

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**SİVRİSİNEK MÜCADELESİ İÇİN YENİ**

***BACILLUS* FORMÜLASYONLARININ**

**GELİŞTİRİLMESİ**

**Elif IŞIKÇI**

**Tez Danışmanı : Prof.Dr. Rengin ELTEM**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu : 612.01.00**

**Sunuş Tarihi : 27.06.2014**

**Bornova-İZMİR**

**2014**

Sayın **Elif IŞIKÇI** tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan **“Sivrisinek Mücadelesi İçin Yeni *Bacillus* Formülasyonlarının Geliştirilmesi”** başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 27.06.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof.Dr. Rengin ELTEM

Raportör Üye : Prof. Dr. Murat ELİBOL

Üye : Doç. Dr. Evrim ÖZKALE

İmza



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Sivrisinek Mücadelesi İçin Yeni *Bacillus* Formülasyonlarının Geliştirilmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

27 / 06 / 2014

Elif IŞIKÇI

ÖZET

**SİVRİSİNEK MÜCADELESİ İÇİN YENİ *BACILLUS*  
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

IŞIKÇI, Elif

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Rengin ELTEM

Haziran, 2014, 106 sayfa

Önemli insan hastalıklarında taşıyıcı olan böceklerin kontrolünde kimyasal böcek öldürücülerin kullanılması, çoğunlukla patojen olmayan yararlı böcekleri de öldürmekte ve zararlı böcekleri de bu ilaçlara karşı dirençli hale dönüştürmektedir. Belli böcek türleri için oldukça spesifik olarak etki edebilen *Bacillus thuringiensis* delta endotoksinleri (*Cry* proteinleri), bu amaç doğrultusunda hem zirai uygulamalarda hem de sivrisinek mücadelesinde son yarım yüzyıldır kullanılmaktadır.

Çalışmamızda öncelikle sivrisinek mücadelesinde kullanılan *Bacillus thuringiensis* ile *Bacillus sphaericus* türlerine ait yeni suşların izolasyonu yapılmıştır ve daha sonra izolatların toksin proteini içerip içermediği belirlenmiştir. Bu amaçla Ege Bölgesi'nden değişik habitatlardan alınan toprak ve su örneklerinden asetatlı seçilim yöntemi ile 1097 adet olmak üzere toplam **1574** adet izolat elde edilmiştir. Faz kontrast mikroskobu kullanılarak incelenebilen 850 adet izolatın toksin proteini içerdiği gözlenmiştir. Toksin protein ürettiği belirlenen izolatların 160 tanesi, *Culex sp.* larvaları üzerinde biyolojik etkinlik testlerinin yapılabilmesi için laboratuvar ölçeğinde üretilmiştir. Laboratuvar ölçeğinde üretimler için T3, NY (NutrientYeast) ve NYSM (NutrientYeast Salt Medium) ortamları ile denemeler yapılmış ve denemeler sonucunda NYSM ortamının en uygun üretim ortamı olduğuna karar verilmiştir. Biyolojik etkinlik testleri sonucunda yüksek biyolarvasidal aktivite (%85.33) gösterdiği saptanan **30-2** kodlu izolatın laboratuvar ölçeğinde üretimi için bazı parametrelerin

## VIII

optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon işlemi için Design-Expert 9.0.0 programı ile RSM analizi yapılmış, deney tasarımı olarak, merkezde 6 tekrarı içeren  $2^3$ -tam faktöriyel merkezi kompozit tasarımı (" $2^3$ -full factorial central composite design, CCD") uygun bulunmuştur. Optimizasyon sonucunda 30-2 kodlu izolatın en iyi ürediği koşullar pH: 6,76, karbon kaynağı oranı (%) : 1,70 ve inokulum miktarı (%) : 4,68 olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu izolat için 5 günlük üretim süresinin uygun olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoinsektisit, Sivrisinek, *Bacillus*, İzolasyon, Biyolarvasidal etkinlik.

