağ Asiti Profilleri (MIS)	40
4.2.3. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri	48
4.3. İzolatların İnsektisidal Etkileri	51
4.4. İzolatların Bazı Patojenik Mikroorganizmalar Üzerindeki Antimikrobiyal Etkileri.....	52
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
7. KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	70

SİMGE VE KISALTMALAR

API	Bacterial Identification Test Strip
Atm	Atmosfer basıncı
C	Karbon
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cm	Santimetre
Cry	Crystal Protein
DDT	Dikloro-difenil-trikloroetan
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDWIP	The Ecological Database of the World's Insect Pathogens
FAME	Yağ Asit Metil Ester (Fatty acid methyl esters)
GC	Gaz-Chromatografisi
gr	Gram
HCB	Hekzaklorobenzen
HCl ₂	Hidroklorik asit
ICP	İnsektisidal Kristal Proteinleri
ID	İdentifikasyon kartları
L	Litre
mg	Miligram
MIS	Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi
ml	Mililitre
mm	Milimetre
NA	Nütrient agar
NaOH	Sodyum Hidroksit
rRNA	Ribozal Ribonükleikasit
S	Sverback Sabiti
VIDIL	Viral Diseases of Insect in the Literature Database
VITEK	Bacterial Identification Test
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
TSA	Tryptic Soy Agar
Ω	Omega
µm	Mikrometre
δ	Delta

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.1. <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvası.....	6
Şekil 2.1.2. <i>Leptinotarsa decemlineata</i> ergin formu	6
Şekil.2.2.1. <i>Dendroctonus micans</i> larvası	7
Şekil.2.3.1. <i>Galleria mellonella</i> larvası	8

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.7.3.1. Antimikrobiyal Aktivite Tespitinde Kullanılan Mikroorganizmaların Gram Özellikleri	38
Çizelge 4.2.2.1. İzolatların Toplam Yağ Asit Oranları.....	43
Çizelge 4.2.2.2. İzole Edilen İzolatların Yağ Asit İçeriklerine Göre Benzediği Bakteriler ve Oranları	47
Çizelge 4.2.3.1. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri	48
Çizelge 4.2.3.2. Vitek 2 Sonuçlarına Göre İzolatların Benzediği Bakteriler ve Oranları.....	50
Çizelge 4.3.1. İzolatlar ve Ölüm Oranları.....	51

1. GİRİŞ

Hızlı nüfus artışının beraberinde getirdiği hızlı kentleşmeyle birlikte her geçen gün tarım alanları azalmakta ve kişi başına düşen tarım ürünü miktarında düşüş olmaktadır. Geçmişte tarımsal ürün bakımından kendi kendine yeten ülke konumunda olan Türkiye şimdi birçok ülkeden tarımsal ürün ithal etmektedir. Bunun en önemli sebeplerinden biri de ekonomik olarak önemli olan bitkilerde zararlı böceklerle mücadelenin bilinçli olarak yapılmamasıdır (Bülbüloğlu, 2000).

Ülkemizde tarım alanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olan zararlı böcekler ile mücadele daha çok kimyasal insektisitler kullanılarak yapılmaktadır. Kullanılan insektisitler hem böceklerin bu ilaçlara karşı direnç kazanmalarına neden olmakta hem de çevredeki faydalı böcekleri, bal arılarını, kuşları, balıkları ve insanları etkileyerek çevresel dengeyi bozmaktadır (Peter, 1984; Ecevit, 1988). Kimyasal insektisitler zararlılardan daha çok onların tabii düşmanları olan predatör ve parazitleri ortadan kaldırarak zararlıların sayısının daha fazla artmasına neden olmaktadır. Bunların besinler üzerindeki kalıntıları da insanlarda birikerek gelecek nesilleri tehdit etmektedir (Yaman ve Demirbağ, 1998).

Kimyasal insektisitlerin kullanımının olumsuz etkileri nedeniyle bu konuya kamuoyunun ilgisi artmış ve kimyasal insektisitlere karşı alternatif mücadele yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerin başında biyolojik kontrol olarak bilinen mücadele yöntemi gelmektedir (Bülbüloğlu, 2000).

Biyolojik kontrol, “böceklerin verdiği zararları en aza indirmek için bu böceklerin tabii düşmanlarını kullanma” olarak tanımlanabilir. Tabii düşman terimi, parazitler, predatörler ve hastalık oluşturan mikroorganizmaları kapsar (Bülbüloğlu, 2000).

Bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar, protozoa grubuna ait organizmalar ve rekombinant teknikler ile geliştirilen ajanlar biyolojik kontrolde kullanılan elemanları oluşturmaktadır. Bunlar arasında toprak grubu bakteriler en çok gelecek vaat eden biyolojik kontrol ajanlarıdır (National Research Council, 1984).

Günümüzde birçok mikroorganizma böceklerle biyolojik mücadele ile ilgili olarak kullanılmaktadır. Şimdiye kadar 100’ den daha fazla bakteri türü böcek patojeni olarak tanımlanmasına rağmen yalnızca *Bacillus* türleri kontrol ajanı olarak ticari bakımdan tercih edilmektedir (National Research Council, 1984).

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri sebebiyle dikkat çeken mikroorganizmalardır (Rosovitz ve ark., 1998; Wipat ve Harwood, 1999). Ayrıca, sporlanma kabiliyetleri ve metabolizma faaliyetlerinin çeşitliliği geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır (Wipat ve Harwood, 1999).

Ülkemiz ladin ormanlarında büyük zararlara yol açan *Dendroctonus micans*'a, patates tarlalarında büyük tahribatlara yol açan *Leptionosa decemlineata*' ya ve ballar üzerinde büyük etkiler gösteren *Galleria mellonella*' ya karşı yürütülen biyolojik mücadele çalışmaları çok zahmetli ve masraflıdır. Bu yüzden *L. decemlineata*, *D. micans* ve *G.mellonella*'dan, halen yürütülmekte olan biyolojik mücadeleyle uyumlu çalışabilecek ve hatta ona alternatif oluşturabilecek bir mikrobiyal ajanın tespiti çok büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla bu çalışmada bu zararlı böcek türlerine karşı etkili bir mikrobiyal mücadele ajanının varlığının tespiti amaçlanmıştır. Böyle bir mikrobiyal ajanın bulunması, halen yürütülmekte olan biyolojik mücadele çalışmalarını destekleyeceği gibi, orman ve tarım arazilerinde zarara sebep olan diğer böceklere karşı da kullanılabilir.

2. GENEL BİLGİLER

Yeryüzünde insan nüfusu hızla artmaktadır. Daha geniş tarım alanları elde etmek için doğal ekosistemler hızlı bir şekilde insanın kullanabileceği alanlara dönüştürülmekte ve bu sırada orman, toprak, doğal bitki ve hayvan türleri yok olup gitmektedir. Yeterli besin elde etmek için mevcut tarım alanlarının daha da üretken olması sağlanırken, yaşanabilir ve kirletilmemiş bir çevrenin de var olması hayati önem arz etmektedir. Bir yandan insanlığın geleceği korunmaya çalışılırken, diğer taraftan da bitki ve hayvan türlerinin ve bunların yaşayabilecekleri habitatları korumak bütün insanlar için büyük bir sorumlulukla yerine getirilmesi gereken çok önemli bir görevdir (Ayvaz, 2001).

Dünyada tanımlanan hayvan türlerinin % 97'sini böcekler oluşturmaktadır. Doğada yaşayan böceklerin % 99,5' inin insanlar için faydalı olduğu bilinmektedir. Bilinen yaklaşık 1 milyon 300 bin böcek türünün, sadece % 0,5' i doğa ve insana zarar vermektedir. Bu zararlı böcek türleri, özellikle ürün kayıplarına sebep olmakta ve insan ve hayvan sağlığı yönünden tehlike oluşturmaktadır.

Dünyada üretilen meyve, sebze, tahıl, yaş veya kuru her türlü gıda maddelerinin, sanayi ham maddelerinin ve depolanmış ürünlerin, kürk, deri ve kumaş gibi maddeler her yıl böceklerden ciddi zararlar görmekte ve kullanılamaz hale gelmektedir.

Bugün dünyada zararlıların neden olduğu ürün kaybının % 35 civarında olduğu, bu kaybın % 12' sinin böcek ve akarlardan, % 12'sinin bitki patojenlerinden, % 10' unun yabancı otlardan ve % 1'inin ise kuş ve memeli zararlılarından kaynaklandığı ve bunun maliyetinin yaklaşık olarak 400 milyar dolar civarında olduğu belirtilmiştir (Özgür, 1990).

Zararlı böcekler, başta orman arazileri olmak üzere, tarla ve bahçe bitkilerinde, seralarda, süs bitkilerinde, koruma altına alınmış bölgelerde yetişen bitki türleri üzerinde, depolanmış ürünlerde, veterinerlik ve tıbbi alanlarda büyük zararlara yol açarlar (Lacey ve ark., 2001). Özellikle dünya ekosisteminin en önemli unsurlarından biri olan ormanlarda, zararlı böcekler büyük tahribatlara neden olmaktadır. Zararlı böceklerin ormanlarda yol açmış olduğu zararlar, birden bire ortaya çıkmadığı için kamuoyunda orman yangınları kadar göze çarpmamakta ve önemsizdir. Ancak bu zararlı böceklerin tahribatı salgın halini aldıktan sonra anlaşılacaktır. Eldeki literatür bilgileri dünya ormanlarına sadece böceklerin yaptığı zarar tutarının, orman yangınlarının yol açtığı zararın en az 5 katı olduğunu göstermektedir (Anonim, 2003).

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de zararlı böceklerin kontrolünde çeşitli kimyasal insektisidler kullanılmakta yani kimyasal mücadele yürütülmektedir. Fakat kullanılan bu kimyasal insektisidler doğal çevre ve hedeflenmemiş organizmalar üzerinde olumsuz etkilere sahiptir (Ecevit, 1988; Ünal, 1998). Özellikle 1950'lerden sonra insektisitlerin olumsuz etkilerinin ortaya çıkarılması, zararlı böceklerin kontrolü için yapılan çalışmaların daha etkili ve güvenli kontrol ajanları bulmaya yönelmesine yol açmıştır.

Biyolojik mücadele, kimyasal mücadelenin tüm olumsuz yönlerini ortadan kaldırması bakımından son yıllarda tercih edilmesi gereken bir mücadele yöntemi haline almıştır. Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Doğal düşman terimi, predatörler, parazitler ve hastalık oluşturan mikroorganizmaları kapsar. Ancak hastalık yapan mikroorganizmaların kullanımı genellikle mikrobiyal mücadele olarak adlandırılır (Peter, 1984).

Biyolojik mücadelenin bir alt kolu olarak karşımıza çıkan mikrobiyal mücadele, zararlı böceklerin kontrolünde patojen mikroorganizmaların kullanılmasını kapsar. Entomopatojen olarak adlandırılan bu mikrobiyal mücadele ajanları (bakteriler, virüsler, funguslar, nematodlar, protozoalar) zararlı böceklerde hastalık oluşturarak böcek popülasyonlarının dengede tutulmasını ve zararlarının minimuma indirilmesini sağlarlar. Bu entomopatojenlerin büyük bir çoğunluğu konağa özel olduğu için yalnızca mücadele yapılmak istenilen organizma üzerinde etkindir. Bu özelliği ile faydalı ve predatör böcekler, hayvanlar ve insanlar gibi hedeflenmemiş organizmalar üzerinde herhangi bir risk oluşturmazlar. Tamamen doğal olmaları sebebiyle ekosistemde herhangi bir kirliliğe yol açmazlar. Bu özellikleri, gelecekte kimyasal insektisitlerin yerini bu biyolojik ajanların alacağını göstermektedir.

Böceklerin kontrolü için mikrobiyal ajanların kullanımı 1800'lü yıllarda fungusların kullanılmasıyla başlamıştır (Oğurlu, 2000). Bu ajanların böceklerin kontrolünde kullanımı, çok eskiye dayanmasına ve genelde olumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen, mikrobiyal kontrolün önemi 1900'lü yılların ortalarına kadar anlaşılammış ve fazla gelişmemiştir. Bu tarihten sonra sıklıkla kullanılan kimyasal insektisitlerin zararlı etkilerinin ortaya çıkmasıyla, araştırmalar böcekler üzerinde patojenik etkiye sahip mikroorganizmaların tespiti ve zararlılara karşı kullanımına yoğunlaşmıştır. Günümüzde, EDWIP (The Ecological Database of the World's Insect

Pathogens) ve VIDIL (Viral Diseases of Insect in the Literature Database) verilerine göre 2285 farklı mikroorganizma türünün, 9407 böcek türüyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Toplam 2285 mikroorganizmanın 1504 türünü protozoalar, 411 türünü funguslar, 168 türünü virüsler, 146 türünü nematodlar, 51 türünü bakteriler ve 5 türünü diğer mikroorganizmalar oluşturmaktadır (Braxton ve ark., 2003). Bu veriler toplam sayının sadece bir kısmını oluşturmakta ve bu sayı her geçen yıl yüzlerce yeni patojen mikroorganizmanın keşfiyle artmaktadır.

2.1. Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata*) Hakkında Genel Bilgi

Patates böceği, *Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptara takımına ait yaprak böceğigiller (Chrysomelidae) familyasından zararlı bir böcek türüdür (http://tr.wikipedia.org/wiki/Patates_b%C3%B6ce%C4%9Fi, 13.11.2011).

Erginleri 1 cm boyunda olup, sarı-turuncu renkte ve sırtı bombelidir (Korkmaz, 2007). Sertleşmiş üst kanatları üzerinde 5'er tane uzunlamasına siyah bantlar vardır. Böceğe bu görünüşünden dolayı "pijamalı böcek" de denilmektedir.

Yumurta 1 mm boyunda, oval ve koyu sarı renklidir.

Larva kambur duruşlu, başı koyu kahverengi ve vücudu turuncu renktedir. Olgun larvaların boyu 10-13 mm' dir. Pupa oluncaya kadar dört larva dönemi geçirir.

Pupa turuncu renkte ve 1cm boyundadır.

Patates böceği kışı toprakta ergin halde geçirir. Gerek larva, gerekse ergin döneminde patates, patlıcan, domates gibi bitkilerin yaprak ve sürgünlerini yiyerek beslenir.



Şekil 2.1.1. *Leptinotarsa decemlineata* larvası (<http://www.natuurwereld.be/natuur/insecten/kevers/coloradokever.php>, 15.09.2011)



Şekil 2.1.2. *Leptinotarsa decemlineata* ergin formu (<http://zoology.fns.uniba.sk/poznavacka/Insecta2.htm>, 15.09.2011)

2.2. Dev Soymuk Böceği (*Dendroctonus micans*) Hakkında Genel Bilgi

Dev Soymuk Böceği, *Dendroctonus micans*, Coleoptera takımına ait Scolytidae (Kabuk Böcekleri) familyasının en büyük böceğidir.

Dendroctonus micans'ın kirli beyazımsı açık renkli, oval veya bir tarafı az sivrice olan yumurtaları olgunlaşmamış haşhaş tohumunu andırırlar. Boyları 1095-1125 µm ve enleri ise 622-655 µm arasında değişmektedir.

Beyaz renkte, ayaksız ve gözsüz olan larvaların boyları 10-13 mm arasındadır. Vücutları 3 göğüs ve 9 karın segmenti olmak üzere 12 halkadan ibarettir. Larvaların üzerinde çeşitli bölgelerde görülebilen uzun kıllar vardır.

Beş instar geçiren olgunlaşmış *D. micans* larvaları kabuk altında biriken öğüntülerin altında ve diri oduna hafifçe dokunmuş olarak hazırladıkları pupa beşiklerinde pupaya yatarlar. Beyaz renkli olan pupalar ergine benzerler.

Ladin ağaçlarının gövdesinde, kalın dallarında hatta kalın sürgünlerde bile büyük tahribata yol açarlar (Selmi, 1998).



Şekil.2.2.1. *Dendroctonus micans* larvası
(http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dendroctonus_micans_larva.jpg, 01.09.2010)

2.3. Büyük Bal Mumu Güvesi (*Galleria mellonella*) Hakkında Genel Bilgi

Büyük bal mumu güvesi (*Galleria mellonella*) Lepidoptera takımına ait Pyralidae familyasına aittir.

Erginleri sarımsı kahverengi, esmer-gri renkte olup, önkanatların ortasında uzunluğuna şerit halinde tanzim edilmiş siyah noktalar mevcuttur. Alt kanatlar gri-bej rengindedir. Erginin boyunu takriben 19 mm dir.

Yumurta ilk konduğu zaman beyaz renkte olup, embriyon geliştikçe sarı ve daha ilerleyen dönemlerde pembe renge dönüştüğü bilinmektedir.

Larva sarımtırak beyaz renkte ve oldukça hareketlidir. Gelişmesini tamamlayan larva beyazımtırak kül renginde olup, dorsal yüzeyi daha ziyade sarımtırak esmer renktedir. Tam gelişmiş larva boyu 18-26 mm arasında değişmektedir.

Pupa beyaz renkte, iki ucu açık silindirik şekilde, 12-20 mm boyundadır.

Galleria mellonella' nin arı kovanlarında peteklerde ve depolanmış balmumunda oldukça büyük tahribat yapmış olduğu bilinmektedir (Özer, 1961).



Şekil.2.3.1. *Galleria mellonella* larvası
(http://www.springhalen.dk/foderdyr_salg_eng.htm, 15.09.2011)

2.4. Zararlı Böcekler ile Mücadele Yöntemleri

Bazı böcek türleri bitkiler üzerinde ciddi zararlara neden olmaktadır. Özellikle tarım ve orman ürünleri üzerinde bu böcek türlerinin her yıl tekrarlayan zararları, milyarlarca lirayı bulan ürün ve iş gücünün boşa gitmesine yol açmaktadır. Bu zararlıların, bitkilerde yaptıkları çeşitli zararlarının, gerek doğal kuvvetler (doğal mücadele) gerekse insan yardımıyla (uygulamalı mücadele) önlenmesine veya hiç olmazsa azaltılmasına yönelik yöntem ve harcanan çabalara zararlılarla mücadele denir. Bu mücadele yöntemlerini çeşitli gruplara ayırmak mümkündür.

Doğal mücadele; insanın herhangi bir yardımı olmadan doğal kuvvetlerle böcek popülasyonlarının kontrol altına alınmasıdır. Çevre direncinin bir sonucu olarak böceklerin önemli bir kısmı ya çoğalmadan ya da çoğaldıktan sonra ölürler. Böylece, zarar oluşturan böceğin ortamdaki sayısı ve oluşturduğu zarar düşük seviyede kalmış olur.

Yasal mücadele; yasal yollardan yararlanılarak zararlıların yayılmasını önlemektir. Karantina, ambargo, muayene veya sertifika uygulamak bunların başında

gelmektedir. Bu tür uygulamalar bazen kıtalar ve ülkeler arasında olurken, bazen de ülkenin içerisinde bir bölgeye özgü uygulanabilir.

Mekanik mücadele; böcekleri çeşitli yöntemlerle toplamak, pusuya düşürmek, yem tuzakları kurmak, feromonlar kullanmak, tuzak odunları, hazırlamak veya gıda değişimi yapmak suretiyle gerçekleştirilen mücadele şeklidir.

Fiziksel mücadele; sıcak ve nemden yararlanılarak böceklerin öldürülmesi, elektrik veya radyoaktivite kullanarak böceklerin kısırlaştırılması işlemlerini içeren mücadele yöntemidir. Daha çok tarım alanlarında uygulanan bir mücadele yöntemidir.

Kültürel mücadele; toprak bakımı, işlenmesi ve gübrenmesi, yabancı ot ve atıkların temizlenmesi ve bitki nöbetleşmesi gibi toprakla ilgili yapılması gereken işleri kapsar.