**ABSTRACT****DEVELOPING NEW *BACILLUS* FORMULATIONS FOR  
CONTROL OF MOSQUITOS**

IŞIKÇI, Elif

MSc in Bioengineering Department

Supervisor : Prof. Dr. Rengin ELTEM

June 2014, 106 pages

Chemical pesticides proved to be valuable tools for controlling insect vectors in the fight against infectious human diseases. However, despite their potential benefits chemical pesticides also have detrimental impacts on the environment. These include encouraging the development of pesticide resistant insect vectors and the wiping out of useful, non-pathogenic insects. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins (Cry proteins) can be highly selective towards specific insect species therefore, these proteins confer a great advantage both in agricultural applications and in fighting against mosquitoes. The use of Bt endotoxins as biopesticides were developed in the last half of this century and they have been in use ever since.

Our study primarily focused on the isolation of new strains from *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* species. With this aim in mind, various soil and water samples taken from different habitats in the Aegean Region in Turkey were analyzed. 1097 isolates of 1574 isolates were obtained by the acetate selection method. Toxin protein content of 850 isolates were determined with phase contrast microscope. 160 isolates containing toxin protein were used to produce lab scale quantities of endospores and toxin proteins. T3, NY (NutrientYeast) and NYSM (Nutrient Yeast Salt Medium) media were compared and NYSM medium was determined for the best production medium. As a result of the biolarvacidal activity test of strains, it was determined that the *Bacillus sp.* 30-2 coded isolate had high biolarvacidal activity (85.33%). Afterwards, some

parameters of *Bacillus sp.* 30-2 were optimized for producing lab scale. Design Expert 9.0.0 programme was used for RSM analysis and  $2^3$ -full factorial central composite design, CCD was found suitable for optimization. Optimum conditions were determined as pH: 6.76, carbon source ratio (%) : 1.70 and inoculum ratio (%) : 4.68 at the end of optimization studies. In addition optimum time for production was determined as 5 days.

**Keywords:** Bioinsecticide, Mosquito, *Bacillus*, Isolation, Biolarvicidal activity.

## TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgilerini ve vaktini her zaman bana sunan, zor zamanlarımda yanımda olan kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Rengin ELTEM'e;

Her zaman bana karşı sonsuz sevgi ve şefkat sunan, bana güvenen ve güven veren, hayattaki en değerli varlığım olan Annem ve Babama;

Akademik hayata dair yol almamda beni cesaretlendiren Abime;

Hayatımın her anında yanımda olan ve sabırla beni destekleyen Hüsni KOCA'ya;

Başta laboratuvar arkadaşlarım olmak üzere yardımlarından dolayı yeri doldurulamayacak arkadaşlarıma ve sevgili stajyerlerime;

Çalışmalarına maddi ve manevi katkılarından dolayı Biyokim Haşere Kontrol Hizmetleri Sanayi Ticaret Limited Şirketi'nden Sayın Alişan GÜLDOĞAN ve Ahmet Mülküt SARIGÜL'e;

Zorlu günlerimde yanımda olan Hocalarım Yrd. Doç. Dr. İmran GÖKER ve Yrd. Doç. Dr. Dilek Göksel DURU'ya;

ve tüm "Biyomühendislik Bölümü Ailesi"ne teşekkürlerimi sunarım.

Elif İŞIKÇI

İzmir, 2014





## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	VII
ABSTRACT .....	IX
TEŞEKKÜR .....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	XIX
KISALTMALAR.....	XXI
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Sivrisineklerin Neden Olduğu Hastalıklar .....	3
2.2 Sivrisineklere Karşı Yürütülen Kontrol Programları.....	6
2.3 <i>Bacillus</i> Genusu .....	9
2.3.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	9
2.3.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> .....	10
2.3.3 <i>Bacillus sphaericus</i> .....	12
2.4 <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> ve <i>Bacillus sphaericus</i> Bakterilerinin Etki Mekanizması.....	14
2.5 <i>Bacillus sphaericus</i> ve <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> Uygulamalarının Kalıcılık Süresine Etki Eden Faktörler.....	16
2.6 Dünya'da ve Türkiye'de Sivrisinek Mücadelesi İçin Biyoinsektisit Geliştirmek Üzere <i>Bacillus spp.</i> ile İlgili Yürütülen Bilimsel Çalışmalar .....	17
2.7 <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Üretimi ve Biyolojik Etkinliğinin Ölçülmesi .....	18
2.8 Biyoinsektisit Kullanımındaki Kısıtlamalar .....	19
2.9 Biyoinsektisit Kullanımının Geleceği .....	21
3. MATERYAL VE METOT .....	24
3.1 Materyal.....	24
3.1.1 Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar .....	24
3.1.2 Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kimyasallar .....	24
3.1.3 Kullanılan cihazlar.....	29
3.2 Metot.....	31
3.2.1 <i>Bacillus</i> ların izolasyonu.....	31

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> ve <i>Bacillus sphaericus</i> suşlarının tanımlanması.....	34
3.2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> ve <i>Bacillus sphaericus</i> suşlarının laboratuvar ölçeğinde üretilmesi .....	40
3.2.4 Laboratuvarıda Biyolarvasit biyolojik etkinlik testleri .....	42
3.2.5 Biyoreaktör Denemesi.....	44
3.2.6 Laboratuvar ölçeğinde seçilen <i>Bacillus</i> izolatının endospor üretiminin optimizasyon çalışmaları .....	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	48
4.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> ve <i>Bacillus sphaericus</i> Suşlarının İzolasyon Çalışması.....	48
4.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> ve <i>Bacillus sphaericus</i> Suşlarının Tanımlanması.....	51
4.2.1 Işık mikroskobu ve faz kontrast mikroskobu incelemeleri .....	51
4.2.2 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM).....	55
4.2.3 Biyokimyasal testler.....	56
4.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> ve <i>Bacillus sphaericus</i> Suşlarının Laboratuvar Ölçeğinde Üretilmesi.....	65
4.3.1 Sporlanma ve toksik protein üretimini teşvik eden ekonomik bir “üretim ortamı” belirlenmesi .....	66
4.3.2 Üretim ortamlarında endospor sayısının belirlenmesi .....	71
4.4 Laboratuvarıda Biyolarvasit Biyolojik Etkinlik Testleri.....	76
4.5 Biyoreaktör Denemesinin Sonuçları .....	79
4.6 Optimizasyon Çalışması .....	80
4.6.1 Üretim süresinin belirlenmesi çalışması .....	81
4.6.2 RSM oluşturma .....	82
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	89
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	92
ÖZGEÇMİŞ .....	103

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1 Malarya hastalığının vücuttaki döngüsü.....	3
2.2 <i>Anopheles</i> türüne ait bir sivrisinek .....	4
2.3 <i>Plasmodium falciparum</i> plasmodiumunun vücuttaki döngüsü .....	5
2.4 <i>Plasmodium vivax</i> plasmodiumunun vücuttaki döngüsü.....	5
2.5 a) <i>Culex pipiens</i> ; b) <i>Culex quinquefasciata</i> .....	6
2.6 DDT ve kimyasal pestisit kullanımı .....	8
2.7 <i>Bacillus thuringiensis</i> ve <i>Bacillus petri</i> görüntüsü .....	10
2.8 <i>Bacillus thuringiensis</i> genusuna ait faz kontrast mikroskobu görüntüsü.....	11
2.9 <i>Bacillus thuringiensis</i> bakterisine ait sporlanma döngüsü.....	11
2.10 <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> bakterisine ait görüntü .....	12
2.11 A. Rekombinant <i>Bacillus sphaericus</i> 2297 (pcyt1A1) suşunun hücre lizisi sonrası elektron mikroskobu görüntüsü, B. <i>Bacillus sphaericus</i> 2297'nin spor kristalinin elektron mikroskobu görüntüsü, C. Rekombinant 2297 (pMK3) suşuna ait saflaştırılmış inkuluzyon cisimciklerinin görüntüsü 200 nm). S: spor; Cry: Kristal .....	13
2.12 <i>Bacillus sphaericus</i> 2297 ve <i>Bacillus sphaericus</i> 2297 (pBB544-trP42A) suşlarına ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.....	14
2.13 <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> ve <i>Bacillus sphaericus</i> bakterilerinin etki mekanizması.....	15
2.14 <i>Bacillus</i> kristal proteinlerinin etki mekanizması .....	16
2.15 Sağlık Bakanlığı tarafından sivrisinek mücadelesi kapsamında kullanılmak üzere ruhsatlandırılmış mikrobiyal preparat ürünleri .....	22
3.1 Toprak ve su örneklerinden <i>Bacillus thuringiensis</i> ve <i>Bacillus sphaericus</i> türlerinin asetatl seçim yöntemiyle izolasyon şeması .....	34
4.1 <i>Bacillus</i> ların izolasyonunda faydalanan doğal kaynakların çeşitlerine göre izole edilen izolat sayısı.....	50
4.2 Su örneklerinden Şekil 3.1'deki yöntemle izole edilen çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına ait faz kontrast mikroskobunda boyanmamış endospor ve ucunda koyu mavi renkli boyanmış toksin proteini.....	52