Biyoteknolojik mücadele; biyoteknolojik yöntemlerle modifiye edilmiş organizmaların zararlılara karşı kullanılmasıdır. Örneğin, genetik olarak dayanıklı bitkiler.

Kimyasal mücadele; çeşitli kimyasal maddelerin toz veya sulu halde kullanılması suretiyle yapılan mücadeledir. Ülkemizde çok yaygın olmasına rağmen çevreye verdiği olumsuz etkilerden dolayı günümüzde gelişmiş ülkelerde yavaş yavaş bu yöntemden vazgeçilmektedir. Ancak yine de zirai mücadelede önemli bir yer işgal etmektedir.

Biyolojik mücadele; zararlı böcek popülasyonlarını dolayısıyla böceklerin zararlarını azaltmak için canlı organizmalardan (mikroorganizmalar, predatörler, parazitoid böcekler, omurgasızlar, omurgalılar, feromonlar, böcek büyüme düzenleyicileri, bitkisel maddeler ve genetik kontroller) faydalanılarak yapılan ekonomik, güvenilir ve başarılı bir mücadele yöntemidir.

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde kimyasal ilaçların yerini biyoinsektisitler almıştır. Biyoinsektisitler üretim teknolojilerinin kolay ve sürekli olması, sadece hedef canlıya etki etmeleri, zararlının kontrolünde güvenilir olmaları, çevre kirliliği ile ilgili problemler yaratmamaları ve endosporlarının doğada uzun süre kalmaları nedeniyle tercih edilmektedir (Smith, 1980).

Biyoinsektisit olarak bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar ve protozoa grubuna ait organizmalar kullanılmaktadır. Bunlar arasında, toprak grubu bakteriler en çok gelecek vaat eden biyolojik kontrol ajanlarıdır. Özellikle *Bacillus* grubu bakteriler önemli bir yer teşkil ederler ve Lepidoptera (kelebekler), Diptera (sinekler ve sivrisinekler) ve Coleoptera (kın kanatlılar) takımına ait böcekleri hedef alırlar (National Research Council, 1984).

Biyolojik mücadelede kullanılan mikroorganizmaların %90'ını *Bacillus thuringiensis* oluşturmaktadır. *Bacillus thuringiensis* delta endotoksin olarak isimlendirilen protein yapısında ve biyolojik olarak kolayca parçalanabilen ve böylece böceğin orta bağırsağında kısa bir yarılanma ömrü olan insektisidal toksinler üretirler. (Chattopadhyay ve ark., 2004)

Kimyasal insektisitler ile kıyaslandığında *Bacillus thuringiensis* ürünleri, hedef organizmada daha az bir dirence neden olur. Özgül böcek grupları üzerine etkilidir. Kullanımları güvenlidir. Hedef olmayan ve duyarlı olmayan organizmalar üzerinde etkili değildir. Kimyasal insektisitler gibi ortamda birikip toksik etki oluşturmazlar yani yarılanma ömürleri kısadır. İnsanlar üzerinde patojen olmadıkları için zarar vermezler. Her şeyden önemlisi çevreyi kirletmezler. Bu nedenle biyolojik kontrol, kimyasal insektisitler ile karşılaştırıldığında çevresel dengeyi bozmayan alternatif bir mücadele yöntemidir (Chattopadhyay ve ark., 2004).

Türkiye’de biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan en önemli ve güncel örnek *B. thuringiensis*’ tir. Özellikle bu bakteriden hazırlanan preparatlar bağ, meyve ve narenciye zararlılarına ve depo zararlılarına karşı kullanılmaktadır (Yaman ve Demirbağ, 1998).

2.4.1. Kimyasal Mücadele

Kimyasal maddeler (tarımsal ilaçlar) kullanılarak zararlıların etkinliklerinin azaltılması veya yok edilmesidir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de zararlı böceklerin kontrolünde çeşitli kimyasal insektisitler yani kimyasal mücadele kullanılmaktadır. Fakat kullanılan bu kimyasal insektisitler doğal çevre ve hedeflenmemiş organizmalar üzerinde olumsuz etkilere sahiptir.

2.4.1.1. İnsektisidlerin Yan Etkileri

Günümüzde tarım ve orman zararlısı böceklerle karşı sıklıkla kullanılan insektisitler bitkilerde ve uygulanan alanda bulunan diğer canlılar üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. İnsektisidlerin zararları böcekler, insanlar ve çevre olmak üzere başlıca 3 başlık altında toplanır.

2.4.1.2. İsektisitlerin Böcekler Üzerine Etkileri

İsektisidler böcekler üzerinde iki önemli olumsuz etkiye neden olur. Bunlar zararlı böceklerin kimyasala karşı dirençlilik kazanması ve kimyasalların faydalı böcekler üzerinde neden olduğu olumsuz etkilerdir.

1800'lü yılların ortalarına kadar zararlı böceklerle, zararlıların toplanması veya yıkanması şeklinde mücadele ediliyordu. Bu tarihten sonra önce kükürt ve arsenik, daha sonraları ise kurşun asetat, cryolite ve borik asit gibi çok az kimyasal madde böceklerle karşı kullanılmaktaydı. 1938-1940 yıllarında DDT'nin (dikloro-difenil-trikloroetan) isektisit özelliği keşfedilmiş ve kimyasal mücadelede yeni bir çağ açılmıştır. Bu buluş o dönem için çok önemli olduğundan Nobel Ödülü kazanmıştır (Yılmaz, 2004).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' ne göre isektisitlere dayanıklılık, "normal bir popülasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin bir dozuna karşı, aynı türün diğer bir popülasyonundaki bireylerin tolerans kazanma yeteneğinin gelişmesi" olarak tarif edilmektedir.

Zararlı böceklerle ilgili toksisite denemelerinde her zararlının kendine has bir doz ölüm eğrisi vardır. Kullanılan ilaç dozu arttığında ölüm oranı da artar. İşte bu durumda eğer doz arttığında ölümdaki artış oranı yavaş yavaş azalıyor, o canlıya karşı kullanılan toksik maddeye karşı bir mukavemet başlamış demektir (Yılmaz, 2004).

Özel dayanıklılık: Böceklerin isektisitlere gösterdiği duyarlılık, birbirine çok yakın olan böcek türleri arasında büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Aynı takımın aynı familyasında bulunan iki böcekte biri bir ilaca çok duyarlı iken, bir diğeri aynı ilaca karşı dayanıklı olabilmektedir.

Davranışsal dayanıklılık: Bir isektisit uygulandıktan sonra böceklerin normal davranışlarında bir farklılaşma olur. Bu durumda böcek ilaçlı kısımlardan kaçma veya ilaçlı kısımlarla beslenmeme gibi eğilimler gösterebilir. Elma iç kurdunun yumurtadan yeni çıkan larvalarının meyva içersine girerken kurşun arseniyatla kaplanmış epidermis parçalarını yememeleri gibi.

Yapısal dayanıklılık: Zararlının vücut özelliğinden kaynaklanan dayanıklılıktır. Kontak etkili ilaçlarda zararlının vücudunun çok tüylü olması, ilaçla temasını azaltmakta ve dayanıklılığı sağlamaktadır. Aynı zamanda böceğin kutikulasının kalın

olması veya vücutlarındaki toplam lipid miktarının fazla olması dayanıklılığı sağlayabilir.

Fizyolojik dayanıklılık: Böcek ile öldürücü kimyasal madde arasında bir dizi karşılıklı ve karmaşık olaylar sonucu oluşan dayanıklılıktır. Böceklerde bu durum yavruların, ana ve babalarına oranla zehirli kimyasallardan fazla etkilenmeden yaşamlarını sürdürebilme yeteneği şeklinde ortaya çıkar. Bu tip dayanıklılık özellikle sentetik insektisitlerin kullanımı sonucu böcek vücudunda ve kalıtsal yapılarında meydana gelen farklılaşmalar sonucu ortaya çıkmıştır.

Çapraz dayanıklılık: Bir böceğin bir insektsite dayanıklılık kazandıktan sonra etki mekanizması birbirine yakın olan ilaçlara karşı da dayanıklılık göstermesi durumudur.

İnsektisitlere dayanıklılık sonucu, doz arttırımına gidilmekte ve uygulamalar arasındaki süre kısaltılmaktadır. Bu çabalarda sonuçsuz kaldığında daha etkili ve zehirli bir insektisit kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun maddi bedeli ölçülemeyecek kadar çok olmaktadır.

Aşırı dozda ilaç kullanımı zararlı üzerine etkili olmaktan daha çok, çevre kirliliği ve diğer yan etkileri ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca insektisitlere dayanıklılığın sonucu olarak sosyal harcamalarda da artış görülmüştür.

2.4.1.3. İnsektisitlerin Faydalı Böceklere Etkileri

İnsektisitlerin etki tarzı bakımından zararlı ve faydalı böcekler arasında bir farklılık yoktur. Fakat etkileri bakımından farklılık vardır. Faydalı böcekler olarak kabul edilen predatör ve parazitler insektisitlerden daha fazla etkilenmektedirler. Ne yazık ki, parazit ve predatörlerdeki dayanıklılığın oluşumu, zararlı böceklerdeki kadar çabuk olmamaktadır. Bunun sonucu olarak, zararlı populasyonları üzerinde dengeleyici olan predatörler ve parazitler ortadan kalkmakta ve zararlılar daha çabuk yayılmaktadır (Ecevit, 1988).

Buna ilaveten, doğal denge bozulmakta, tür çeşitliliği azalmakta ve daha önce problem olmayan yeni bazı zararlılar ortaya çıkmaktadır. Bu durumda sekonder zararlılara karşı ilave ilaçlama yapma zorunluluğu meydana gelmektedir. Örneğin, Çukurova'da beyaz sineğin, doğal düşmanlarının insektisitlerden zarar görmesi nedeniyle sorun haline geldiği bilinmektedir (Ünal, 1998).

İnsektisitlerin kullanıldığı alanlarda doğal olarak yaşayan polinatör canlılar da yok olduğu için bu alanlardaki zirai ürünlerde tozlaşma oranı azalmaktadır (Ecevit, 1988). Bitkilerde tozlaşmada önemli rol oynayan bal arıları ve yaban arıları insektisitlerden etkilenen önemli bir canlı grubunu oluşturmaktadırlar. Örneğin, A.B.D'nin Kaliforniya eyaletinde yoğun insektisit kullanımı sonucunda mevcut arı popülasyonları azalmış ve bunun etkisi olarak tarımsal ürünlerde yeterli tozlaşma olmamıştır. Tarımsal ürünlerde meydana gelen kayıp yaklaşık 80 milyon doları bulmuştur. Yeterli tozlaşmayı sağlamak için bölgeye getirilen arı kolonilerine yıllık ödenen miktar ise yaklaşık 55 milyon dolar olmuştur. Benzer durumlar Isparta'nın Kovada Vadisi'ndeki meyve bahçelerinde ve 1988 yılında Trakya'da yürütülen süne mücadelesi sırasında tespit edilmiştir (Ünal, 1998).

Arıcılık özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi'nde önemli bir gelir kaynağını teşkil etmektedir. Bu bölgede yürütülen arıcılık çalışmaları için rakımı yüksek yerler tercih edilmekte ve bu bölgeler genellikle orman alanlarının yayılışı ile kesişmektedir. Bu nedenle orman zararlılarına karşı kimyasal mücadele uygulamak arıcılık sektörü için de tehdit oluşturmaktadır.

2.4.1.4. İnsektisitlerin Çevreye Olan Etkileri

İnsektisitler kullanıldıkları bölgede toprak ve su içersinde kalıntılar bırakarak bu ekosistemlerde yaşayan canlıları doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir.

Toprak mikroorganizmalarının toprak verimliliğinde etkileri çok büyüktür. Bitkilerin tek başına alamayacakları besin maddeleri bu canlılar tarafından ekstrakte edilmektedir. İnsektisitlerin toprakta birikmesi sonucu solucanların, toprak kenelerinin ve sineklerin popülasyonunda azalmalar meydana gelmekte ve toprak canlıları için ana besin maddesi oluşturan toprak mikroorganizmalarının spektrumu da değişmektedir.

Toprak, hava ve su üçlüsünden herhangi birine olan bir bulaşma diğer ikisini de etkiler. İçme suyu ihtiyacının kuyulardan sağlandığı yerlerde ilaçlama artıklarının değişik yollarla ve yağmurlarla yıkanarak kuyulara ulaşması kirlenmeye neden olur. Kent sularının çıktığı kaynaklar, baraj gölleri ve göletler, bu ilaçların ulaşması sonucu kirlenmektedir. Bir kentin suyunu sağlayan baraj gölleri bazen birçok akarsu tarafından beslenir. Bu akarsuların çevresindeki tarımsal alanların ilaçlanması sonucunda akarsular ve dolayısıyla barajlar kirlenmiş olur.

Herhangi bir yolla sulara erişen kimyasal maddeler balıklar tarafından alınır. Balıkların büyüme, üreme, kaçma ve saklanma gibi bazı yetenekleri, insektisitlerin bünyelerinde birikimlerine göre azalır veya tamamen yok olur. Rakipler karşısında daha kolay avlanmaları sonucu bazı türlerin bütünüyle ortadan kalkması söz konusu olabilir (Ünal, 1998). Ekonomik öneme sahip balık türlerinde biriken insektisitler beslenme yoluyla insanlara geçer. İnsektisitlerin balıkları öldürme etkilerinden başka surlardaki oksijen miktarını da düşürmeleri, sulardaki canlı yaşamı tehdit ederler.

İnsektisit uygulaması yapılan bölgelerde gezinen kuşlar kimyasal maddelerden büyük zarar görürler. Zarar, kimyasal maddelerle doğrudan temas şeklinde veya artığı bulunan bitkisel veya hayvansal zehrin yenmesi şeklinde olabilir. Toprakla beslenen kuşlar, ilaçla bulaşık toprak kurtlarını, yumuşakçaları ve diğer böcekleri yemek suretiyle insektisit kalıntılarını bünyelerine alırlar. Tarla kuşu, ardıç, karga ve ağaçkakan bu kuşlara örnek verilebilir (Ünal, 1998).

İnsektisitler kullanıldıkları alanlardaki bitkilerin çimlenmesi, vejetasyonu ve üremesi üzerine de olumsuz etkiler yaparlar. Bazen bitkilerin belirli doku kısımlarında, özellikle yaprak ve sürgünlerinde yanma denilen bir takım lekeler ile renk değişimlerinin meydana gelmesine sebep olurlar. Hatta bazen tüm bitkinin öldüğü görülür (Ecevit, 1988). Bitkilere bulaşan insektisitler, bitki üzerinde bıraktıkları kalıntılarla, besinin tat ve kokusunu bozabildiği gibi, beslenme yoluyla insan vücuduna alınarak toksik etkilere yol açabilirler.

2.4.1.5. İnsektisitlerin İnsanlar Üzerine Olan Etkileri

İnsektisitler doğrudan doğruya veya dolaylı olarak insan sağlığını etkilemektedirler. Bu etkiler akut ve kronik toksisite olarak iki grup altında toplanabilir (Ecevit, 1988).

Bir kimyasalın bir kez veya kısa bir zaman diliminde (Örneğin, 24 saat) birkaç kez alınması sonucunda vücutta oluşan hasar akut toksisite olarak tanımlanır (Ünal, 1998). Akut toksisite ilacın imali sırasında çalışanların ilaçlardan zehirlenmesi sonucu ortaya çıkabildiği gibi, buna ilacın taşınması, depolanması ve kullanılması esnasında güvenli kullanım kurallarına uyulmaması sonucu da ortaya çıkabilir (Ecevit, 1988). 1963 yılında Bursa'da parathionla ilaçlanmış şeftali yiyen 32 kişiden 7'sinin aynı gün ölmesi akut toksisiteye örnek verilebilir. İnsektisitlerin üretim ve kullanımları sırasında

meydana gelen iş kazaları, bu ilaçların insan sağlığına karşı olumsuz etkilerini çok çabuk bir şekilde göstermesine sebep olmaktadır. Örneğin Hindistan'ın Bhopal kentinde 1984 yılında A.B.D' ye ait Union Carbide Şirketi'nin bir fabrikasından çevreye yayılan yaklaşık 45 ton metil izosiyonat gazı, civardaki 2500 kişiyi uykularında öldürmüş ve fabrika çevresindeki çok geniş bir alanı yaşanmaz hale getirmiştir. Aradan 4 yıl geçtikten sonra bile, fabrika çevresindeki köylülerden her yıl ortalama 500 kişinin ölmesi, tehlikenin boyutlarını göstermesi açısından önemlidir (Ünal, 1998).

Kronik toksisite ise bir kimyasalın akut toksisiteye neden olmayacak kadar düşük dozlarda uzun süre alınması halinde sıcakkanlılarda meydana getirdiği fizyolojik düzensizlik olarak tanımlanır (Ünal, 1998). İnsektisitlerle bulaşık veya bekleme süresi bitmeden insektisit kalıntısı içeren bitkisel besinlerin yenmesiyle de kronik toksisite meydana gelebilmektedir. Örneğin, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde heksaklorobenzenli (HCB) insektisitle ilaçlanmış tohumluk buğdayı yiyen 3000 kişide Porfiria (Karayara) hastalığının görülmesi ve %11 oranında ölüm meydana gelmesi, dünya çapında ilgi uyandıran bir zehirlenme olayıdır (Ünal, 1998). Ayrıca düşük dozlarda alınan bu insektisitlerin insan vücudunda birikimi sonucu gelecek kuşaklarda neler meydana getireceğini de şimdiden tahmin etmek oldukça zordur. İnsektisitlerin sinir sistemi üzerindeki enzimlere etkili oluşu, önemlerini bir kat daha arttırmaktadır. Bugün özellikle fazla miktarlarda kullanılan klorlandırılmış hidrokarbonların insan ve hayvanların beyin, karaciğer, böbrek ve yağ dokularında toplanarak toksik etkiye bulunduğu bilinmektedir (Ecevit, 1988).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 1985 yılı raporlarına göre, her yıl 1.000.000 kişi pestisitlerden zehirlenmekte ve bunların yaklaşık 20.000' i ölümlerle neticelenmektedir. Dünya pestisit tüketiminin 1/3' ü az gelişmiş ülkelerde gerçekleşmesine rağmen, dünya pestisit ölümlerinin % 75' i bu ülkelerde meydana gelmektedir (Ünal, 1998).

Zararlı böceklerle mücadelede kullanılan insektisitlerin anlatılan yan etkilerinden dolayı, kimyasal mücadelenin günümüzde mümkün olduğunca kısıtlanması ve bunun yerini çevresel açıdan daha güvenli olan biyolojik mücadelenin alması gerektiği düşünülmektedir.

2.4.2. Biyolojik Mücadele

Biyolojik mücadele, biyolojik kontrol olarak da adlandırılır. Biyolojik kontrol, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararı en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Doğal düşman terimi, predatör ve parazitlerle birlikte hastalık oluşturan mikroorganizmaları kapsamaktadır (Peter, 1984). Ancak, böceklerde hastalık oluşturan mikroorganizmaların kullanımı, genellikle mikrobiyal kontrol olarak adlandırılır.

Biyolojik mücadele, diğer mücadele yöntemlerine göre doğal dengenin kurulmasına yardımcı olması, uzun vadede kalıcı sonuçlar vermesi ve nihai hedefe ulaştırabilmesi bakımından en çok tercih edilmesi gereken mücadele yöntemidir (Oğurlu, 2000).

Biyolojik mücadeleyi asıl önemli kılan, ekosistemi bozmaması ve zararlı türler üzerinde kalıcı ve dinamik bir etki meydana getirmesidir. Bu iki özellik diğer mücadele yöntemlerinde bulunmaz. Biyolojik mücadelenin diğer mücadele yöntemlerine göre; yan etkilerinin olmayışı, başlangıçta masraflı olsa da ilerleyen yıllarda ilk kuruluş harcamalarını tolere ederek en az masrafla en iyi sonucun alınabilmesine imkan vermesi, etkisini uzun süre devam ettirebilmesi, zararlılarda dayanıklılığa ve bağışıklığa yol açmaması ve zararlıyı direkt olarak öldürmekten başka, üreme gücünü azaltma ve gelişiminde dengesizlikler yaratma gibi dolaylı faydalar sağlaması bakımından birçok avantaja sahiptir. Buna karşın esaslı bilgi gerektirmesi, başlangıçta risk taşıması ve neticenin geç alınması gibi tolere edilebilecek dezavantajları bulunmaktadır.

Biyolojik mücadelenin ilk uygulama dönemleri çok eski tarihlere dayanmaktadır. Asya'da avcı karıncalardan bu hususta yararlandığı ve M.S. 900-1200 yılları arasında narenciye zararlılarına karşı kullanıldığı bilinmektedir. 1200' lü yıllarda Yemen'de palmiye ağaçlarındaki zararlılara karşı karıncaların kullanıldığı ve Arabistan'da her yıl dağlardan getirilen avcı karınca kolonilerinin, hurma ağaçlarında zarar yapan bir diğer karınca türüne karşı kullanıldığı kayıtlıdır (Oğurlu, 2000).

1770' li yıllarda İngiltere'de tarım arazileri ve seralardaki çeşitli bitkiler üzerinde zarar yapan afitlerle mücadelede gelin böceklerinden faydalanılmıştır. 1840 yılında Fransa'da kavak ağaçlarında zarar yapan *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) tırtıllarıyla mücadele için koşucu böceklerden faydalanıldığı bilinmektedir.

Biyolojik mücadelede elde edilen bu başarılar, uygulayıcıları cesaretlendirmiş ve günümüze kadar büyük bir gelişme göstererek ilerletilmiştir. Son yıllarda çalışmalar ağırlıklı olarak böceklerde hastalık oluşturan mikroorganizmaların izolasyonu, karakterizasyonu ve biyolojik mücadelede kullanımına yönelmiştir.

Bilindiği gibi bitkiler başta olmak üzere hayvanlar ve insanlara değişik yollarla zarar veren organizmalara karşı kullanılan ilaçlar, insan ve hayvan sağlığının tehdit edilmesi, gıda maddelerindeki ilaç kalıntıları, doğal düşmanların ve yaban hayatın öldürülmesi sonucu doğal dengenin bozulması, ana zararlı olmayan bazı potansiyel zararlıların ana zararlı durumuna geçmesi, kültür bitkilerinde fitotoksitaya neden olması, sık ve gereksiz ilaçlamalarla mücadele masrafının artması, hava, su, toprak kirlenmesi vb. birçok olumsuzlukları ortaya çıkarmaktadır. Bu olumsuzlukları gidermek veya en aza indirmek için de kimyasal mücadeleye alternatif çağdaş, çevre dostu yöntemlere geçilmekte ve bunların da en başında “Biyolojik Mücadele” gelmektedir.

2.4.2.1. Biyolojik Mücadelenin Amacı ve Önemi

Tarımsal üretim sırasında ürünü hastalık ve zararlılara karşı korumak amacıyla çeşitli mücadele yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan kimyasal mücadele son zamanlarda; çevre kirliliği, hedef alınmayan organizmaların zararlı duruma geçmesi, hedef alınan zararlılarda dayanıklılık oluşumu, doğal düşmanların yok edilmesi gibi insan ve çevre sağlığı ile ilgili bir takım olumsuzluklara neden olmaktadır. Bu nedenle kimyasal mücadele yerine alternatif yeni teknikler araştırılmaktadır. Biyolojik mücadele alternatif mücadele yöntemlerinin başında gelmektedir.

Biyolojik mücadeleyi asıl önemli kılan, ekosistem dengelerini koruması ve zararlı türler üzerinde kalıcı ve dinamik bir etki meydana getirmesidir. Bu iki özellik diğer mücadele yöntemlerinde bulunmaz (<http://www.bahcesel.com/forumsel/zirai-mucadele-ilaclari/12427-zararli-bocekler/>, 20.05.2010).

2.4.2.2. Biyolojik Mücadele Materyalleri

Biyolojik mücadelede etkili bir şekilde kullanılan grupları predatörler, parazitler ve mikroorganizmalar olarak 3 ana grup altında toplamak mümkündür. Zararlı

böceklerin doğal düşmanları olan bu canlılar, zararlıların kontrolünde büyük potansiyele sahiptir.

➤ Predatörler, böcek predatörleri, besin kaynağı olarak böcekleri yakalayan ve yiyen hayvanlardır. Bu predatörleri balıklar, amphibiler, sürüngenler, kuşlar, böceklerle beslenen çeşitli omurgasız hayvan grupları ve karnivor böcekler oluşturur. Ormanlarda zarar yapan böcekler düşünüldüğünde bu gruplardan kuşlar ve karnivor böceklerin biyolojik mücadelede kullanılma potansiyeli olduğu söylenebilir. Kuşlar için mutlak yararlı veya mutlak zararlı denilememekle birlikte, kuşları orman için genelde faydalı hayvanlar olarak saymak mümkündür. Zira zararlı böceklerin erginlerini, pupalarını, larvalarını ve yumurtalarını yiyen pek çok kuş türü, bu yönleriyle doğal dengenin sağlanmasında önemli rol oynamaktadırlar (Oğurlu, 2000).

➤ Parazitler, böcek parazitleri, hayatını tek bir konukçu ferdi üzerinde tamamlayan ve konukçusunu zayıflatan, gerileten, gelişmesine mani olan veya öldüren mikroorganizmalara denir. Konukçu ise, paraziti taşıyan canlıya verilen isimdir. Buna göre parazitin ya belirli bir süre ya da tüm hayat döngüsü boyunca, kendinden daha güçlü başka bir canlının üzerinde veya içinde yaşaması gerekir. Bu süre zarfında parazit, konukçunun vücut ısısından, besininden ve hatta hormonlarından faydalanarak konukçu organizmanın zararına gelişmekte ve çoğalmaktadır. Böcek parazitleri kendi gelişimleri tamamlandığında her zaman böceği öldürürler.

➤ Mikroorganizmalar, doğada böceklerin hastalanmasına neden olan ve sonra onları öldüren orjini bakteri, virüs, mantar, nematod veya protozoa olan pek çok mikroorganizma mevcuttur (Lipa, 1975). Bu mikroorganizmalar entomopatojen olarak adlandırılır. Doğada bulunan entomopatojenler böcek populasyonlarının dengelenmesinde büyük öneme sahiptirler. Birçok entomopatojen mikroorganizma, tarla ve bahçe bitkilerinde, seralarda, süs bitkilerinde, koruma altına alınmış alanlarda yetişen bitki türleri üzerinde, orman arazilerinde, depolanmış ürünlerde, veterinerlik ve tıbbi alanlarda zararlara yol açan vektör ve zararlı böceklerin biyolojik kontrolünde kullanılır (Burges, 1981; Tanada ve Kaya, 1993; Lacey ve Kaya, 2000; Lacey ve ark., 2001).

Entomopatojenlerin yakın gelecekte, mikrobiyal kontrol ajanı olarak, sadece fiyat ve etkinlik bakımından değerlendirildiğinde bile kimyasal pestisitlere göre daha kullanışlı hale geleceği düşünülmektedir. Buna ek olarak, bu entomopatojenlerin mikrobiyal kontrol ajanı olarak kullanımı, ekosistemdeki biyolojik çeşitliliğin

sürdürülmesi, zararlı türlerin doğal düşmanlarının korunması, besinler üzerinde kalıntı bırakmaması, hedeflenmemiş diğer organizmalar ve insanlar açısından güvenli olması gibi birçok avantajlara sahiptir (Lacey ve ark., 2001).

Zararlı böceklerin diğer doğal düşmanları gibi, entomopatojenler de tek bir tür veya gruba spesifiktir ve bazıları zararlı böceklerin uzun zaman periyotları boyunca kontrolünü sağlayabilirler (Lacey ve ark., 2001). Entomopatojenlerin zararlı böceklerin kontrolleri için kullanım stratejileri temelde diğer biyolojik kontrol ajanlarının kullanımlarıyla aynıdır (Hamm, 1984). In vitro şartlarda üretilip uygulanabildiği gibi, uygun şartlarda saklanıp doğal ortamda tekrar aktif hale geçebilirler.

Viral ve fungal patojenlerin neden olduğu doğal epidemiler, zararlı böcek popülasyonlarında büyük bir azalmaya yol açarlar (Evans, 1986; McCoy ve ark., 1988). Bununla birlikte Nukleopolyhedrovirüsler, birçok zararlı böcekte doğal epidemilere neden olurken (Kaya, 1976; Evans, 1986; Woods ve Elkinton, 1987), birçok fungal patojen konak böceğin dış iskeletine saldırdıkları için genelde emici ağız yapısına sahip zararlılar üzerinde etkindirler (Latge ve Paierok, 1988; Lacey ve ark., 1996).

Protozoaların zararlı böcek popülasyonlarında meydana getirdikleri epidemiler, az rastlanılan bir durum olmasına karşın, neden oldukları ferdi ve küçük gruplar halindeki ölümler, zararlı böcek popülasyonlarının kontrol altında tutulması bakımından önemlidir (Maddox, 1987; Brooks, 1988).

En yaygın şekilde kullanılan mikrobiyal kontrol ajanı *Bacillus thuringiensis* Berliner bakterisidir. Birçok böcek ordosuna ait türlere karşı aktif olan yeni suşların izole edilmesi ve yapılan genetik düzenlemeler, bu bakterinin kullanım alanları genişletmiştir (Lacey ve ark., 2001).

Mikrobiyal insektisitlerin satışları son yıllarda büyük artış göstermiştir. Ancak bu miktar toplam ürün koruma satışlarının % 1-1,5' lik kısmını teşkil etmektedir. Bu miktarın çok büyük bir kısmını (% 95) *Bacillus thuringiensis* kökenli insektisitler oluşturmaktadır (Gaugler, 1997; Georgis, 1997).

Mikrobiyal kontrol ajanlarının geniş spektrumlu insektisitlere alternatif olarak kullanılma potansiyelleri vardır. Fakat daha yaygın olarak kullanılabilmesi için;

- Virulanslarının ve öldürme hızlarının artırılması,
- Değişen çevre koşullarına karşı (soğuk havalarda, kuraklık şartları gibi) dayanıklılıklarının artırılması,
- Ürettikleri toksinlerin etkinliklerinin artırılması,

- Uygulanan diğer mücadele yöntemleriyle uyumlarının daha iyi araştırılması,
- Diğer çevresel avantajlarının belirlenmesi gerekmektedir (Lacey ve ark., 2001).

Virüsler ile biyolojik mücadele; böcek virüslerinin Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera ve Diptera gibi dünyanın en önemli tarımsal zararlılarını içeren takımlarından hastalık etmeni olarak izole edilmeleri, bu virüsleri çok önemli kılmaktadır. Virüsler böceklerin tabiattaki doğal düşmanları olup, özellikle bakülovirüsler sadece böceklerde hastalık oluşturduklarından güvenli biyolojik mücadele materyali olarak kullanılmaktadır. Şimdiye kadar bakülovirüslere karşı herhangi bir dirençliliğe rastlanmamıştır ve bu virüslerin moleküler biyolojileri detaylı bir şekilde çalışılmıştır.

Virüslerin biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmalılarının pek çok sebebi vardır. Bunların başında dar konak spektrumuna sahip olmaları yani doğrudan hedefledikleri organizmalar üzerinde etkili olmaları insanlarda hastalık oluşturmamaları ve kolayca degradasyona uğrayabilmeleri gelmektedir. Bu avantajlarının yanında bazı dezavantajlarından dolayı viral insektisitlerin geliştirilmesi ve kullanımı sınırlanmıştır. Virüslerin bakteriler gibi besiyerlerin içerisinde üretilmemesinden dolayı canlı böceğe veya hücre kültürlerine ihtiyaç vardır. Bu nedenle üretim hem pahalı hem de zaman alıcıdır (Demirbağ ve Beldüz, 1997).

Funguslar ile biyolojik mücadele; böceklerin mücadelesi konusunda fungusların kullanımı oldukça yenidir. Çok sayıda fungus böceklerle düzenli olarak birlikte yaşamaktadır. Bunların bazıları böceklerde ciddi hastalıklara sebep olur. Henüz pek azı mücadele etmeni olarak ticari preparatlar şeklinde kullanılmaktadır. Bunların daha ileri düzeyde kullanılmalılarını konusunda bazı şüpheler vardır. Bu şüphelerden biri enfeksiyonun sindirim sisteminden ziyade ilk olarak böcek kutikulasında meydana gelmesidir. Yenilerek alınan bakteri ve virüslerin aksine fungusların toksitisesi fungal sporların konak kutikulası ile temasa girmesiyle olur.

Nematodlar ile biyolojik mücadele; böceklerde parazit olarak yaşayan ve bazı durumlarda ölümlerine yol açan birçok nematod türü bulunmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda 302'den fazla nematod familyasına ait türlerin böcekler ve diğer omurgasız hayvanlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Tüm nematodlar içinde böceklerin biyolojik mücadeleleri için çalışılan nematodlar Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına aittir ve özellikle son yıllarda bu familyalara olan ilgi artmıştır (Gaugler ve ark., 1997).

Protozoalar ile biyolojik mücadele; protozoalar hem omurgalılarda hem de omurgasız hayvanlarda enfeksiyon oluşturabilirler. Protozoa gruplarından bazıları biyolojik mücadelede kullanılma açısından gelecek vadeden birçok türü barındırır.

Entomopatojenik protozoalar kommensalden patojeniye varan geniş bir ekolojik ilişki gösterirler. Böcek popülasyonlarındaki doğal biyolojik ilişkiler bakımından önemli olmalarına rağmen mikrobiyal insektisitler olarak kullanılmalrı bakımından fazla etkili olamamaktadırlar.

2.5. Bakteriler ve Biyolojik Mücadele

Entomopatojenik bakteriler, böceklerde kitle halinde ölümlere neden olurlar (Çanakçıoğlu, 1989). Böceklerde patojen olan bakterileri spor oluşturanlar ve spor oluşturmayanlar olmak üzere iki kısma ayırmak mümkündür. Spor oluşturmayan böcek patojeni bakteriler, Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae ve Micrococcaceae familyalarına dahildir. Spor oluşturan entomopatojenik bakteriler ise Bacillaceae familyasından *Clostridium* ve *Bacillus* cinslerinde yer alır. Böceklere önemli zarar veren bakteriler, daha çok spor meydana getiren bakterilerdir. Bazı mevsimlerde tüm konukçuların her ferdini öldürürler. Yapılan araştırmalar sporların kuraklığa ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Fakat spor oluşturmayan bakteriler ekstrem fiziksel koşullara karşı oldukça hassastırlar (Lipa, 1975). Bu nedenle biyolojik mücadelede spor oluşturan bakteriler tercih edilir.

Biyolojik mücadele açısından önem arzeden Bacillaceae familyası üyeleri endospor üreten Gram-pozitif, hareketli ya da hareketsiz çubuk şekilli bakterilerdir. Bu familya içersinde yer alan *Bacillus* ve *Clostridium* cinsleri önemli böcek patojeni olan türler içerir ve birbirlerinden çoğunlukla oksijen ihtiyaçlarına göre ayrılırlar. *Bacillus* cinsine ait türler aerobik veya fakültatif anaerobik, *Clostridium* cinsine ait türler ise anaerobiktir. Her iki cins de zincirler oluşturan çubuk şekilli hücrelere sahiptir (Tanada ve Kaya, 1993). *Clostridium* cinsi içersinde bilinen böcek patojenleri sadece böcek bağırsağında çoğalarak hastalık oluşturlar ve asla böcek hemoseline geçmezler (Pionar ve Petersen, 1978).

Bacillus cinsi önemli böcek patojeni türler içerir. Bunlardan en önemlisi *Bacillus cereus* grubu içerisinde yer alan *Bacillus thuringiensis* bakterisidir. *B. thuringiensis* daha çok Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera gruplarındaki böceklere karşı insektisidal etkiye sahip, kristal yapıda toksin üreten, spor oluşturan bir toprak bakterisidir (Beegle ve Yamamoto, 1992). Son yıllarda yapılan araştırmalara göre Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera ve Mallophaga böcek grupları içerisinde ve ayrıca nematodlar, keneler ve protozoalar üzerinde de öldürücü etkisi tespit edilmiştir (Feitelson ve ark., 1992; Feitelson, 1993).

İlk kez 1901 yılında Japon araştırmacı Ishiwata tarafından hastalıklı ipek böceği larvalarından izole edilen *Bacillus thuringiensis* bakterisi, en geniş şekilde kullanılan mikrobiyal kontrol ajanıdır (Lacey ve ark., 2001). *Bacillus thuringiensis*'in insektisidal aktivitesi, İnsektisidal Kristal Proteinleri (ICP) olarak adlandırılan protein yapıdaki toksinler tarafından gerçekleştirilir. Bu proteinler, bakterilerin içerdiği plazmitler üzerinde yer alan genler tarafından kodlanır (Carlton, 1988). Spor oluşumu sırasında üretilen bu insektisidal proteinler, bakterinin toplam protein içeriğinin yaklaşık % 30'unu oluşturur (Höfte ve Whiteley, 1989; Aronson, 1993; Agaisse ve Lereclus, 1995).

ICP'ler normal koşullar altında çözünmeden bulunurlar. Bu yüzden, insanlar ve diğer yüksek omurgalı grupları için bir risk oluşturmazlar. Buna karşılık pH 9,5 de çözülebilir özellik taşıyan kristal proteinlerine yoğun bir insektisidal özellik kazandırır. Bu proteinin yapısında yer alan δ -endotoksinler böcek bağırsağında çözünerek protoksine dönüşür. Daha sonra bağırsak enzimleri tarafından protoksinler parçalanarak aktif toksinler oluşur. Aktif toksinler bağırsak epitel hücrelerinin reseptörlerine tutunarak böceğin bağırsak duvarını felce uğratar ve burayı tahrip ederek gözlemler oluşturur. Böylece bağırsakta bulunan besin artıkları böcek vücuduna ve kana karışır. Zehirlenen böcek toksin aktivitesi nedeniyle hemen ölebildiği gibi, 2-3 gün içerisinde kan zehirlenmesi sonucunda ölebilmektedir. *B. thuringiensis*'in larvalar üzerinde sebep olduğu semptomlar; yavaş hareket etme, beslenmeyi bırakma, sıvı halde dışkı çıkarma, kusma ve vücut içeriklerinin kahverenginden siyaha dönüşmesi olarak sayılabilir (Knowles, 1994).

Bacillus thuringiensis suşları başta toprak olmak üzere, böceklerden, depolanmış ürünlerden ve bitki yapraklarından izole edilmiştir (Bernhard ve ark., 1997). *Bacillus thuringiensis* alttürlerinin ayırt edilmesinde konak seçiciliği, H-flagella antijenleri ve cry genleri kullanılmaktadır. Son yıllarda DNA parmak izi yöntemi de kullanılmaya

başlanmıştır. 1998 verilerine göre şimdiye kadar H-flagella antijenlerine bakılarak 67 *B. thuringiensis* alttürü tanımlanmıştır (Hansen ve ark., 1998).