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	<u>Sayfa</u>
4.3 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına ait faz kontrast mikroskobu görüntüleri .....	53
4.4 Su örneklerinden şekil 3.1'deki yöntemle izole edilen çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına ait SEM mikroskobunda endospor ve toksin Proteini.....	56
4.5 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına uygulanan şeker fermantasyonu testinin sonuçları-I.....	60
4.6 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına uygulanan şeker fermantasyonu testinin sonuçları-II.....	60
4.7 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına uygulanan nitrat indirgenme testinin görsel sonuçları.....	63
4.8 B-1-11 izolatına ait NY ve NYSM ortamlarında 4 günlük üretim sonucu alınan canlı sayıları (kob/ml) .....	68
4.9 B-2-18 izolatına ait NY ve NYSM ortamlarında 4 günlük üretim sonucu alınan canlı sayıları (kob/ml) .....	69
4.10 B-2-8 izolatına ait NY ve NYSM ortamlarında 4 günlük üretim sonucu alınan canlı sayıları (kob/ml).....	69
4.11 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarının NYSM ortamında üretim sonucu alınan spor sayım sonuçları.....	70
4.12 Seçilen <i>Bacillus</i> izolatının NYSM ortamında üretim sonucu alınan sayım sonuçları.....	71
4.13 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına uygulanan biyolojik etkinlik testinin görsel Sonuçları.....	79
4.14 Optimizasyon çalışmasında süre belirleme çalışmasının sonuçları.....	81
4.15 Tasarımın response için ANOVA tablosu.....	84
4.16 Optimizasyon için hata dağılım grafiği.....	85
4.17 Deney setine ait pertürbasyon grafiği.....	86
4.18 Respons için faktörler arası etkileşimler.....	87
4.19 RSM çözüm önerileri.....	88

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1 Sağlık Bakanlığı Tarafından Ruhsatlandırılmış <i>Bacillus</i> içerikli Biyoinsektisitler .....	22
3.1 Çalışmamızda kullanılan numunelerin kaynakları ve kodları .....	32
3.2 <i>Bacillus thuringiensis sub. israelensis</i> ve <i>Bacillus sphaericus</i> türlerinin ayırt edilmesinde kullanılan biyokimyasal testler .....	36
4.1 Park ve ark., <i>Bacillus</i> türlerine yönelik izolasyon çalışmasında kullandığı Kaynaklar.....	50
4.2 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına uygulanan nişasta fermantasyon testinin Sonuçları .....	58
4.3 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına uygulanan gliserol fermantasyon testinin Sonuçları.....	59
4.4 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına uygulanan glukozfermantasyon testinin Sonuçları.....	59
4.5 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına uygulanan tirozin hidroliz testinin sonuçları .....	61
4.6 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına uygulanan nitrat indirgenme testinin sonuçları ..	63
4.7 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına uygulanan anaerobik kültürleme testinin sonuçları.....	65
4.8 T-2-20 ve 3-K-S-45 izolatlarının T-3 ortamında üretiminden elde edilen spor sayım sonuçları .....	67
4.9 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarının NYSM ve NY ortamlarında üretim sonuçları....	67
4.10 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarının NYSM ortamında 4 gün süren üretimlerinin sonuçları.....	68
4.11 T-2-20 izolatının NYSM ortamında üretiminden elde edilen spor sayım sonuçları.....	70
4.12 Biyolojik etkinlik testi denenen/denenecek çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına ait spor sayıları.....	73
4.13 Çeşitli <i>Bacillus</i> izolatlarına uygulanan biyolojik etkinlik testlerinden alınan sonuçlar.....	78
4.14 Optimizasyon çalışmasında süre belirleme çalışmasının sonuçları.....	81
4.15 RSM faktörlerinin çalışma aralıkları.....	83



**KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
<b>BM</b>	Biyolojik Mücadele
<b>Bt</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>Bti</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i>
<b>Bs</b>	<i>Bacillus sphaericus</i>
<b>CCD</b>	Merkezi kompozit tasarımı (central composite design)
<b>Cry, Cyt</b>	$\delta$ endotoksin, kristal proteinler
<b>DDT</b>	dikloro difenil trikloroethan
<b>IBMA</b>	Uluslararası Biyoajan Üreticileri Derneği
<b>RSM</b>	Yanıt yüzey metodu (response surface methodology)
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>TEM</b>	Geçirimli Elektron Mikroskobu



## 1. GİRİŞ

Tarımda bitki zararlısı böcekler ile önemli insan hastalıklarında taşıyıcı (vektör) durumdaki böceklerin kontrolünde kimyasal böcek öldürücülerin kullanılması ile başarıya ulaşılmıştır. Ancak bu kimyasal böcek öldürücülerin kullanılması beraberinde bir çok problemi de getirmiştir (Bravo et al., 2011). Kimyasal böcek öldürücüler, çoğunlukla patojen olmayan böcekleri de öldürmekte ve zararlı böcekleri de bu kimyasal böcek öldürücü ilaçlara karşı dirençli hale dönüştürmektedirler. Üstelik bu kimyasalların yanlış ve dikkatsiz bir biçimde kullanımları sonucu, yılda 3 milyon insan zehirlenmektedir (United States Environmental Protection Agency, 2008; Avisar et al., 2009).

Biyolojik Mücadele (BM) en basit haliyle “doğal düşmanlar (predatörler, parazitoidler, mikrobiyal etmenler vb.) kullanılarak, hastalık ve zararlı popülasyonlarının baskı altına alınması” olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir tanımla da genel anlamda zararlı bir organizmanın sayısının ya da normal koşullarda görülen zarar verici etkisinin azaltılması için canlı bir organizmanın kullanılması olarak tanımlanmaktadır. Mevcut bilgilere göre Biyolojik Mücadele'nin yeryüzünde yaşamın başladığı M.Ö. 500 milyon yıl öncesinden beri var olduğu kabul edilmektedir.

Biyolojik savaşın popüler duruma gelmesi temelinde pestisit kullanımının yarattığı doğal denge bozulmasının, sağlık sorunlarının, çevre kirlenmesinin ve pestisitlere karşı giderek yaygınlaşan bağışıklık sorununun yattığı bilinmektedir. Kısaca belirtmek gerekirse, biyolojik savaş kimyasal savaşın yarattığı olumsuzluklardan güç almaktadır. Biyolojik Mücadele'de 3 farklı yöntem kullanılmaktadır: a) Biyolojik yöntemler (Parazitoidler, Predatörler, Patojenler); b) Biyoteknik Yöntemler (Sarı-Mavi Yapışkan Tuzaklar, Feromen Tuzaklar, Işık Tuzakları, Su Tuzakları); c) Mikrobiyolojik Yöntemler (Funguslar, Bakteriler, Virüsler).

Mikrobiyolojik Mücadele etmenlerinden biri olan bakteriler biyokontrol ajanı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholdria*, *Pseudomonas*, *Pantoea* (*Erwinia*), *Streptomyces*, *Serratia* genuslarına ait türler en fazla çalışılmış bakteri türleridir (Haggag, 2002).

*Bacillus thuringiensis* bilimsel olarak çok fazla ilgi çeken bir biyokontrol ajanı olup çöksayıda tarımsal uygulamalarda ve sivrisinek mücadelesinde kullanılan bir bakteridir. *Bacillus thuringiensis* (Bt), sporlanmış hücrelerinin sitoplazmasında kristal proteinlerin varlığı ile bilinen endospor oluşturabilen bir bakteri türüdür. Bu kristalin içindeki proteinler, böcekler için toksiktirler, bu özellikleri de onların biyolojik olarak böcek öldürücü olarak kullanılmasına imkanvermektedirler. Bu bakteri ve alt türleri, çok çeşitli böcek konakçılarını hatta nematotları bile öldürebilme özelliğine sahiptir (Maagd et al., 2001). *B.thuringiensis* türü *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki*, ve *B.thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* gibi 60 farklı alt türe ayrılmaktadır. Ayrıca, 260 endotoksin protein sekansı “Cry Nomenclature Web Page”de listelenmiştir (Schallmeyer et al., 2004). Cry proteinleri, böcek sınıflarından olan Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera ve de nematotlara karşı aktiftirler (Avisar et al., 2009). Bu gruplar, Lepidoptera (kelebek ve güve), Diptera (sinek ve sivrisinekler), Coleoptera (kım kanatlılar ve ekin/buğday biti) ve Hymenoptera (eşek arısı, arı) olarak belirlenmiştir. Kristal toksinlerin az bir kısmı ise böcek olmayan türler grubunda yer alanlara, örneğin nematotlara karşı aktivite gösterirler. (Maagd et al., 2001).