B. thuringiensis bakterisinden elde edilen insektisidal ürünlerin insanlar, hedeflenmemiş organizmalar ve faydalı böcekler üzerinde enfeksiyon oluşturmaması, bu ürünlerin zararlı böceklerle mücadele de etkin bir şekilde kullanımını arttırmıştır (Lacey ve ark., 2001; Seigel, 2001). Dünya biopestisid pazarının %95'ini *B. thuringiensis* kökenli ürünler oluşturmaktadır. Birçok ticari firma *B. thuringiensis* kökenli ürünleri piyasaya sürmüşlerdir. 1998 rakamlarına göre sadece A.B.D.' de 200' ün üzerinde *B. thuringiensis* kökenli ürün, zararlılara karşı kullanılmaktadır (Schnepf ve ark., 1998). Ayrıca birçok *B. thuringiensis* kökenli ürün, sentetik kimyasal pestisidlere göre daha düşük maliyetle elde edilmektedir. Örneğin, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'den elde edilen insektisidal ürünler, sentetik kimyasal pestisidlerin 1/40 daha ucuzuna mal olmaktadır (Becker ve Margalit, 1993).

Bacillus cinsine ait diğer bazı türler de zararlı böceklerin kontrolünde kullanılmaktadır. *Bacillus popilliae* (Dutky) , Scarabaeidae familyasına ait bazı türlerin kontrolünde kullanılırken, *Bacillus sphaericus* Neide sivrisinek larvalarının kontrolünde kullanılır (Klein ve Jackson, 1992). *B. popilliae*'nin in vivo üretilmesinin gerekmesi ve birçok arazi uygulamasında beklenilenden daha düşük seviyede enfeksiyon gözlenmesi bu bakterinin geniş alanlarda kullanılma potansiyelini düşürür (Klein ve Kaya, 1995). *B. sphaericus*'un *B. thuringiensis*'e göre kirlenmiş habitatlara dayanıklı ve çevresel faktörlere karşı daha dirençli olmasına karşın, konak spektrumunun çok dar olması en büyük dezavantajıdır (Lacey ve Undeen, 1986; Hougord, 1990; Charles ve ark., 1996; Nicolas ve ark., 1994). Bununla birlikte, bazı sinek türlerinin bu bakteriye karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Rao ve ark., 1995; Nielsen-Leroux ve ark., 1997).

2.6. *Bacillus* Türlerinin Biyolojik Mücadelede Kullanımı

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde kimyasal ilaçların yerini biyoinsektisitler almıştır. Biyoinsektisitler üretim teknolojilerinin kolay ve sürekli olması, sadece hedef canlıya etki etmesi, zararlının kontrolünde güvenilir olması, çevre kirliliği ile ilgili problemler yaratmaması ve endosporlarının doğada uzun süre kalması nedeniyle tercih edilmektedir (WHO, 1999).

Biyoinsektisit olarak bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar ve protozoa

gruplarına ait organizmalar kullanılmaktadır. Bunlar arasında, toprak grubu bakteriler en çok gelecek vaat eden biyolojik kontrol ajanlarıdır. Özellikle *Bacillus* grubu bakteriler önemli bir yer teşkil etmekte olup Lepidoptera (kelebekler) , Diptera (sinekler ve sivrisinekler) ve Coleoptera (kım kanatlılar)' ları hedef almaktadır (National Research Council, 1984).

Biyolojik mücadelede kullanılan mikroorganizmaların %90' ını *Bacillus thuringiensis* oluşturmaktadır. *Bacillus thuringiensis* delta endotoksin olarak isimlendirilen protein yapıda ve biyolojik olarak kolayca parçalanabilen ve böylece böceğin orta bağırsağında kısa bir yarılanma ömrü olan insektisidal toksinler üretirler (Chattopadhyay ve ark., 2004).

2.7. *Bacillus* Türlerinin Genel Özellikleri

Bacillaceae ailesine ait olan *Bacillus* cinsi, çubuk şekilli, endospor oluşturan, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşur. Vejetatif hücreler, tek başına veya zincir şeklinde bulunabilir. Yuvarlak veya köşeli şekilde biten hücrelerin büyüklükleri $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}'$ den $2,5 \times 10 \mu\text{m}'$ ye değişmektedir. Hücrede bulunan sporun şekli ve yeri, türler arasında farklılık gösterir. Hücreler Gram-pozitif boyanır ancak bazıları kültürün yaşına bağlı olarak Gram-negatif reaksiyon verebilirler (Rosovitz ve ark., 1998 ; Sneath, 1986).

Optimum büyüme sıcaklıkları 25°C ile $37^{\circ}\text{C}'$ de arasında değişmektedir. Ancak termofilik ve psikofilik türleri $75^{\circ}\text{C}'$ den daha yüksek ve $3^{\circ}\text{C}'$ den daha düşük sıcaklık derecelerinde büyüebilme yeteneğine sahiptirler. Bazı türleri 2 ile 10 arasında değişen alkali ve asidik ortamlarda gelişebilirler (Sneath, 1986).

Bacillus türlerinin koloni özellikleri çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Besiyeri çeşidi, koloninin yaşı gibi özelliklere göre, yarı şeffaf, opak, düzgün ya da pürüzlü koloniler görülebilir. Koloni renkleri, kreme yakın beyazdan sarıya doğru olabilir. Çoğu *Bacillus* türü pigment oluşturmaz ancak bazı türler farklı besi yerlerinde sarı, yeşil, mavi-siyah vb pigmentler üretebilir (Rosovitz ve ark., 1998; Sneath, 1986).

Bu cinse ait bakterilerin çoğunun tanımlanması, hala klasik biyokimyasal testlerle yapılabilir de, bu işlemin çeşitli olumsuzlukları vardır hem de oldukça iş yüküne neden olmaktadır.

Koloni özellikleri genellikle çevresel faktörlere göre değişebilmektedir. Kültürün ürettiği besiyerinin bileşimi ve inkübasyon sıcaklığı gibi etmenle, koloni büyüklüğü ve morfolojisini değiştirebilir. Katı besiyerlerinde genellikle daha geniş ve şekilli koloniler

oluşturmaları, ön tanımlama için büyük yarar sağlamaktadır. Koloni morfolojilerine göre seçilen örnekler biyokimyasal testler kullanılarak tanımlanırlar. Günümüzde API ve VITEK teknikleri kullanılarak tanımlama yapılabilmektedir. Bu sistemlerin temeli, sistemde kayıtlı referans organizmalar ile doğal organizmanın biyokimyasal özellikleri bakımından karşılaştırılması esasına dayanmaktadır.

Bacillus' ların teşhisinde kullanılabilen bir diğer uygulama ise yağ asiti kompozisyonu temeline dayalı tanımlama sistemleridir. Bu yöntem, hücresel yağ metil-esterlerinin (FAME) Gaz-Chromatografisi (GC) ile analizi ve referans değerler ile karşılaştırılması esasına dayanmaktadır.

Belirtilen yöntemlerin yanısıra günümüzde, moleküler tanımlama şeklinde de adlandırılan ve 16S rRNA/DNA sekans analizi esas alınarak gerçekleştirilen ileri tanımlama yöntemleri de kullanılmaktadır. Bu teknik ağırlıklı olarak filogenik çalışmalarda tercih edilmektedir (Barrow ve Feltham, 1993).

2.8. Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler

2.8.1. Nümerik Taksonomi

Nümerik taksonomi, bakterilerin karakterizasyonu ve sistematığının yapılması amacıyla hazırlanan bir dizi testi içerir. Bu testler, mikroorganizmalar arasındaki farklılıklardan faydalanarak doğru taksonomik katagorilere yerleştirilmelerini sağlar. Bu testler sonucunda bakterilerin, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve büyüme özellikleri ortaya çıkarılır.

Morfoloji: Bakterilerin tür tayinlerinde ilk olarak ortaya çıkarılması gereken özellik, hücre şeklidir. Hücre şeklinin ortaya çıkartılması için basit boyama yapılır ve mikroskop altında incelenir (Benson, 1985).

Bakteriyolojide kullanılan en önemli ayırt edici boyamalardan birisi de gram boyamadır. Bu boyama yöntemi, bakterilerin hücre duvarındaki farklılığın ortaya çıkarılması amacıyla yapılır. Gram boyama sonucuna göre bakteriler, gram pozitif ve gram negatif olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bu özellik bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan en önemli kriterlerden birisidir (Sneath, 1986).

Bazı bakteriler, ortam şartları yaşam için uygun olmayan hale geldiğinde, endospor olarak adlandırılan yeni bir hücre içi yapı meydana getirirler. Bir bakterinin

endospor oluşturup oluşturmadığının bilinmesi ve varsa endosporun pozisyonu taksonomik açıdan önemlidir. Bu özelliklerin belirlenmesi amacıyla endospor boyama yapılır.

Bazı bakteriler hücrelerin dış yüzeyinde ekstraselüler polisakkaritlerden oluşan ve kapsül adı verilen bir yapıya sahiptir. Bu yapının varlığı veya yokluğu sistematikte kullanılan karakterlerden biridir. Bunu belirlemek için kapsül boyama yapılır (Cappuccino ve Sherman, 1992).

Büyüme: Bakterilerin inoküle edildikleri besiyerinde oluşturdukları, koloni morfolojisi, pigment oluşumu ve üreme süresi gibi karakterlerdir. Bu karakterlerden her biri sistematik açıdan büyük önem taşır ve mikroorganizmanın farklı taksonomik kategoriye yerleştirilmesini sağlar.

Fizyoloji: Bakterilerin sınıflandırılmasında, büyüdükları ve yaşadıkları ortamın pH'ı, tuzluluğu, sıcaklığı ve oksijen miktarı gibi kriterler kullanılan özelliklerden bazılarıdır.

Biyokimya: Biyokimyasal katalizörler olarak bilinen enzimler, hem hücre içindeki hem de hücre dışındaki olayları katalizleyerek biyokimyasal aktiviteler meydana getirmektedirler (Sneath, 1986). Bu olaylar iki şekilde incelenmektedir.

a) Ekstraselüler enzimler: Büyük molekül ağırlığına sahip olan maddeler hücre zarından geçemezler. Bu nedenle bu maddeler (polisakkaritler, lipidler, proteinler) daha düşük molekül ağırlığına sahip olan maddelere dönüştürülmelidir. Ancak bu durumda hücre zarından geçebilirler. Hücre dışındaki substratlara etki eden enzimler genel olarak, ekstraselüler enzimler olarak adlandırılır. Hücre dışında görev yapan bu enzimler nişasta, lipid, jelatin gibi maddelerin hidrolizinden sorumludur. Bu enzimlerin varlığı veya yokluğu, mikroorganizmalar arasındaki genetiksel benzerlikleri veya farklılıkları göstermesi açısından sistematik olarak önemlidir.

Nişasta, bakteriler tarafından amilaz enzimi sayesinde hücre dışında alt ünitelerine ayrılarak kullanılır. Amilaz enziminin varlığı veya yokluğu, nişasta hidroliz testi ile ortaya çıkarılmaktadır (Cappuccino ve Sherman, 1992).

Jelatin zorunlu aminoasitlerden biri olan triptofanı içermeyen ve bu özelliği nedeniyle eksik protein olarak adlandırılan bir makromoleküldür. Eksik bir protein olması ve hücre için besleyici değeri tartışılır olmasına rağmen, bakteri türlerinin karakterizasyonunda önemlidir (Cappuccino ve Sherman, 1992). Bakteriler bu proteini,

jelatinaz enzimi yardımıyla aminoasitlerine kadar parçalar. Jelatinaz enziminin varlığı, jelatin hidroliz testi ile ortaya çıkarılmaktadır.

b) İntraselüler enzimler: Bu enzimler hücre içersinde faaliyet gösterir ve hücre için gerekli olan yeni protoplazmik ihtiyaçların sentezinden sorumludur. Bu tip enzimlerin kullanılmasıyla oluşan son ürünlerin anlaşılması, sadece özel enzim sistemlerinin aydınlatılması için değil, aynı zamanda bakterilerin sınıflandırılması ve teşhisi için de kullanılmaktadır (Cappuccino ve Sherman, 1992).

2.8.2. Yağ Asitleri Profillerine Göre Bakterilerin Tanısı ve Karakterizasyonu

Yağ asitleri, hidrokarbon [$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$] yapısında olan, tek veya dallanmış zincire sahip makromoleküllerdir. Yapılarındaki farklılık dikkate alındığında yağ asitleri, tek zincirli yağ asitleri ve dallanmış yağ asitleri olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Biyolojik sistemlerde tek zincirli yağ asitleri oldukça yaygındır. Fakat prokaryotik hücrelerde dallanmış zincir oluşturan yağ asitlerine de sıkça rastlanır. Yağ asitleri; içerdikleri karbon atomlarının sayısına, karbon atomları arasındaki çift bağ sayısına, hangi karbon atomları arasında çift bağ olduğuna ve karbonların hidrojen atomları tarafından doyurulmuş olup olmamalarına göre farklı isimler alırlar. Prokaryotik hücrelerde bulunan yağ asitlerindeki karbon sayısı 9-20 arasında değişir (Şahin, 2003).

Genetik olarak aynı olan mikroorganizmaların hücrelerindeki yağ asitlerinin sayısı, çeşitliliği ve yüzde olarak miktarları (yağ asitleri profili) aynıdır ve çevre şartları aynı olduğu sürece değişmez. Yağ asidi profillerindeki farklılıklar ise dolaylı olarak mikroorganizmalar arasındaki genetiksel farklılığı ifade etmektedir. Bu nedenle kültür ortamında (standart suni besiyerlerinde) çoğalabilen mikroorganizmaların gerek tanısı gerekse taksonomik sınıflarının saptanması için yağ asitleri profillerinin kullanılabileceği birçok bilimsel çalışma ile ıspatlanmıştır (Şahin, 2003).

Mikroorganizmaların hücre yapılarında (sitoplazma ve hücresel membranlarda) fosfolipid, glikolipid veya lipopolisakkarit olarak bulunan yağ asitlerini, sayısına, çeşidine ve yüzde olarak miktarlarına göre tanılayan sistem 1985 yılında geliştirilmiştir (Miller ve Berger 1985). Mikrobiyal Identifikasyon Sistemi (MIS) olarak isimlendirilen bu yöntem, bilgisayar kontrolünde çalışmakta olup, gaz kromatografisi, bu

kromotografiyi besleyen gaz tankları (hidrojen, azot ve hava), bilgisayar ünitesi, bilgisayar ünitesiyle uyumlu çalışan kütüphaneler ve yazıcı olmak üzere 5 kısımdan meydana gelmektedir (Lelliott ve Stead, 1978). Anaerobik ve aerobik bakteriler, actinomycetes, maya ve gelişmiş funguslar bu sistem sayesinde kolaylıkla ve çok kısa sürede tanımlanabilmektedir (Miller ve Berger, 1985; Sasser, 1990; Dunfield ve ark., 1999; Buyer, 2002).

Tanımlanmak istenilen mikroorganizmalar ilk önce standart besiyerlerinde ve çevre şartlarında 24-72 saat süreyle üretilir. Üremesini tamamlayan mikroorganizmalar, 13 mm'lik teflon ile kaplanmış kapakları olan vidalı tüpler içerisinde toplanmakta (~ 40 mg) ve bu hücrelerden yağ asitleri saflaştırılmaktadır. Her bir mikroorganizmadan saf olarak izole edilen yağ asidi metil esterlerinin profilleri, MIS cihazında gaz kromatografisi yöntemiyle saptanmaktadır. Test edilen mikroorganizmaların gaz kromatografik çıktıları (yağ asidi profilleri) sistemin database'indeki bilinen mikroorganizmaların yağ asit profilleri ile karşılaştırılarak tanısı yapılmaktadır. Analiz sonuçları gaz kromatografi grafikleri, yağ asitleri profili ve tanı raporu yazılı rapor halinde verildiği gibi, aynı zamanda sistemin hafızasına otomatik olarak kaydedilmekte ve bu bilgilere istenildiği zaman ulaşılarak tekrar yeni bir çıktı alınabilmektedir (Şahin, 2003).

2.8.3. Metabolik Enzim Profilleri ve Biyokimyasal Özelliklerine Göre Bakterilerin Tanımlanması

Karbonhidratlar yapı ve depo molekülü olup, enerji kaynağıdır. Mikroorganizmaların, çeşitli karbon kaynaklarını enerji kaynağı olarak kullanma ihtiyacında gösterdiği farklılıklar, tanı ve karakterizasyonda kullanılabilir. Bakteriler biyokimyasal, fizyolojik ve hayatsal faaliyetlerini sürdürmek için biyoenerjiye ihtiyaç duymakta ve dışarıdan aldıkları karbon kaynaklarını metabolik enzimlerle parçalayarak biyolojik enerjiye dönüştürmektedirler.

Mikroorganizmaların farklı karbon kaynaklarını (basit şekerler, alkoller, aminoasitler, deterjanlar, aminoasit benzeri moleküller) kullanımından gösterdikleri farklılıklar metabolik profil olarak adlandırılmaktadır ve profildeki bu farklılık sahip oldukları metabolik enzim çeşitliliğine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Black ve Sweetmore, 1994; Gamo ve Shoji, 1999). Mikroorganizmaların taşıdığı bu enzim

farklılığı ise onların familya düzeyinden başlayıp alt tür seviyesine kadar devam etmektedir (Konopka ve ark., 1998; Yılmaz, 2004).

Mikroorganizmaların arasındaki metabolik farklılıkları saptamak için farklı teknikler kullanılmaktadır. Son 20 yıldır otomatik bakteri tanımlama ve duyarlılık test sistemleri geliştirildi ve ticari olarak piyasada yer almaktadır. Ancak bu sistemlerden yalnızca birkaç tanesinden yararlanılmaktadır. Günümüzde, API ve VITEK teknikleri kullanılarak tanımlama yapılabilmektedir. Bu sistemlerin temeli, sistemde kayıtlı referans organizmalar ile doğal organizmanın biyokimyasal özellikleri bakımından karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Üreme temelli testlerde son ürünün ölçülebilmesi için 18-24 saatlik inkübasyon süresi gerekir. Son ürünlerin metabolik aktivitesi pH indikatörleri aracılığı ile oluşan renk değişimi ile belirlenir.

2.9. Bakterilerin İnsektisidal Özelliklerinin ve Patojen Bazı Mikroorganizmalar Üzerinde Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması

2.9.1. Mikroorganizmaların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

İzole edilen mikroorganizmaların zararlı böcekler üzerinde patojenik bir etkiye sahip olup olmadıkları virulans testleriyle belirlenir. Bu testler için böceğin biyolojisi göz önünde tutularak yaşayabilecekleri uygun ortamlar hazırlanır ve sağlıklı böcekler kullanılır. In vitro koşullarda mikroorganizmaların saf kültürleri hazırlanır ve uygulanır. In vitro olarak üretilemeyen virüsler, protozoalar ve diğer mikroorganizmaların enfeksiyon numunesi, ölü ve hastalıklı böceklerden elde edilir. Böceklerin enfeksiyonu için birçok metot bilinmektedir. Bu metotlar; besin içinde enfeksiyon, kutikula içine enfeksiyon, ağız ve çevresi içine enfeksiyon, mikroorganizmaların oral ve anal açıklıklar üzerine yerleştirmek, mikrobeseleme ve mikroenfeksiyon şeklinde sıralanabilir (Lipa, 1975).

Virulans testleri (biyoassay) süresi, uygulanan mikroorganizmaya göre değişiklik göstermektedir. Bakteriler ve virüsler gibi mikroorganizmaların virulans testlerinin genelde 5-10 gün sürdürülürken, böceklerde kronik enfeksiyonlar oluşturan protozoaların virulans testleri birkaç ay sürdürülebilir. Virulans testleri sırasında, diğer ölüm nedenlerinin sonuçlarından, mikroorganizmaların neden olduğu ölümleri ayırmak

için, ölü böceklerin diseksiyonu yapılmalı ve gerçek ölüm nedeni araştırılmalıdır (Lipa, 1975; Lacey, 1997).