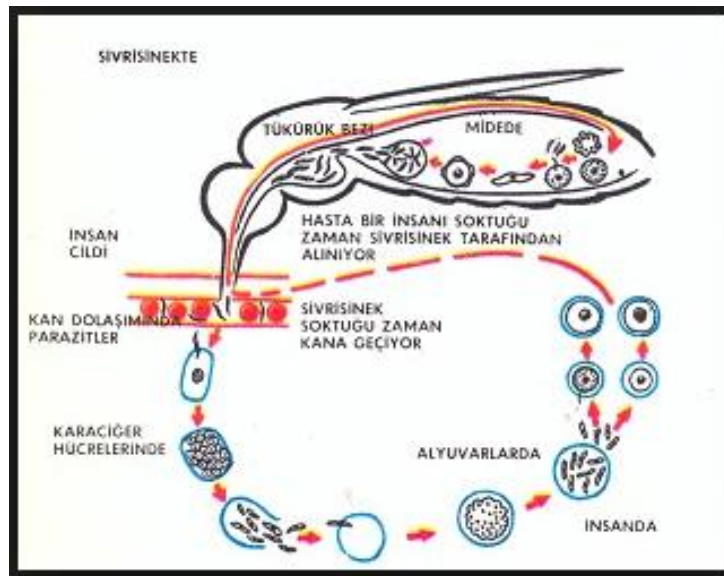
Çalışmamızın en önemli amaçlarından biri sürdürülebilir bir çevre için sürdürülebilir sivrisinek mücadelesinin sağlanmasıdır. Sürdürülebilir mücadelenin en önemli ögesi ise canlı olması sebebiyle ortamda çoğalarak yaşamını devam ettirmesi ve doğaya uyum sağladığında sürekli bir denge unsuru olması nedeniyle *Biyolojik Mücadele Ürünleridir*. Bu sebeple çalışmamızda; sivrisinek mücadelesinde etkinliği yüksek olan, çevrede birikim oluşturmeyen, mücadele sırasında biyoçeşitliliğe zarar vermeyen suşların izolasyonu amaçlanmıştır. Bu sayede seçilen suşlarla yapılacak üretimler sonucunda yüksek derişimde endospor ve toksin proteini içeren biyokütle üretimi yapılarak biyolarvasit etkinliği yüksek olan, çevreyle dost biyolojik preparat üretiminde kullanılacak suşların kazanımı hedeflenmiştir. Tez kapsamında planlanan sivrisineklere karşı etkinliği kanıtlanmış yerel ve biyoinsektisit özellikli *Bacillus* suşlarının eldesi ve laboratuvar ölçeğinde üretiminin yapılabildiğinin gösterilmesiyle başarı sağlanmış olacaktır. Çalışma sonucunda İzmir ve çevresinden toplanan toprak ve su örneklerinden izole edilmiş özgün potansiyel *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarından oluşan büyük bir koleksiyonun kazanımı hedeflenmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Sivrisinekler, bulaşıcı hastalıklara aracılık eden canlılar arasında biyolojik potansiyelleri en yüksek olan vektörler arasındadır. İnsanla birlikte sıcakkanlı ve soğukkanlı birçok hayvan grubundan kan emmelerinin yanı sıra, Dünya üzerinde kutuplar hariç her kıtada, hemen hemen tüm zoocoğrafik bölgelerde bulunmaları, hızlı üremeleri, çok sayıda verimli yumurta oluşturabilme yetenekleri, aktif uçucu olmaları ve larva evrelerinin çok geniş bir yaşama alanına hoş görüşü olması gibi nedenlerle bu canlılar ayrıcalıklı bir konuma gelmiştir. Dünyada 3357, yurdumuzda ise 67 sivrisinek türü bulunmaktadır (Alten ve Çağlar, 1998).