Yapılan virulans testlerinin sonuçları, istatistiksel metotlar kullanılarak matematiksel olarak ifade edilir. Bu amaç için kullanılan birçok metot bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak Abbott Formülüdür. Abbott (1925) tarafından geliştirilen bu yöntem şu şekilde formüle edilebilir;

$$(\%) \text{ Ölüm oranı} = \frac{\text{Toplam ölüm oranı} (\%) - \text{Kontrol grubundaki ölüm oranı} (\%)}{(\%) 100 - \text{Kontrol grubundaki ölüm oranı} (\%)}$$

2.9.2. Mikroorganizmaların Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Antimikrobiyal Etkileri

Tarım ürünlerinin verimini artırma ve hastalıklara karşı korunma çarelerinin uzun bir geçmişi vardır. Bitki koruma ilaçlarının ekonomik önemi tartışmasız kabul edilen bir gerçektir. Bilinçli kullanımları halinde verimi birkaç kat artırabilmektedirler. Hastalık, zararlı ve yabancı otların neden olduğu ürün kayıplarının önlenmesinde bu tarım ilaçları önemli bir yere sahiptir. Ancak kimyasal mücadelede kullanılan ilaçların insan sağlığı, çevre ve doğal dengeyi olumsuz yönde etkilemesi ve artan üretim maliyetleri nedeniyle tarımsal ilaçların hassas, dikkatli ve en az ilaç kaybına neden olacak şekilde uygulanması gerekmektedir (Dursun, 2000). Kimyasal ilaç uygulamalarında amaca uygun olmayan ekipman kullanımı, kullanılan ilaçlama ekipmanının yanlış kalibrasyonu ve buna bağlı olarak birim alana atılan ilaç miktarının gereğinden çok veya az olması, yanlış ilaç seçimi, ilaçlamanın uygun zamanda yapılmaması ve ilacı uygulayan kişinin bilgisizliği gibi etkenler ilaç uygulama etkinliğinin azalmasına, ilaçlama maliyetinin artmasına ve çevre kirliliğine neden olmaktadır. Oysa amaç, pestisitlerin en etkili biçimde, fakat en az sorun oluşturacak şekilde kullanılabilmesidir.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Toprak Örneklerinin Alınması

Bu çalışmada Ordu ili ve ilçelerinden alınan 105 farklı toprak numunesi kullanıldı. Toprak örnekleri alınmadan önce steril bir spatula ile yüzey materyalleri süpürülmüş ve yüzeyden 2-5 cm arası derinlikten alınan toprak örneği steril kaplara konularak laboratuara getirildi ve her birine farklı numara verildi. Alınan toprak örnekleri *Bacillus* izolasyonu yapılana kadar örnekler +4 °C’de muhafaza edildi.

3.2. Alınan Toprak Örneklerinden *Bacillus* Cinsine Ait Bakterilerin İzolasyonu

Alınan toprak örneklerindeki *Bacillus* cinsine ait bakterileri tespit etmek amacıyla her bir numuneden 5’er gr tartıldı ve 25 ml fizyolojik suda çözüldü. Bu karışımlar iki dakika bekleme bırakıldı ve sonra iyice çalkalandı. İki dakika sonra karışımların üzerindeki sıvıdan 1.5 ml alınıp mikrosantrifüj tüplerine bırakıldı ve 80°C’de 5 dakika bekletildi. Sonra bu tüplerin üzerinden 1 ml alınıp sodyum asetatlı nutrient broth üzerine konuldu. Bu tüpler 31°C’de 4 saat boyunca bekletildi ve büyümeye müsaade edildikten sonra 80°C’de tekrar 5 dakika bekletildiler. Daha sonra bunlardan %7 sodyum klorür içeren nutrient agarlı besiyerlerine ekim yapıldı ve 31°C’de 3-4 gün inkübasyona bırakıldı (Bülbüloğlu, 2000).

3.3. Saf Kültürlerin Hazırlanması

İnkübasyon sonunda nutrient agar üzerinde oluşan koloniler tek tek tespit edildi. Bunlar arasında koloni morfolojisine ve rengine göre birbirinden farklı olanlar belirlendi ve bu koloniler alınarak çizgi ekim yöntemiyle nutrient agar üzerine ekilerek saf kültürler hazırlandı. Birbirlerinden morfolojik olarak farklı olan bu izolatların çeşitli boyama ve ayırt edici diğer özelliklerinin incelenmesine geçildi. Boyama sonucunda morfolojik olarak Gram pozitif çubuk şekilli olan bakteriler deney materyali olarak seçilmiştir.

3.4. Bakteriyal İzolatların Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

3.4.1. Basit Boyama

Elde edilen izolatların hücre şekillerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak basit boyamalar yapıldı. Bu amaçla her bir izolat nutrient broth besiyerine ekildi ve 30 °C'ye ayarlı su banyosunda inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik kültürlerden bakteriyal smear hazırlandı. Hazırlanan smearlar alevden geçirilmek suretiyle tespit edildi. Daha sonra kristal viole boya solüsyonu ilave edildi, 1-2 dakika beklendikten sonra, dH₂O ile yıkandı ve kuruduktan sonra mikroskop altında incelendi (Benson, 1985).

3.4.2. Gram Boyama

Gram boyama, bakterilerin hücre duvarının içeriği hakkında bilgi veren bir boyama türüdür. Gram negatif olarak boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka, gram pozitif olarak boyanan bakterilere göre çok daha incedir. Gram boyama için her bir izolat nutrient broth besiyerine ekildi ve 30 °C'ye ayarlı su banyosunda 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. Bakteriyal smear hazırlandı ve alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smear, 1 dakika kristal viole ile muamele edilerek dH₂O ile yıkandı. Kuruması beklenmeden 1 dakika lugolle muamele edildi. Aseton-alkolle renk giderilinceye kadar yıkandıktan sonra renk kaybını durdurmak için hemen dH₂O ile yıkandı. 30-60 saniye safraninle muamele edildi ve tekrar dH₂O ile yıkandı. Açık havada kurutulduktan sonra mikroskop altında incelemeye alındı. Mor renkle boyanan bakterilerin gram pozitif, pembe renk ile boyanan bakterilerin ise gram negatif olduğuna karar verildi (Cappuccino ve Sherman, 1992).

3.4.3. Endospor Boyama

İzolatların endospor oluşturup oluşturmadığını ve varsa endosporun hücre içersindeki pozisyonunu belirlemek amacıyla, her bir izolat nutrient broth besiyerine ekildi ve 48-72 saat 30 °C'ye ayarlı su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından bakteriyal smear hazırlandı ve alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smearlar küçük bir filtre kağıdıyla kapatılarak, malaşit yeşili ile 5 dakika

boyunca su buharı üzerinde boyandı. dH₂O ile yıkandı ve 30-60 saniye boyunca safraninle muamele edildi. Tekrar dH₂O ile yıkanarak açık havada kurutuldu. Mikroskop altında incelenerek kırmızı renkli hücreler içerisinde yeşile boyanmış sporların varlığı araştırıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992).

3.4.4. Kristal Boyama

İzolatların *Bacillus thuringiensis* bakterisinde bulunan kristal protein içerip içermediğini belirlemek amacıyla kristal boyama tekniği kullanıldı. Bu yöntem için Coomassie Brilliant Blue (%50 etanol ve %7 asetik asit solusyonu içinde %25 oranında CBB) boyası kullanıldı. Smearları hazırlanan bakteriler, boyanmadan önce %50/50 etanol/aseton karışımından geçirildi. Daha sonra CBB ile boyama yapıldı. Sonuçlar mikroskop altında incelenerek kristal proteinlerin varlığı araştırıldı. Bu boyama kristallerin varlığını doğrulamada çok faydalı olmaktadır (Sharif, 1988).

3.5. Bakteriyel İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Vitek 2 Sistemiyle Belirlenmesi

İzolatlar Nutrient agara ekim yapılarak bir günlük inkübasyon sonrası biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Giresun İl Kontrol Laboratuvarı Mikrobiyoloji Analiz Birimi'nde bulunan Vitek 2 cihazı kullanıldı.

Vitek 2 sistemi (bioMe'rieux) flüoresan temelli yeni bir teknolojiyi kullanmaktadır. Sistemde sıvı dilüsyon bazlı Gram pozitif, Gram negatif, maya ve küf gibi organizmaların tanımlanmalarını sağlayan 64 tane kuyucuklu kartlar kullanılmaktadır (Verweij ve ark., 1999; Pincus, 2002).

Kültür sistemi bu plastik kartlardır. Test edilecek bakteri süspansiyonu, kapillerler yoluyla kuyucuklara geçer ve kuyucuklardaki kimyasal ajanlar ile rehidrate olur. Kısa sürede üreyen bakterilerin bulanıklık oluşturması, besiyerinde türbidimetrik olarak ölçülür. Üremenin lineer regresyon analizi ve algoritmalar ile minimal inhibisyon konsantrasyonu belirlenir.

3.6. Bakteriye İzolatlarmn Yağ Asidi Profillerinin Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS) Kullanılarak Belirlenmesi

Saf kültür olarak -20°C' de muhafaza edilen izolatlarmn yağ asidi metil ester ekstraksiyonu (FAME), izolasyonu, saflaştırması ve analizi yapıldı. Bilgisayar kontrollü gaz kromatografi sistemi olan Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS) kullanılarak kültüre alınan örneklerin tür seviyesinde tanısı yapıldı.

3.6.1. Yağ Asiti Metil Esterlerinin Saflaştırılması

İzolatlarmn içerdikleri yağ asitlerini saf olarak izole edebilmek için 4 farklı çözelti kullanıldı.

Çözelti 1: Saponifikasyon (Hücre parçalanması)

NaOH	45 gr
Metil alkol	150 ml
Saf su	150 ml

Sırasıyla 150 ml metil alkol ve 150 ml saf su, 1 L'lik renkli çözelti şişesine ilave edildi. Daha sonra katı formdaki 45 g sodyum hidroksit eklenerek çözülünceye kadar karıştırıldı.

Çözelti 2: Metilasyon

HCl ₂	325 ml
Metil alkol	275 ml

Sırasıyla 325 ml hidroklorik asit ve 275 ml metil alkol, 1 L'lik renkli çözelti şişesi içerisinde iyice çözülünceye kadar karıştırıldı.

Çözelti 3: Saflaştırma

Hekzan	200 ml
Meti-tert-butil eter	200 ml

Sırasıyla 200 ml metil-tert butil eter, 200 ml hekzan üzerine ilave edilerek 1 L'lik renkli çözelti şişesi içerisinde çözülünceye kadar karıştırıldı

Çözelti 4: Bazık yıkama

NaOH	10,8 gr
Saf su	900 ml

Sırasıyla 10,8 gram katı formdaki sodyum hidroksit, 900 ml saf su içerisinde iyice çözülmeye kadar karıştırıldı, 1L'lik çözelti şişesine aktarıldı.

Hazırlanan bu dört çözelti ile izolatlardan yağ asiti metil esterlerinin saflaştırılması için bir TSA (Tryptic Soy Agar) üzerinde geliştirilen izolatlar inkübasyon periyodunu takiben, 4 fazlı çizim yapılmış petrilerin 3 ve 4 numaralı fazlarından canlı bakteri hücreleri steril özeyle toplanarak (yaklaşık 40 mg), 5ml'lik steril cam test tüplerine aktarıldı. Tüpler etiketlenerek ağızları sıkıca kapatıldı. Her bir test tüpüne 1ml çözelti 1 eklenmiştir, 5-10 saniye çalkalandıktan sonra test tüpleri 5 dakika süreyle 100 °C'lik su banyosunda bekletildi. Ardından tekrar 5-10 saniye çalkalanan test tüpleri, 25 dakika süreyle 100 °C'lik su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Bu muamele ile canlı hücreler parçalanarak, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır.

İkinci basamakta test tüplerine 2 ml çözelti 2'den eklendikten sonra, 5-10 saniyelik bir çalkalamadan sonra 80 °C'de 10 dakika süreyle su banyosunda bekletildi ve hemen ardından 2 dakika süreyle buz içerisinde soğutuldu. Bu uygulama ile serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenmiş ve yağ asitlerinden yağ asit metil esterleri elde edilmiştir.

Üçüncü basamakta soğutulmuş tüplere 1,25 ml çözelti 3'den ilave edilerek 10 dakika süreyle hematoloji çalkalayıcısında çalkalandı. Tüplerin alt kısmında asidik (inorganik), üst kısmında da organik sıvı fazları olmak üzere iki ayrı faz oluştuğu gözlemlendi. Yağ asit metil esterleri asidik fazdan ayrışarak organik faz bölgesinde toplandığından pastör pipeti ile kullanılarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atıldı ve organik faz muhafaza edildi. Bu işlemle yağ asidi metil esterlerine hekzan bağlandı.

En son aşamada her tüpe 3 ml çözelti 4'den ilave edilip, sonra 5 dakika çalkalandı ve 10 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Çözelti 4, bazik bir çözelti olduğundan, serbest yağ asit metil esterlerini daha saf elde etmemizi sağlamıştır. Bu aşamada da tüp içerisinde yine iki ayrı faz oluştuğu gözlemlendi. Üst fazda toplanan ve yağ asit metil esterleri içeren faz, pastör pipeti ile alınarak 2 ml'lik gaz kromatografisi tüplerine transfer edildikten sonra ağızları sıkıca kapatıldı ve MIS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine yerleştirildi (Karrı ve ark., 2010).

3.7. İzolatların İnsektisidal ve Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi

3.7.1. Böceklerin Toplanması

Bu çalışma için gerekli olan Patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*) larva ve erginleri Mayıs-Haziran 2010 ve Haziran-Temmuz 2011 tarihleri arasında Ordu ilinin Kumru ilçesi yaylalarından, Dev soymuk böceği (*Dendroctonus micans*) larvaları, Eylül 2010-Temmuz 2011 tarihleri arasında, Ordu ili sınırları içersinde Orman İşletme Müdürlüğü'ne bağlı Turnalık Yaylası ormanlarından ve Büyük bal mumu güvesi (*Galleria mellonella*) larvaları Eylül 2010-Haziran 2011 tarihleri arasında Ulubey Arıcılık Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Toplanan larva ve ergin böcekler, toplandıkları yer ve tarih not edildikten sonra, önceden steril edilmiş özel kaplara konularak laboratuara getirildiler. Burada makroskobik incelemeler yapılarak ölü, hastalıklı ve yavaş hareket edenler ayrıldı. Sağlıklı olduklarına karar verilenler ise deney materyali olmak üzere ayrıldılar.

3.7.2. İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Elde edilen izolatların insektisidal etkilerini tespit etmek amacıyla ilk olarak deney grupları oluşturuldu. Bunun için test edilecek böcekler titizlikle seçildi ve hepsinin sağlıklı olmasına dikkat edildi. Ayrıca böceklerin aynı instarlarda olmasına dikkat edildi. Çünkü aynı tür böceğin, farklı instarlardaki dönemlerde biyolojik ajanlardan etkilenme oranları da farklı olmaktadır (Çökmüş ve Younsten, 1994).

Topraktan izole edilen bakterilerden hazırlanan numuneler, Patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*, Say 1894), Dev soymuk böceği (*Dendroctonus micans*, Brichet ve Severin, 1903) larvaları ve Büyük bal mumu güvesi (*Galleria mellonella*, Linnaeus 1758) larvaları üzerinde farklı zamanlarda 7 gün boyunca uygulandı.

Patates böceği erginleri için 4-6 cm boyunda, 3-4 cm eninde taze patates yaprakları kullanıldı. Dev soymuk böceği larvaları için 8-10 cm boyunda, 3-4 cm eninde taze ladin kabukları kullanıldı. Büyük bal mumu güvesi larvaları için ise Ulubey Arıcılık Enstitüsü'nden temin edilen hazır petek kullanıldı. Hazırlanan yaprakların ve hazır peteklerin alt ve üst yüzeylerine, her bir izolattan hazırlanan numuneler steril bir şırınga yardımı ile yayıldı. İzolatların inoküle edildiği besinler 8 cm derinliğinde, 5 cm

çapında kaplara yerleştirildi. Daha sonra her bir kaba 10 tane *L. decemlineata*, *D. micans* ve *G. mellonella* larvaları konuldu. Test ölü ve hayatta kalan böceklerin varlığına dikkat edilerek 7 gün sonunda bitirildi (Kampfer, 1995). Test süresince oluşturulan deney grupları günlük olarak kontrol edildi. Kontrol süresi boyunca ölen böcekler kaplardan çıkartıldı (Ombui ve ark.,1996; Swiecicka, 2001). Her gün ölen böcek sayısı tespit edildi ve ortalama ölüm oranları belirlendi. Bu uygulama her bir izolat için üç kez tekrarlandı.

Yapılan 3 uygulama için de kontrol grubu kullanıldı. Kontrol gruplarına bakterisiz taze patates yaprağı, hazır petek ve taze ladin ağacı kabukları verildi.

3.7.3. İzolatların Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması

Elde edilen izolatların bazı patojen mikroorganizmalar üzerinde etkilerine bakılarak biyolojik mücadele ajanı geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada topraktan izole edilen bakterilerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan bakteriler; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853, *Bacillus cereus* ATCC®10876, *Escherichia coli* ATCC®25922, *Salmonella typhimurium* ATCC®14028, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC®13883, *Listeria monocytogenes* ATCC®7677, *Shigella sonnei* ATCC®25931, *Clostridium perfringens* ATCC®313124, *Yersinia enterocolitica* ATCC®27729 olup, antifungal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan maya ve küfler; *Aspergillus niger* ATCC®9642, *Candida albicans* ATCC®10231 ve *Saccharomyces cerevisiae* ATCC®9763 ‘ dir.

Kültürler; Ordu Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonlarından temin edilmiştir. Kullanılan mikroorganizma türleri Çizelge 3.7.3.1.’ de verilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite Ertürk (2006)’ ün yaptığı çalışmada izlenen yol göz önüne alınarak tespit edildi. Çalışmada kullanılan besiyerleri çalışmaya başlamadan önce otoklavda (Nüve OT 4060) sterilize edildi (15 dk, 1,5 atm ve 121°C) ve sonrasında 45-50°C’ ye kadar soğuması beklendi. Daha sonra agar besiyerleri 10 cm çapındaki steril petri kutularına steril pipetler ile 20 ml kadar dağıtıldı. Besiyerinin homojen bir şekilde dağılması sağlanarak donması beklendi.

Petri üzerindeki katılaşan agar üzerine swap yöntemi ile mikroorganizma ekimi yapıldıktan sonra hazırlanan ekstraktlardan, petriye hafifçe bastırılarak yerleştirilen diskler üzerine 15'er µl damlatıldı. Bakteri suşları 37±0,1°C'de 24 saat süreyle, aynı şekilde hazırlanan fungus suşları ise 25±0,1°C'de 48 saat süreyle etüvde (Nüve EN 500) inkübe edildi. Süre sonunda izolatların patojen mikroorganizmalar üzerinde etki göstererek zon oluşturması beklendi.

Çizelge 3.7.3.1. Antimikrobiyal Aktivite Tespitinde Kullanılan Mikroorganizmaların Gram Özellikleri

Mikroorganizma	Gram Özelliği
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®27853	Gram (-)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC®10876	Gram (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC®25922	Gram (-)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC®14028	Gram (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25923	Gram (+)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC®13883	Gram (-)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC®7677	Gram (+)
<i>Shigella sonnei</i> ATCC®25931	Gram (-)
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC®313124	Gram (+)
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC®27729	Gram (-)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
<i>Aspergillus niger</i> ATCC®9642	-
<i>Candida albicans</i> ATCC®10231	-

4. BULGULAR

Bu çalışmada, topraktan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin tür tayinlerinin yapılabilmesi için morfolojik ve biyokimyasal testler yapıldı. Ayrıca bakterilerin tür tayinlerini yapabilmek amacıyla iki metod (vitek 2 ve toplam hücresel yağ asidi profilleri) kullanıldı. Ayrıca *Bacillus thuringiensis* türü bakteri olup olmadığının tespiti için kristal boyama tekniği kullanıldı.

Bu bakterilerin Patates böceği (*L. decemlineata*), Dev soymuk böceği (*D. micans*) larvaları ve Büyük balmumu güvesi (*G. mellonella*) larvalarına karşı insektisidal bir etkisinin olup olmadığı belirlenmeye çalışıldı.

4.1. Topraktan Alınan Bakterilerin İzolasyonu

Topraktan alınan ve saf kültür olarak elde edilen toplam 40 izolattan koloni renk ve morfolojilerine göre farklı olduğuna karar verilen 18 tanesi seçildi.

Elde edilen izolatların tür tayinlerinin yapılabilmesi için morfolojik ve biyokimyasal çalışmalar yapıldı. Ayrıca bakterilerin tür tayinlerinin birbirlerini desteklemesi amacıyla tür seviyesinde tanımlama yapan kristal boyama, Vitek 2, toplam hücresel yağ asidi profillerine göre (MIS) izolatlar tanımlandı.

4.2. İzolatların Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi

4.2.1. İzolatların Morfolojik Özellikleri

Alınan toprak örneklerinden izole edilen bakterilerden farklı olan koloniler tespit edilmiştir. Koloniler beyaz, krem veya açık sarı renklerde, geniş, dalgalı kenarlı veya dar ve küçük, düz, nokta halindedir. Bu koloniler daha sonra NA besiyerine ekilerek saf kültürler elde edilmiştir. Saf kültürler Gram boyama yöntemine uygun olarak boyanmıştır. Boyama sonucunda morfolojik olarak Gram pozitif çubuk şekilli olan bakteriler deney materyali olarak seçilmiştir.

Ayrıca *Bacillus thuringiensis* bakterisinin olup olmadığının tespiti için Kristal boyama yapılmış ve 15A, 15B ve 16A nolu izolatlarda kristal proteine rastlanmıştır.

4.2.2. İzolatların Toplam Hücresel Yağ Asiti Profilleri (MIS)

İzolatların toplam hücresel yağ asidi profillerinin belirlenmesi amacıyla Sherlock Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS) kullanıldı. Bu yöntemde öncelikle hücresel yağ asitleri saflaştırıldı. Saflaştırılan hücresel yağ asitlerine metil bağlanarak yağ asidi metil esterleri oluşturuldu. Daha sonra yağ asidi metil esterlerine hekzan bağlanarak, MIS cihazında, gaz kromatografisi yöntemiyle izolatların hücresel yağ asitlerinin cinsi, karbon sayısı, karbonlar arasındaki çift bağ sayısı, mevcut yağ asitlerinin konfigürasyonlarına göre durumları ve izolatlardaki yüzde olarak miktarları belirlendi. İzolatların hücresel yağ asidi profilleri sistem bünyesinde bulunan elektronik kütüphaneye (Microbial Identification System-Library Generation Software) karşılaştırılarak, izolatların toplam hücresel yağ asidi profillerine göre tanısı yapıldı. İzolatların hücresel yağ asidi profilleri Çizelge 4.2.2.1' de verilmiştir.

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

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

Yapılan bu çalışmada, yağ asidi profillerine göre izolatların içerdikleri yağ asitlerindeki karbon sayıları 11-20 arasında olduğu belirlendi. İzolatların toplam 62 farklı yağ asidi içerdiği tespit edildi. Tüm izolatların C 13:0 anteiso ve C 18:1 ω 9c yağ asitlerini içerdikleri belirlendi.

1A nolu izolatın içerdiği toplam hücresel yağ asiti profilinin %64,02'sini doymuş yağ asiti, %36,75'ini doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatın 38 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%15,64) 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

1B nolu izolatın içerdiği toplam hücresel yağ asiti profilinin %63,99'unu doymuş yağ asiti, %35,83'ünü doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatın 40 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%13,99) 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

2A nolu izolatin içerdiği toplam hücrenel yağ asiti profilinin %64,82'sini doymuş yağ asiti, %34,79'unu doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 31 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%18,75) 16:1 ω7c (16 C'lu omega grubunun 7. karbonunda çift bağ bulunan doymamış yağ asiti) içerdiği belirlendi.

4F nolu izolatin içerdiği toplam hücrenel yağ asiti profilinin %54,22'sini doymuş yağ asiti, %28,93'ünü doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 6 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%20,87) 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

5E nolu izolatin içerdiği toplam hücrenel yağ asiti profilinin %74,13'ünü doymuş yağ asiti, %24,72'sini doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 31 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%29,84) 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

6A nolu izolatin içerdiği toplam hücrenel yağ asiti profilinin %68,33'ünü doymuş yağ asiti, %28,69'unu doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 33 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%13,85) 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

7A nolu izolatin içerdiği toplam hücrenel yağ asiti profilinin %75,23'ünü doymuş yağ asiti, %24,78'ini doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 21 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%21,63) 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

8A nolu izolatin içerdiği toplam hücrenel yağ asiti profilinin %66,36'sını doymuş yağ asiti, %30,73'ünü doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 20 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%15,01) 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

9A nolu izolatin içerdiği toplam hücrenel yağ asiti profilinin %69,44'ünü doymuş yağ asiti, %30,36'sını doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 41 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%19,32) 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

9B nolu izolatin içerdiği toplam hücrenel yağ asiti profilinin %16,75'ini doymuş yağ asiti, %62,57'sini doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 4 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%35,55) 16:1 ω11c (16 karbonlu,

omega grubunun 11. karbonunda çift bağ bulunan tekli doymamış yağ asiti) içermesiyle diğer izolatlardan farklı bir yağ asiti içerdiği tespit edildi.

9C nolu izolatin içerdiği toplam hücrel yağ asiti profilinin %24,17'sini doymuş yağ asiti, %73,17'sini doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 14 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%31,77) 16:1 ω 9c (16 karbonlu, omega grubunun 9. karbonunda çift bağ bulunan tekli doymamış yağ asiti) içermesiyle diğer izolatlardan farklı bir yağ asiti içerdiği tespit edildi.

10A nolu izolatin içerdiği toplam hücrel yağ asiti profilinin %9,74'ünü doymuş yağ asiti, %81,30'unu doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 5 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%54,83) 13:0 2OH (13 karbonlu, α grubunun 2. karbonuna bağlı bir OH grubu bulunan doymamış yağ asiti) içermesiyle diğer izolatlardan farklı bir yağ asiti içerdiği tespit edildi.

13B nolu izolatin içerdiği toplam hücrel yağ asiti profilinin %72,40'mı doymuş yağ asiti, %27,59'unu doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 22 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%18,98) 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

14B nolu izolatin içerdiği toplam hücrel yağ asiti profilinin %74,85'ini doymuş yağ asiti, %25,15'ini doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 30 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%19,76) 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

15A nolu izolatin içerdiği toplam hücrel yağ asiti profilinin %89,06'sını doymuş yağ asiti, %10,92'sini doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 21 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%54,05) 15:0 anteiso (15 C'lu anteiso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

15B nolu izolatin içerdiği toplam hücrel yağ asiti profilinin %73,53'ünü doymuş yağ asiti, %26,47'sini doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 26 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%19,85) 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

Çizelge 4.2.2.1. (devamı) İzolatların Toplam Yağ Asit Oranları

17:1 ω9c	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17:1 anteiso ω9c	-	-	-	-	1,97	1,94	2,40	7,00	-	-	7,71	-	2,23	-	0,40	-	-	-
17:0 10-methyl	-	-	-	-	-	-	-	-	1,98	-	-	-	-	0,36	-	-	-	-
17:1 anteiso A	1,85	1,98	1,09	-	-	-	-	-	0,42	-	-	-	-	1,71	-	2,07	1,64	-
18:1 iso H	1,41	1,53	-	-	1,07	0,48	-	-	0,71	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18:3 ω6c (6,9,12)	2,20	2,01	-	-	1,59	-	-	-	0,43	-	-	-	-	0,19	-	-	0,24	-
18:1 ω9c	1,01	1,31	1,34	13,76	0,81	1,56	0,64	2,00	0,55	27,02	21,67	12,34	0,76	0,66	0,28	0,53	0,90	26,38
18:1 ω7c 11-methyl	1,95	-	-	-	-	0,66	-	-	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:4 ω6,9,12,15c	0,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:1 ω9c	1,71	1,44	-	-	1,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:1 ω7c	-	-	-	-	1,52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Dallanmış</u>																		
11:0 anteiso	-	0,19	0,18	16,85	0,51	0,29	-	2,70	0,19	20,69	2,63	8,97	-	-	-	-	-	11,16
12:0 iso	0,92	1,29	0,76	-	-	1,52	1,53	2,00	1,08	-	-	-	1,18	1,62	-	1,30	1,64	-
13:0 iso	6,88	7,64	5,31	-	0,72	8,25	8,88	6,63	6,96	-	-	-	6,29	10,46	-	7,54	11,07	-
13:0 anteiso	2,12	2,31	1,67	18,63	0,82	3,35	3,06	4,51	2,69	16,75	3,98	9,74	2,52	3,02	0,33	2,51	2,76	12,29
14:0 iso	3,93	4,97	3,60	-	1,75	3,35	6,17	6,53	5,13	-	-	-	6,20	6,49	2,71	6,11	6,41	-
14:0 anteiso	0,25	0,19	-	-	-	-	-	-	0,21	-	1,70	-	-	-	0,13	-	-	-
15:0 iso	15,64	13,99	14,54	20,87	11,73	13,58	21,63	15,01	19,32	-	3,96	-	18,98	19,76	4,20	19,85	20,37	-
15:0 anteiso	5,69	5,68	5,06	14,72	29,84	8,05	7,61	8,75	7,69	-	4,56	-	7,51	7,48	54,05	7,43	6,32	-
16:0iso	6,26	6,45	5,70	-	3,50	7,61	8,40	8,66	7,34	-	-	-	10,06	7,46	10,99	8,03	8,02	-
16:0 anteiso	1,51	1,42	-	-	1,44	0,64	-	-	0,60	-	-	-	-	0,18	-	-	0,35	-
17:0 iso	2,90	3,04	3,74	-	3,99	4,11	4,78	3,11	4,61	-	-	-	4,91	4,44	1,18	5,38	3,37	-

Çizelge 4.2.2.1. (devamı) İzolatların Toplam Yağ Asit Oranları

17:0 anteiso	3,20	3,16	1,39	-	8,40	2,65	2,10	2,46	2,43	-	-	-	2,48	1,85	6,25	2,00	1,58	-
18:0 iso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	-	-
20:0 iso	1,68	1,47	-	-	1,25	0,55	-	-	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Hydroxy</u>																		
11:0 3OH	-	-	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13:0 2OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54,83	-	-	-	-	-	17,56
14:0 iso 3OH	-	0,18	-	-	-	-	-	-	0,76	-	-	-	-	-	-	0,64	-	-
15:0 2OH	0,81	0,74	0,35	-	-	0,83	0,60	-	-	-	-	-	0,55	0,60	-	-	0,71	-
16:0 3OH	-	1,32	-	-	-	0,52	-	-	0,47	-	-	-	-	0,19	-	-	-	-
16:0 iso 3OH	-	0,71	-	-	1,17	-	-	-	0,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17:0 iso 3OH	-	-	-	-	0,56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17:0 2OH	1,16	1,24	-	-	0,93	0,37	-	-	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18:1 2OH	1,16	0,95	-	-	-	0,29	-	-	0,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18:0 3OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,41	-	-	-	-
<u>Cyc Cyclo</u>																		
17:0 cyclo	0,84	0,83	0,29	-	0,74	-	-	-	0,30	-	1,82	-	-	-	0,24	-	-	-
19:0 cyclo ω8c	-	2,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Summed Feature 1</u>																		
15:1 iso H/13:0 3OH	-	-	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,33
<u>Summed Feature 2</u>																		
12:0 aldehyde	1,58	2,50	2,41	-	-	1,38	2,06	2,26	2,42	-	-	-	1,79	2,84	-	3,75	1,76	-
<u>Summed Feature 3</u>																		
16:1 ω7c/16:1 ω6c	8,58	9,61	18,75	-	2,17	8,72	10,96	8,99	10,48	-	1,90	-	8,83	11,77	0,17	13,14	9,95	-

Çizelge 4.2.2.1. (devamı) İzolatların Toplam Yağ Asit Oranları

<i>Summed Feature 4</i> 17:1 iso I/anteiso B	-	-	-	-	1,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,85	-	-	-
<i>Summed Feature 6</i> 19:1 ω11c/19:1 ω9c	2,35	-	-	-	2,41	0,81	-	-	0,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Summed Feature 7</i> 19:1 ω7c/19:1 ω6c	0,66	0,55	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Summed Feature 8</i> 18:1 ω7c	2,32	2,46	4,03	-	2,29	0,52	-	-	0,72	-	-	-	-	0,18	-	-	-	-
Doymuş Yağ Asidi Konsantrasyonu (%)	58,78	60,48	63,73	54,22	73,06	67,85	75,23	66,36	68,31	16,75	24,17	9,74	72,40	73,14	89,06	71,46	72,66	12,29
Doymamış Yağ Asidi Konsantrasyonu (%)	40,01	39,34	35,88	28,93	25,79	29,17	24,78	30,73	31,49	62,57	73,17	81,30	27,59	26,86	10,92	28,54	27,33	83,87
TOPLAM KONSANTRASYON (%)	98,79	99,82	99,61	83,15	98,85	97,02	100,01	97,09	99,80	79,32	97,34	91,04	99,99	100,00	99,98	100,00	99,99	96,16

16A nolu izolatin içerdiği toplam hücresel yağ asiti profilinin %74,30'unu doymuş yağ asiti, %25,69'unu doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 24 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%20,37) 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içerdiği belirlendi.

17A nolu izolatin içerdiği toplam hücresel yağ asiti profilinin %12,29'unu doymuş yağ asiti, %83,87'sini doymamış yağ asitinin oluşturduğu belirlendi. Bu izolatin 6 farklı yağ asiti profiline sahip olduğu ve en fazla miktarda (%32,60) 16:1 ω11c (16 karbonlu, omega grubunun 11. karbonunda çift bağ bulunan tekli doymamış yağ asiti) içermesiyle diğer izolatlardan farklı bir yağ asiti içerdiği tespit edildi.

İzolatların yağ asiti sonuçlarına göre benzediği bakteriler Çizelge 4.2.2.2' de verilmektedir.

Çizelge 4.2.2.2. İzole Edilen İzolatların Yağ Asit İçeriklerine Göre Benzediği Bakteriler ve Oranları

İZOLATLAR	YAĞ ASİT SONUÇLARI	ORAN (%)
1A	<i>Bacillus cereus -GC subgroup B</i>	28,50
2A	<i>Shewanella-putrefaciens (algae)</i>	10,70
	<i>Bacillus cereus -GC subgroup B</i>	8,50
5E	<i>Bacillus atrophaeus</i>	41,80
6A	<i>Bacillus cereus -GC subgroup B</i>	43,70
7A	<i>Bacillus cereus</i>	79,00
8A	<i>Bacillus cereus -GC subgroup B</i>	27,10
9A	<i>Bacillus cereus -GC subgroup B</i>	69,90
13B	<i>Bacillus cereus</i>	70,10
14B	<i>Bacillus cereus</i>	69,20
15A	<i>Paenibacillus-validus</i>	51,00
	<i>Paenibacillus-polymyxa</i>	49,00
	<i>Rothia-dentocariosa</i>	41,60
	<i>Arthrobacter-globiformis</i>	32,60
15B	<i>Bacillus cereus</i>	65,60
16A	<i>Bacillus cereus</i>	65,00

Çizelge 4.2.3.1. (devamı) İzolatların Biyokimyasal Özellikleri

Methyl-A-D-Glucopyranoside acidification	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ELLMAN	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	(+)	-	-	-
METHYL-D-XYLOSIDE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALPHA-MANNOSIDASE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MALTOTRIOSE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Glycine ARYLAMIDSE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-MANNITOL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-MANNOSE	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-MELEZITOSE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PALATINOSE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-RHAMNOSE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BETA-GLUCASIDASE	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
BETA-MANNOSIDASE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PHOSPHORYL CHOLINE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PYRUVATE	+	(+)	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)	+	+	-	+
ALPHA-GLUCOSIDASE	(-)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
D-TAGATOSE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-TREHALOSE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INULIN	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-GLUCOSE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-RIBOSE	(+)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PUTRESCINE assimilation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GROWTH IN 6.5 % NaCl	-	+	-	(+)	-	-	+	-	+	-	+	+	(-)	+
KANAMYCIN RESISTANCE	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OLEANDOMYCIN RESISTANCE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESCULIN hydrolysis	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	(-)	+	+	-
TETRAZOLIUM RED	-	-	-	+	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-
POLYMIXIN_B RESISTANCE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Vitek 2 cihazı kullanılarak yapılan deneyler sonucu izolatların benzediği bakteriler ve oranları Çizelge 4.2.3.2' de verilmektedir.

Çizelge 4.2.3.2. Vitek 2 Sonuçlarına Göre İzolatların Benzediği Bakteriler ve Oranları

İZOLATLAR	Vitek 2 Sonuçları	ORANLAR (%)
1A	<i>Bacillus cereus</i>	90
	<i>Bacillus mycoides</i>	90
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	90
1B	<i>Bacillus cereus</i>	92
	<i>Bacillus mycoides</i>	92
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	92
2A	<i>Bacillus cereus</i>	89
	<i>Bacillus mycoides</i>	89
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	89
4F	<i>Bacillus cereus</i>	93
	<i>Bacillus mycoides</i>	93
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	93
6A	<i>Bacillus cereus</i>	93
	<i>Bacillus mycoides</i>	93
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	93
7A	<i>Bacillus cereus</i>	94
	<i>Bacillus mycoides</i>	94
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	94
9B	<i>Bacillus cereus</i>	94
	<i>Bacillus mycoides</i>	94
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	94
9C	<i>Bacillus cereus</i>	90
	<i>Bacillus mycoides</i>	90
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	90
10A	<i>Bacillus cereus</i>	85
	<i>Bacillus mycoides</i>	85
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	85
15A	<i>Bacillus cereus</i>	94
	<i>Bacillus mycoides</i>	94
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	94
15B	<i>Bacillus cereus</i>	86
	<i>Bacillus mycoides</i>	86
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	86
16A	<i>Bacillus cereus</i>	96
	<i>Bacillus mycoides</i>	96
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	96
17A	<i>Bacillus cereus</i>	90
	<i>Bacillus mycoides</i>	90
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	90

4.3. İzolatların İnsektisidal Etkileri

Topraktan izole edilen izolatların insektisidal etkilerinin belirlenmesi amacıyla izolatlardan hazırlanan bakteriyel numuneler *Leptinotarsa decemlineata*, *Dendroctonus micans* ve *Galleria mellonella* böceklerine uygulandı. Bu uygulamalar farklı dönemlerde yapıldı.

Laboratuarda normal şartlar altında yürütülen çalışmada *L. decemlineata* türleri için takip edilen kontrol gruplarında çok yüksek ölüm (%86-99) gözlenmesi nedeniyle sonuç elde edilemedi.

G. mellonella için yapılan bioassay çalışmalarında böceklerin 4. günün sonunda pupaya yatmaları nedeniyle net bir sonuç elde edilemedi.

D. micans için yapılan bioassay çalışmalarında, uygulama yapılan larvaların, bakteri solüsyonları enjekte edilmiş ladin kabuklarının içine iyice yerleşmeleri sağlandı. Her gün yapılan takipler ve 7. günün sonunda yapılan sayım sonuçları ortalamalarına göre elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3.1.'de verilmektedir.

Çizelge 4.3.1. İzolatlar ve Ölüm Oranları

İzolatlar	Ölüm Oranları (%)
1A	20
1B	20
2A	30
4F	30
5E	30
6A	20
7A	20
8A	40
9A	20
9B	20
9C	60
10A	50
13B	30
14B	30
15A	80
15B	70
16A	70
17A	30

4.4. İzolatların Bazı Patojenik Mikroorganizmalar Üzerindeki Antimikrobiyal Etkileri

İnkübasyon sonrası in vitro yapılan testlerde patojen mikroorganizmalar üzerine ekim yapılarak bu patojen mikroorganizmaların büyümesini inhibe edecek herhangi bir etkin madde içeriğine sahip olabilecek izolatların zon çapı oluşturmadığı görülmüştür. Test edilen izolatların patojen mikroorganizmalar üzerinde onların büyümesini engelleyici herhangi bir antimikrobiyal etkisi bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

Yapılan çalışmalarda 1A nolu izolat vitek 2 ve yağ asidi sonuçlarına göre sırasıyla %90 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine, %28,5 oranında *B. cereus* GC-subgroup B (*Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus anthracis*) bakterilerine benzemektedir. Ortaya çıkan bu sonuçlar ve insektisidal etkileri (%20) göz önünde bulundurularak bu izolatin *Bacillus cereus* türü olabileceği kanısına varıldı. Ayrıca bu izolatin en fazla miktarda 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içermesi Song ve ark. (1999)' nın yaptığı çalışmada belirtildiği gibi *Bacillus cereus* türünün yüksek miktarda iso 15:0 yağ asidi içermesi gerektiği bilgisini desteklemektedir.

1B nolu izolat yağ asidi sonuçlarına göre tanımlanamamış olup, vitek 2 sonuçlarına göre %92 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine benzetilmektedir. İsektisidal etkileri (%20) göz önüne alındığında ve en fazla miktarda iso 15:0 yağ asidi içermesi bakımından bu bakterinin *Bacillus cereus* olabileceği kanısına varıldı.

2A nolu izolat vitek 2 ve yağ asidi sonuçlarına göre sırasıyla %89 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine, %0,85 oranında *B. cereus* GC-subgroup B (*Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus anthracis*) bakterilerine benzemektedir. Bu bakteri diğer bakteri gruplarından farklı olarak en fazla miktarda 16:1 ω7c (16 C'lu omega grubunun 7. karbonunda çift bağ bulunan doymamış yağ asiti) içermektedir. Yapılan literatür taramasında bu özelliğin hangi bakteriye ait olduğu saptanamamakla birlikte insektisidal etkileri (%30) göz önüne alındığında bakterinin *Bacillus cereus* veya *Bacillus mycooides* olabileceği düşünüldü.

4F nolu izolat yağ asidi sonuçlarına göre tanımlanamamış olup, vitek 2 sonuçlarına göre %93 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine benzetilmektedir. Bu sonuç ve insektisidal etkileri (%30) göz önüne alındığında ve en fazla miktarda iso 15:0 yağ asidi içermesi bakımından bu bakterinin *Bacillus cereus* olabileceği kanısına varıldı.

5E nolu izolat Vitek 2 sonuçlarına göre tanımlanamamış olup, yağ asidi sonuçlarına göre ise %41,8 oranında *Bacillus atrophaeus* olduğu belirtilmiştir.

6A nolu izolat vitek 2 ve yağ asidi sonuçlarına göre sırasıyla %93 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine, %43,7 oranında *B. cereus* GC-subgroup B (*Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus anthracis*) bakterilerine benzemektedir. Ortaya çıkan bu sonuçlar ve insektisidal etkileri (%20) göz önünde bulundurularak bu izolatın *Bacillus cereus* türü olabileceği kanısına varıldı. Ayrıca bu izolatın en fazla miktarda 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içermesi Song ve ark. (1999)' nın yaptığı çalışmada belirtildiği gibi *Bacillus cereus* türünün yüksek miktarda iso 15:0 yağ asidi içermesi gerektiği bilgisini desteklemektedir.

7A nolu izolat vitek 2 ve yağ asidi sonuçlarına göre sırasıyla %94 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine, %79 oranında *B. cereus* bakterilerine benzemektedir. Bu yüksek oranlı sonuçlar ve insektisidal etkileri (%20) göz önünde bulundurularak bu izolatın *Bacillus cereus* türü olabileceği kanısına varıldı. Ayrıca bu izolatın en fazla miktarda 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içermesi Song ve ark. (1999)' nın yaptığı çalışmada belirtildiği gibi *Bacillus cereus* türünün yüksek miktarda iso 15:0 yağ asidi içermesi gerektiği bilgisini desteklemektedir.

8A nolu izolat Vitek 2 sonuçlarına göre tanımlanamamış olup, yağ asidi sonuçlarına göre ise %27,1 oranında *B. cereus* GC-subgroup B (*Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus anthracis*) bakterilerine benzemektedir. Ortaya çıkan bu sonuçlar ve insektisidal etkileri (%40) göz önünde bulundurularak bu izolatın *Bacillus cereus* türü olabileceği kanısına varıldı. Ayrıca bu izolatın en fazla miktarda 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içermesi Song ve ark. (1999)' nın yaptığı çalışmada belirtildiği gibi *Bacillus cereus* türünün yüksek miktarda iso 15:0 yağ asidi içermesi gerektiği bilgisini desteklemektedir.

9A nolu izolat Vitek 2 sonuçlarına göre tanımlanamamış olup, yağ asidi sonuçlarına göre ise %69,9 oranında *B. cereus* GC-subgroup B (*Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus anthracis*) bakterilerine benzemektedir. Ortaya çıkan bu sonuçlar ve insektisidal etkileri (%30) göz önünde bulundurularak bu izolatın *Bacillus cereus* türü olabileceği kanısına varıldı. Ayrıca bu izolatın en fazla miktarda 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içermesi Song ve ark. (1999)' nın yaptığı çalışmada belirtildiği gibi *Bacillus*

cereus türünün yüksek miktarda iso 15:0 yağ asidi içermesi gerektiği bilgisini desteklemektedir.

9B nolu izolat yağ asidi sonuçlarına göre tanımlanamamış olup, vitek 2 sonuçlarına göre %94 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine benzetilmektedir. Ortaya çıkan bu sonuçlar ve insektisidal etkileri (%20) göz önünde bulundurularak bu izolatın *Bacillus cereus* türü olabileceği kanısına varıldı. Ayrıca bu izolatın en fazla miktarda 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içermesi Song ve ark. (1999)' nın yaptığı çalışmada belirtildiği gibi *Bacillus cereus* türünün yüksek miktarda iso 15:0 yağ asidi içermesi gerektiği bilgisini desteklemektedir.

9C nolu izolat yağ asidi sonuçlarına göre tanımlanamamış olup, vitek 2 sonuçlarına göre %90 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine benzetilmektedir. Bu bakterinin yağ asidi profillerine göre en fazla miktarda 16:1 ω11c (16 karbonlu, omega grubunun 11. karbonunda çift bağ bulunan tekli doymamış yağ asiti) içermesiyle diğer izolatlardan farklı bir yağ asiti içerdiği tespit edildi. Yapılan literatür taramasında bu özelliğin hangi bakteriye ait olduğu saptanamamakla birlikte insektisidal etkileri (%60) göz önüne alındığında bakterinin *Bacillus cereus* veya *Bacillus mycoides* olabileceği düşünüldü.

10A nolu izolat yağ asidi sonuçlarına göre tanımlanamamış olup, vitek 2 sonuçlarına göre %85 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine benzetilmektedir. Ortaya çıkan bu sonuçlar ve insektisidal etkileri (%50) göz önünde bulundurularak bu izolatın *Bacillus cereus* türü olabileceği kanısına varıldı.

13B nolu izolat vitek 2 ve yağ asidi sonuçlarına göre sırasıyla %93 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine, %70,1 oranında *B. cereus* bakterilerine benzemektedir. Bu yüksek oranlı sonuçlar ve insektisidal etkileri (%30) göz önünde bulundurularak bu izolatın *Bacillus cereus* türü olabileceği kanısına varıldı. Ayrıca bu izolatın en fazla miktarda 15:0 iso (15 C'lu iso konfigürasyonuna sahip doymuş yağ asiti) içermesi Song ve ark. (1999)' nın yaptığı çalışmada belirtildiği gibi *Bacillus cereus* türünün yüksek miktarda iso 15:0 yağ asidi içermesi gerektiği bilgisini desteklemektedir.

14B nolu izolat vitek 2 sonuçlarına göre tanımlanamamış olup, yağ asiti sonuçlarına göre %69,2 oranında *Bacillus cereus* bakterisine benzetilmektedir.

İnsektisidal etkileri (%30) göz önüne alındığında ve en fazla miktarda iso 15:0 yağ asidi içermesi bakımından bu bakterinin *Bacillus cereus* olabileceği kanısına varıldı.

15A vitek 2 sonuçlarına göre %94 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine benzetilmektedir. Yağ asidi sonuçlarına göre ise %51 oranında *Paenibacillus-validus*, %49 oranında *Paenibacillus-polymyxa*, %41,6 oranında *Rothia-dentocariosa* ve %32,6 oranında *Arthrobacter-globiformis* bakterilerine benzetilmektedir. Ayrıca uygulanan bu yöntemlere ek olarak yapılan kristal boyama sonucu bu bakterinin yuvarlak kristal proteine sahip olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar ve insektisidal etkiler (%80) bu izolatın *Bacillus thuringiensis* olduğuna işaret etmektedir.

15B nolu izolat vitek 2 ve yağ asidi sonuçlarına göre sırasıyla %86 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine, %65,5 oranında *B. cereus* bakterilerine benzemektedir. Ayrıca uygulanan bu yöntemlere ek olarak yapılan kristal boyama sonucu bu bakterinin yuvarlak kristal proteine sahip olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar ve insektisidal sonuçlar (%70) göz önüne alındığında bu izolatın *Bacillus thuringiensis* olduğu düşünülmektedir.

16A nolu izolat vitek 2 ve yağ asidi sonuçlarına göre sırasıyla %96 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine, %65 oranında *B. cereus* bakterilerine benzemektedir. Ayrıca uygulanan bu yöntemlere ek olarak yapılan kristal boyama sonucu bu bakterinin yuvarlak kristal proteine sahip olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar ve insektisidal sonuçlar (%70) göz önüne alındığında bu izolatın *Bacillus thuringiensis* olduğu düşünülmektedir.

17A nolu bakteri yağ asidi sonuçlarına göre tanımlanamamış olup vitek 2 sonuçlarına göre %90 oranında *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* veya *Bacillus thuringiensis* bakterilerine benzemektedir. Bu bakterinin yağ asidi profillerine göre diğer bakterilerden farklı olarak en yüksek oranda 16:1ω11c içerdiği belirlenmiştir. Bu sonuç Song ve Ark. (1999)' nın yaptığı çalışmada *Bacillus insolitus* türü bakterinin bu yağ asit çeşidini içerdiğini ortaya koymasına bu bakteri olabileceğini çağırırsa da Kaneda (1991)' nın yaptığı çalışmaya göre ise *Bacillus insolitus* türü bakterinin anteiso 17:1ω9c ve 17:1ω6c yağ asidi içermemesi gerektiğini belirtilmiştir. 17A nolu izolatın ise bu yağ asitlerini de içerdiği görüldükten sonra bu bakterinin farklı bir *Bacillus* türü olabileceği düşünülmüştür.

Bacillus cinsi bakterilerin sınıflandırılmasında, aerobik, Gram-pozitif, çubuk şekilli olmaları ve endospor oluşturmaları önemli yer tutmasına rağmen, türlerin ayrımının güç olduğu ve yanlış tanımlamalar yapılabileceği bildirilmektedir. Yüksek derecede heterojenitenin standart testler ile tanımlamayı zorlaştırdığı ifade edilmektedir (Rosovitz ve ark., 1998; Priest, 1993). Cinsin sahip olduğu geniş fenotipik çeşitliliğin aynı zamanda geniş bir filogenetik dağılıma neden olduğu ve gelişmiş moleküler teknikler elde edilen kriterlerin organizmanın gruplandırılmasında esas yeri teşkil ettiği belirtilmiştir (Rosovitz ve ark., 1998).

İzole edilen birçok suşun birbiriyle karşılaştırılması, suşlar arasında ayırım geliştirmek ve suşların teşhisinin doğruluğunu ispatlamak zorunluluğunu gündeme getirmiştir. Ancak, sınıflandırma için geliştirilen morfolojik ve biyokimyasal testler ve fenotipik özellikler suşların ayırımı için yeterli olmadığından değişik yöntemler geliştirilmiştir (Bağcı ve ark., 1991).

Bacillus cereus' un tanımlanması ve *B. cereus* ile yakın olan türlerin ayırımı biyokimyasal testler ile yapılmaktadır. Ancak *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. mycoides* türlerinin birbirinden ayırımı biyokimyasal testler ile tam olarak yapılamamaktadır. Bu nedenle bu bakterilerin 16S rRNA genleri incelenmelidir.

Ribozomal RNA genleri (rRNA) (16S, 23S ve 5S) bakterilerde yüksek derecede korunmuş bölgelerdir. Özellikle de 16S rRNA genleri bakteri türleri arasında filogenetik yakınlığın belirlenmesi için oldukça sık kullanılmaktadır (Rainey ve ark., 1994).

16S rRNA dizi analizinin tür ya da cins seviyesinde bilinmeyen bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılması için kesin bir yöntem olduğu düşünülmektedir (Siefert ve ark., 2000).

Bununla birlikte Katı (2011)' nin yaptığı bir çalışmada aynı izolata ait bir bakteri suşunun Vitek 2, yağ asidi profilleri (MIS) yöntemi ve 16S rRNA genleri moleküler tanımlama yöntemlerine göre çıkan sonuçları karşılaştırıldığında her birinde farklı tür bakteri tanımlandığı görülmüştür. Bu yüzden daha da ayrıntılı çalışmalar yapmak gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Uygulanan biyolojik mücadele çalışmalarıyla uyumlu çalışabilecek hatta ona alternatif olabilecek bir mikrobiyal mücadele ajanının geliştirilmesi amacıyla yapılan bu çalışmada Ordu ili ve ilçelerinden alınan farklı toprak numunelerinden izole edilen 18 adet *Bacillus* suşunun morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyonu yapılmış ve bu izolatların Coleoptera takımına ait yaprak böceğigiller Chrysomelidae familyasından olan *Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera takımına ait Scolytidae familyasından *Dendroctonus micans* ve Lepidoptera takımına ait Pyralidae familyasından olan *Galleria mellonella* tarım zararlısı böcek grupları üzerinde herhangi bir insektisidal etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca izolatlara antimikrobiyal aktivite testleri yapılmıştır.

Bakterilerin tanı çalışmalarında tür tayininde rutin olarak kullanılan morfolojik ve biyokimyasal özelliklerin dışında, son yıllarda bakterilerin tür tayinlerinin doğru bir şekilde yapılabilmesi için flüoresan temelli yeni bir teknoloji olan Vitek 2 sistemi (bioMérieux) ve toplam hücresel yağ asidi profillerine göre bakterilerin tanımlanması (MIS) yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca *Bacillus thuringiensis* türü bakteri olup olmadığının anlaşılması için bakterilere Kristal boyama tekniği uygulanmıştır.

Çalışmamızda *Bacillus* izolatlarının biyolojik aktiviteleri Coleoptera takımına ait Chrysomelidae familyasından olan *Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera takımına ait Scolytidae familyasından *Dendroctonus micans* ve Lepidoptera takımına ait Pyralidae familyasından olan *Galleria mellonella* larvaları üzerinde yapılan denemelerle belirlenmeye çalışılmıştır. Denemeler üçlü tekrar grupları şeklinde yedi gün süresince yapılmıştır. Larvalar üzerinde yapılan deneme sonuçları kontrol suşları ile karşılaştırılarak her bir izolatın ortalama ölüm oranları belirlenmiştir.

İzole edilen bakterilerin *Leptinotarsa decemlineata* ve *Galleria mellonella* böcekleri üzerine olan patojenik etkilerinin test edilmesi için farklı zamanlarda uygulanan bioassay çalışmalarından sonuç elde edilememiştir. Böceklerin yaşamaları için ortam şartlarının elverişli olamaması ve kontrol grubunda görülen yüksek ölüm bu çalışmaların yapılabilmesini engellemiştir. Katı (2011) tarafından *Xylosandrus germanus*'dan izole edilen bakterilerden mikrobiyal mücadele ajanı geliştirmek için yapılan bioassaylerde de benzer nedenlerden dolayı insektisidal aktivite belirlenememiştir.

Bacillus izolatlarının biyolojik aktiviteleri Coleoptera takımına ait *Dendroctonus micans* larvaları üzerinde yapılan denemelerle belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda 1A nolu izolatta %20 oranında ölüm, 1B nolu izolatta %20 oranında ölüm, 2A nolu izolatta %30 oranında ölüm, 4F nolu izolatta %30 oranında ölüm, 5E nolu izolatta %30 oranında ölüm, 6A nolu izolatta %20 oranında ölüm, 7A nolu izolatta %20 oranında ölüm, 8A nolu izolatta %40 oranında ölüm, 9A nolu izolatta %30 oranında ölüm, 9B nolu izolatta %20 oranında ölüm, 9C nolu izolatta %60 oranında ölüm, 10A nolu izolatta %50 oranında ölüm, 13B nolu izolatta %30 oranında ölüm, 14B nolu izolatta %30 oranında ölüm, 15A nolu izolatta %80 oranında ölüm, 15B nolu izolatta %70 oranında ölüm, 16A nolu izolatta %70 oranında ölüm, 17A nolu izolatta %30 oranında ölüm gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise %5 oranında ölüm gözlenmiştir.

Antimikrobiyal aktivitelerinin tespiti için yapılan çalışmada patojen mikroorganizmalar üzerine ekim yapılarak patojen mikroorganizmaların büyümesini inhibe edecek herhangi bir etkin madde içeriğine sahip olabilecek izolatların zon çapı oluşturmadığı görülmüştür. Test edilen izolatların patojen mikroorganizmalar üzerinde onların büyümesini engelleyici herhangi bir antimikrobiyal etkisi bulunmamıştır.

Yapılan birçok çalışmada; bakterilerin antibakteriyel etkilerinin çoğunlukla içerdikleri etkili maddelerden ileri geldiği ve etkili maddeyi oluşturan bileşiklerin miktarının bakteriden bakteriye değişiklik gösterdiği, ayrıca bu bileşiklerin etkinliklerinin bakterinin türü, izole edildiği yer veya organizma türüne bağlı olarak değişebildiği belirtilmektedir (Bastaban, 2008).

Bacillus cinsi bakterilerde plazmit DNA izolasyonu ve teşhisine dayalı çalışmalara olan ilgi artmaktadır. Özellikle *Bacillus* suşlarının antibiyotiklere direnç özelliği taşıyan plazmitler buldurması, rekombinant DNA çalışmalarında vektör olarak kullanılabilmesi şansını artırmış ve birçok çalışma için aranılan türler olmalarına neden olmuştur (Tanaka ve ark., 1977; Yoshimura ve ark., 1983).

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde tarım alanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olan zararlı böcekler ile mücadele kullanılan kimyasal ilaçların ekosistemde meydana getirmiş olduğu zararlı etkiler nedeniyle alternatif yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerin en önemlisi de biyolojik mücadeledir. Biyolojik mücadelede bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar ve protozoa grubuna ait organizmalar biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında toprak grubu bakteriler en çok gelecek vaat eden biyolojik kontrol ajanlarıdır. Özellikle

Bacillus grubu bakteriler önemli bir yer teşkil ederler. Biyolojik mücadelede kullanılan mikroorganizmaların %90' ını *Bacillus thuringiensis* oluşturmaktadır (Öztürk, 2007).

Bu çalışmada denenen bakteri suşlarından bazılarının, önemli bir ladin zararlısı olan *Dendroctonus micans*' a karşı biyolojik ajan olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu bakterilerin tespit edilmesi ve geliştirilmesi üzerine çalışmalar yoğunlaştırılmalı ve bu çalışmalar desteklenmelidir. Toprak grubu *Bacillus* bakterilerini tür seviyesinde Vitek 2 ve yağ asidi profillerinde tanımlamada çektiğimiz zorlukları göz önünde bulundurarak bu izolatların 16S rRNA genlerinin de detaylı olarak çalışılması kanısındayız. Böyle organizmaların izole edilip geliştirilerek zararlılar ile mücadelede kullanılmasının gelecek nesilleri tehdit eden kimyasalların kullanılma oranlarını azaltacağı düşüncesindeyiz. Bu sayede zararlı böceklere karşı mücadelede kullanılabilecek insektisidal aktivitesi yüksek, etkin, güvenilir ve ülkemize ait biyolojik kontrol ajanlarının oluşturulması yolunda adımlar atılmış olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, W. S., 1925. A Method of Computing of Effectiveness of on Insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265–267.
- Agaisse, H., Lereclus, D., 1995. How does *Bacillus thuringiensis* Produce so much Insecticidal Crystal Protein?, J. Bacteriol., 177, 6027-6032.
- Anonim, 2003. T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü, 2003-2004 Çam Kese Böceği ile Mücadele Eylem Planı, Ankara, 32.
- Aronson, A. L., 1993. Two Faces of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins and Post-Exponential Survival, Mol. Microbiol., 7, 489-496.
- Ayvaz, A., 2001 “Un güvesi, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae) ve yumurta parazitoidi *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera Trichogrammatidae)' un bazı biyolojik özellikleri üzerine gamma radyasyonunun etkileri”, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Eğitimi, Ankara, 5.
- Bağcı, H., Shareef, S. R., Özdamar, K., 1991. “*Bacillus thuringiensis* varyetelerinin sınıflandırılmasında sayısal taksonomi uygulanması”, Doğa Tr. J. of Biology, 5:70-81.
- Barrow, G.I., Feltham, R.K.A., 1993. Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria. Cambridge Uni. Pres, United Kingdom, 333.
- Bastaban, B., 2008, “Botanik Pestisit Kingbo Ve Fungusit Vegard'ın Bitki Patojeni Bakteri Ve Fungus Türleri Üzerine Etkilerinin In Vitro ve In Vivo Koşullarda Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 61.
- Becker, N., Margalit, J., 1993. Use of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* Against Mosquitoes and Black Flies, 145-170, In “*Bacillus thuringiensis*, on Environmental Biopesticides: Theory and Practise”, (Entwistle, P. F., Cory, P. F., Bailey, M. J. ve Higgs, S., Eds.), J. Willey and Sons, New York.
- Beegle, C. C., Yamamoto, T., 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research and Development, Can. Entomol., 124, 587-616.
- Benson, H. J., 1985. Microbiological Applications, a Laboratory Manuel in General Microbiology, Brock, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.

- Bernhard, K., Jarnett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D. J., Roberts, G. M., Paull, S., Rodgers, P., Burges, H. D., 1997. Naturel Isolated of *Bacillus thuringiensis*: Worlwide Distribution, Characterization and Activity Against Insect Pests, J. Invertebr. Pathol., 70, 59-68.
- Black, R., Sweetmore, A., 1994. Appropriate Bacterial Identification Systems for Small Plant Pathology Laboratories Overseas Incorporating the Biolog Method, Plant Pathol., 43, 438-441.
- Braxton, S. M., Onstad, D. W., Dockter, D. E., Giordano, R., Larsson, R., Humber, R. A., 2003. Description and Analysis of two Internet-Based Databases of Insect Pathogens: EWDIP and VIDIL, J. Invertebr. Pathol., 83, 185-195.
- Brooks, W. M., 1988. Entomogenous Protozoa, In "Handbook of Natural Pesticides", Vol. V: "Microbial Insecticides, Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi" (Ignoffo, C. M. ve Mandava, E. D., Eds.), 1-149, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Burges, H. D., 1981. Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980, Academic Press, London.
- Buyer, J.S., 2002. Identification of Bacteria from Single Colonies by Fatty Acid Analysis, Journal of Microbiological Methods, 48, 259-265.
- Bülbüloğlu Ö., "Çeşitli toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus thuringiensis*' lerin izolasyonu, karakterizasyonu ve insektisidal etkilerinin belirlenmesi", 2000. Yüksek Lisans Tezi, KTU Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 11.
- Cappuccino, J. G., Sherman, N., 1992. Microbiology, a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York.
- Carlton, B., 1988. Development of Genetically Improved Strains of *Bacillus thuringiensis*, In "Biotechnology for Crop Protection", (Hadin P., Mann, J., Hollingworth, R., Eds.), American Chemical Society, Washington, D.C., 279.
- Chang, Y. H., Shangkuan, Y. H., Lin, H. C., Liu, H. W., 2003. "PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells" , Applied and Enviromental Microbiology, 69 (8): 4502-4510.
- Charles, J. F., Nielsen-Leroux, C., Delecluse, C., 1996. *Bacillus sphaericus* Toxins: Molecular Biology and Mode of Action, Ann. Rev. Entomol., 41, 451-472.
- Chattopadhyay, A., Bhatnaga, N.B., Bhatnagar, R., 2004 "Bacterial Insecticidal Toxins", Critical Reviews in Microbiology, 30

- Çanakçioğlu, H., 1989. Orman Entomolojisi, Genel Bölüm, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
- Çökmüş, C., Younsten, 1994. A. A., "Characterization of *Bacillus sphaericus* strains by SDS-PAGE" Journal of Invertebrate Pathology, 64: 276-268.
- Demirbağ, Z., Beldüz, A. O. 1997. Baculovirüs'ün Biyolojik Mücadeledeki Önemi. *Kükem Dergisi*, 20 (1) : 49–58.
- Dunfield, K.E., Xavier, L.J.C., Germida, J.J., 1999. Identification of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium sp.* (Cicer) Strains Using a Custom Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Profile Library, Journal of Applied Microbiology., 86, 78-86.
- Dursun, E., 2000. Meme Aşınmasının Pülverizasyon Karakteristiklerine Etkileri. *Ekin Dergisi*, 6, 21.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları , 27, Samsun.
- Ertürk, Ö., 2006. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia*. Volume 61, 3, 275-278.
- Evans, H. F., 1986. Ecology and Epizootiology of Baculoviruses, In "The Biology of Baculoviruses, Vol 2, Practical Application for Insect Control" (Granados, R. R. ve Federici, B. A., Eds.), 89-132, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Feitelson, J. S., 1993. The *Bacillus thuringiensis* Family Tree, In "Advanced Engineered Pesticides", (Kim, L., Ed.), Marcel Dekker. Inc., New York, 63-71.
- Feitelson, J. S., Payne, J., Kim, L., 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insect and Beyond, *Bio/Technology*, 10, 271-275.
- Gamo, M., Shoji, T., 1999. A Method of Profiling Microbial Communities Based on a Most-Probable-Number Assay that Uses Biolog Plates and Multiple Sole Carbon Sources, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4419-4424.
- Gaugler, R., 1997. Alternative Paradigms for Commercializing Biopesticides, *Phytoparasitica*, 25, 179-182.
- Gaugler, R., Lewis , E., Stuart , R. J 1997. Ecology in the service of biological control: The case of entomopathogenic nematodes .*Oecologia*, 109, 483-489.
- Georgis, R., 1997. Commercial Prospects of Microbial Insecticides in Agriculture, In "Microbial Insecticides: Novelty or Necessity?" (Evans, H. F., Chair), Proc. Br. Crop. Prot. Council Symp., 68, 243-252.

- Hamm, J. J., 1984. Invertebrate Pathology and Biological Control, Journal of Georgia Entomol. Soc., 19, 3, Second Supplement, 6-13.
- Hansen, B. M., Damgaard, P. H., Eilenberg, J., Pedersen, J. C., 1998. Molecular and Phenotypic Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Leaves and Insects, J. Invertebr. Pathol., 71, 106-114.
- Hougard, J. M., 1990. Formulations and Persistence of *Bacillus sphaericus* in *Culex quiquefasciatus* Larval Sites in Tropical Africa, In "Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies: Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*" (de Barjak, H. ve Sutherland, D., Eds.), 295-306, Rutgers Univ. Press, New Brunswick.
- Höfte, H., Whiteley, H. R., 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*, Microbiol. Rev., 53, 242-255.
- http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dendroctonus_micans_larva.jpg, (01.09.2010).
- http://tr.wikipedia.org/wiki/Patates_b%C3%B6ce%C4%9Fi, (13.11.2011).
- http://www.bahcesel.com/forumsel/zirai-mucadele-ilaclari/12427-zararli_bocekler/, (20.05.2010).
- <http://www.natuur-wereld.be/natuur/insecten/kevers/coloradokever.php>, (15.09.2011).
- http://www.springhalen.dk/foderdyr_salg_eng.htm, (15.09.2011).
- <http://zoology.fns.uniba.sk/poznavacka/Insecta2.htm>, 15.09.2011
- Ishiwata, S., 1901. On a kind of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho*, 114, 1-5 (in Japanese).
- Kampfer, P., 1995. "An efficient method for preparation of extracts from Gram-Positive bacteria for comparison of cellular protein patterns", Journal of Microbiological Methods, 21: 55-66.
- Kaneda, K., 1991. Iso- and Anteiso-Fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Function, and Taxonomic Significance, Canada, p. 288-302.
- Karri S., Martinez V.A., Coimbatore G., 2010. Effect of Dihydrotestosterone On Gastrointestinal Tract Of Male Alzheimer's Disease Transgenic Mice., Indian Journal of Experimental Biology, 453-465.
- Katı, A., *Xylosandrus germanus* (Blandford) (Coleoptera: Curculionidae)' dan İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması, İnsektisidal ve Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi, 2011, Yüksek Lisans, Giresun Üniversitesi, Giresun, 75 s.

- Kaya, H. K., 1976. Insect Pathogens in Natural and Microbial Control of Forest Defoliators, In "Perspectives in Forest Entomology" (Anderson, J. F. ve Kaya, H. K., Eds.), 251-263, Academic Press, New York.
- Klein, M. G., Jackson, T. A., 1992. Bacterial Diseases of Scarabs, In "Use of Pathogens in Scarab Pest Management" (T.A. Jackson, T. A. ve Glare, T. R., Eds.), 43-61, Intercept, Andover.
- Klein, M. G., Kaya H. K., 1995. *Bacillus* and *Serratia* Species for Scarab control, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 90, 87-95.
- Knowles, B. H., 1994. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal δ -Endotoxin, In "Advances in Insect Physiology", 24, (Evans, P. D., Ed.), 275-308, Academic Press, London.
- Konopka, A., Oliver, L., Turco, R. F., 1998. The Use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Environmental and Ecological Microbiology, Microb. Ecol., 35, 103-115.
- Korkmaz, M., Topraktan İzole Edilen Bazı *Streptomyces decemlineata* (Say, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) Ergin ve Larvalarına İnsektisidal Etkileri, 2007. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun 45s.
- Lacey, L. A., 1997. Bacteria: Laboratory Bioassays of Bacteria Against Aquatic Insects with Emphasis on Larvae of Mosquitoes and Black Flies, In "Manual of Techniques in Insect Pathology (Lacey, L. A., Ed.), 79-88, Academic Press, New York.
- Lacey, L. A., Fransen, J. J., Carruthers, R., 1996. Global Distribution of Naturally Occurring Fungi of *Bemisia*, Their Biologies and Use as Biological Control Agents, In " *Bemisia*, 1995: Taxonomy, Biology, Damage and Management" (Gerling, D. ve Mayer, R., Eds.), 9, 401-433, Intercept, Andover.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., Vail, P., 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?, Biol. Control, 21, 230-248.
- Lacey, L. A., Kaya, H. K. , 2000. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evolution of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Lacey, L. A., Undeen, A. H., 1986. Microbial Control of Black Flies and Mosquitoes, Ann. Rev. Entomol., 31, 265-296.

- Latgé, J. P., Papierok, B., 1988. Aphid Pathogens, In “Aphids: Their Biology, Natural Enemies and Control” (Minks, A. K. and Harrewijn, P., Eds.), Vol. B, 323-335, Elsevier, Amsterdam.
- Lelliot, R., Stead, D., 1978. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants, Method in Plant Pathology, 2, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 216s.
- Lipa, J. J., 1975. An Outline of Insect Pathology, Warsaw, Poland.
- Maddox, J. V., 1987. Protozoan Diseases, In “Epizootiology of Insect Diseases” (Fuxa, J. R., Tanada, Y., Eds.), 417-452, Wiley, New York.
- McCoy, C. W., Samsun, R. A., Boucias, D. G., 1988. Entomogenous Fungi, In “Handbook of Natural Pesticides, Vol 5: Microbial Insecticides, Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi”, (Ignoffo, C. M. and Mandava, N. B., Eds.), 151-236, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Miller, L., Berger, T., 1985. Bacteria Identification by Gas Chromatography of Whole Cell Fatty Acids, 1-8, In “Hewlett-Packard Application Note, 228-241.”, Hewlett-Packard, Avondale, Pa.
- National Research Council, 1984. Subcommittee on Insect Pest, Insect Pest Management and Control, Washington, 150-155.
- Nicolas, L., Regis, L. N., Rios, E. M., 1994. Role of The Exosporium in The Stability of The *Bacillus sphaericus* Binary Toxin, FEMS Microbiol. Lett., 124, 271-276.
- Nielsen-Leroux, C., Pasquier, F., Charles, J. F., Sinigre, G., Gaven, B., Pasteur, N., 1997. Resistance to *Bacillus sphaericus* Involves Different Mechanism in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Larvae, J. Med. Entomol., 34, 321-327.
- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 8, Isparta.
- Ombui, J. N., Mathenge, J. M., Kimotho, A. M., Macharia, J. K., Nduhiu, G., 1996. “Frequency of antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from milk”, East African Medical Journal, 73 (6): 380-384.
- Özer, M., 1961. Arı Kovanlarında Önemli Zarar Yapan Balmumu Güvesi (*Galleria mellonella* L.) ‘nin Morfoloji, Biyoloji ve Yayılışı Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Ankara, 10 s.
- Özgür, A. F., 1990. “Depolanmış ürün zararlıları”, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, 23: 38-40.

- Öztürk, F., 2007. "Ankara'daki topraklardan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması, moleküler düzeyde tiplendirilmesi ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi" . Doktora tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 145 s.
- Peter, G., 1984. Plant Pests and Their Control, Fenemore, London.
- Pincus, D. H., 2002. Microbial Identification Using The Biomérieux Vitek 2 System, Biomérieux Inc., Hazelwood, MO, USA.
- Poinar, G.O., Petersen JJ., 1978. *Drilomermis leioderma* n. gen., n. sp. (Mermithidae:Nematoda) parasitizing *Cybister fimbriolatus* (Say) (Dystiscidae-Coleoptera), Journal of Nematology, p:10(1):20-3.
- Priest, F. G., 1993. "*Bacillus*, Biotechnology, Biological Fundamentals" , Vol. 1, by edited Sahm H., Wiley-Vch Verlag Gmbh, Weinheim, 1267-1280
- Rainey, F. A., Fritze, D., Stackebrandt, E., 1994. "The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis" , FEMS Microbiol. Lett. 115: 205-212.
- Rao, D. R., Mani, T. R., Rajendran, R., Joseph, A. S., Gajanana, A., Reuben, R., 1995. Development of a High Level of Resistance to *Bacillus sphaericus* in a Field Population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India, J. Am. Mosq. Control Assoc., 11, 1-5.
- Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I., Chambliss, G. H., 1998. "*Bacillus*, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology", 9nd Edition, Volume 2, by edited Collier L., Balows, A. and Susman, M., Oxford University Pres, New York, 709-730.
- Sasser, M.S., 1990. Identification of by Gas Chromotography of Cellular Fatty Acids, Technical Note 101, Newark, DE, Microbial ID Inc.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., Deon, D. H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Proteins, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 775-806.
- Siefert, J. L., Larios-Sanz, M., Nakamura, L.K., Slepecky, R.A., Paul, J.H., More, E.R., Fox, G.E., Jurtshuk Jr., P., 2000. "Phylogeny of marine *Bacillus* isolated from Gulf of Mexico" , Curr. Microbiol. 41:84-88.
- Seigel, J. P., 2001. The Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis*-Based Insecticides, J. Invertebr. Pathol., 77, 13-21.

- Selmi, E., 1998. Türkiye Kabuk Böcekleri ve Savaşı. İ.Ü.Yayın No. 4042, İ.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü Yayın No. 11, İstanbul, 196 s.
- Sharif, F. A., Alaeddinoğlu, N. G., 1988, “ A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*”. Journal of Industrial Microbiology, 3, 227-229.
- Smith, R. F., 1980. “Consideration on safety of certain biological agents for arthropod control”, Bull WHO, 48: 685-698.
- Sneath, A.P., 1986. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 2, Sneath, A.P., Mair, N.S., Sharge, M.S. ve Holt, J.G., Williams and Wilkins, Baltimore
- Song, Y., Yang, R., Guo, Z., Zhang, M., Wang, X., Zhou, F., 1999. Distinctness of spore and vegetative cellular fatty acid profiles of some aerobic endospore-forming bacilli, China, 17 s.
- Swiecicka, I., 2001. “Protein Profile and Biochemical Properties of *Bacillus circulans* Isolated from Intestines of Small Free-living Animals in Poland”, Folia Microbiologica, 42 (2): 165-171.
- Şahin, F., 2003. Moleküler Tanı Yöntemleri, 2003 Biyoinformatik-I Lisansüstü Yaz Kursu Kitabı, 6. Bölüm (Telefoncu, A., Küfrevioğlu, İ. ve Pazarlıoğlu, N., Eds.), Ege Üniv. Basımevi, İzmir.,
- Tanada, Y., Kaya, H. K., 1993. Insect Pathology, Academic Press, New York.
- Tanaka, T., Kuroda, M., Sakaguchi, K., 1977. “Isolation and characterization of four plasmids from *Bacillus subtilis*” , Journal of Bacteriology, 129 (3): 1487-1494.
- Ünal, G., 1998. Zirai Mücadele İlaçları Toksikolojisi ve Çevre, Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü Seminer Notları, Ankara.
- Verweij, P.E., IM Breuker, A.J Rijs, 1999. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. Journal of Clinical Pathology, 52:271–273.
- Wipat, A., Harwood, CR, 1999. “The *Bacillus subtilis* Genome Sequence: The Molecular Blueprint of a Soil Bacterium”, FEMS Microbiology Ecology, 28:1-9.
- Woods, S. A., Elkinton, J. S., 1987. Biomodal Patterns of Mortality from Nuclear Polyhedrosis Virus in Gypsy Moth (*Lymantria dispar*) Populations, J. Invertebr. Pathol., 50, 151-157.
- World Health Organization, 1999. The Inter Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, “Environmental Health Criteria 217-Microbial Pest Control Agent *Bacillus thuringiensis*”,1-125.

- Yaman, M., Demirbağ, 1998. Z., “Biyolojik Ajanların İnsektisidal Etkilerini Belirleme Yöntemleri”, Ekoloji Çevre Dergisi, 29 (8): 11-14.
- Yılmaz, H., 2004, *Dendroctonus micans*'ın Bakteriyal Florası ve Mikrobiyal Mücadele Ajanlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Trabzon.
- Yoshimura, K., Yamamoto, O., Seki, T., Oshma, Y., 1983. “Distrubition of heterogenous and homologous plasmids in *Bacillus* spp.”, Applied and Enviromental Microbiology, 46 (6): 1268-1275.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu Odabaş

Doğum Yeri : Fatsa

Doğum Tarihi : 01.01.1986

Medeni Hali : Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Fatsa Anadolu Lisesi, 2001-2004

Lisans : Karadeniz Teknik Üniversitesi, 2005-2009

Yüksek Lisans : Ordu Üniversitesi, 2009-2011

İletişim Bilgileri: dyguodabas@hotmail.com