### 2.1 Sivrisineklerin Neden Olduğu Hastalıklar

Sivrisinekler insan ve hayvanlara yaklaşık 120 çeşit hastalık etmenini bulaştırmaktadır. Sivrisineklerin insan ve hayvan vücudunda oluşturdukları etkilerin başında sokma aktivitesiyle oluşan yanma, ödem ve alerjik durumlar gelmektedir. Günümüzde bilinen ve sayıları sürekli artış gösteren 182 arboviral (eklembacaklılar aracılığı ile bulaşan virüsler) enfeksiyondan 147'sine sivrisinekler vektörlük yapmaktadır. Sivrisinekler Sıtma (Malaria), Sarı Humma (yellow fever), Dank Humması (denque) ve Filarya (Filariasis) olmak üzere dört önemli hastalığın vektörlüğünü yapmaktadırlar.



Şekil 2.1 Malarya hastalığının vücuttaki döngüsü (<http://www.nkfu.com/sir-ronald-ross-ve-sitma-hastaligi/>)

Her yıl yaklaşık 300 milyon kişi sıtmadan etkilenmektedir (Poopathi and Abidha, 2010). Ayrıca sivrisinekler mekanik olarak tularemi ve frambozi hastalıklarını da bulaştırmaktadırlar.

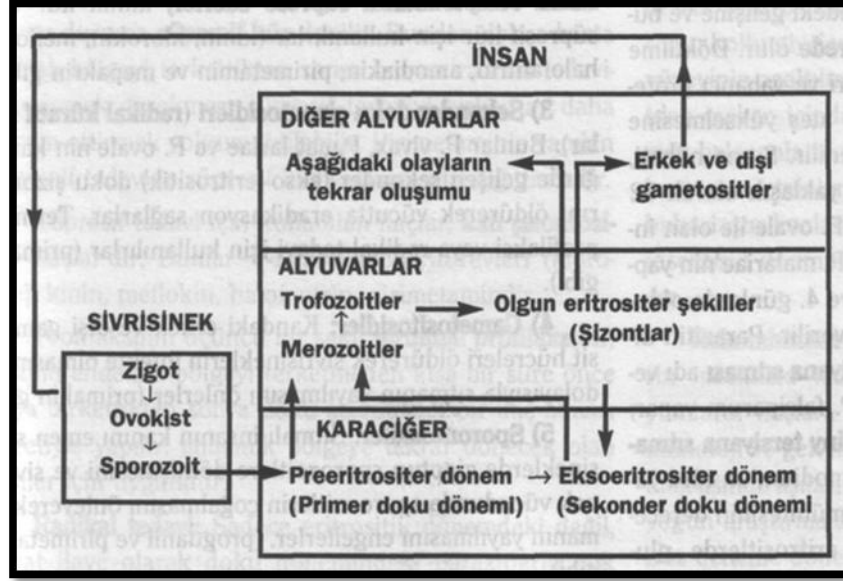
Sivrisineklerin rol oynadığı hastalıklar grubuna ılıman iklimlerde daha çok görülen Batı Nil Virüsü olarak bilinen “West Nile Virus” de dahil edilmiştir. 1999’dan bu yana, Fransa ve Amerika’nın da dahil olduğu batı yarım kürede sıklıkla görülmektedir. 2002’de Amerika Birleşik Devletleri’de bu hastalıktan ötürü 3475 vaka tespit edilmiş ve 201 ölüm vakası yaşanmıştır ki bu oran daha önceki yıllara göre ölümlerde % 200’lük artışı ifade etmektedir (Poopathi and Abidha, 2010). Dünyanın en önemli bulaşıcı hastalıklarından biri olan sıtma ülkemiz açısından da büyük bir sorundur (Şekil 2.1). Hastalığın etmeni olan *Plasmodium* türleri, sadece *Anopheles* türü sivrisineklerin dişileri tarafından insanlara bulaştırılmaktadır (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2** *Anopheles* türüne ait bir sivrisinek

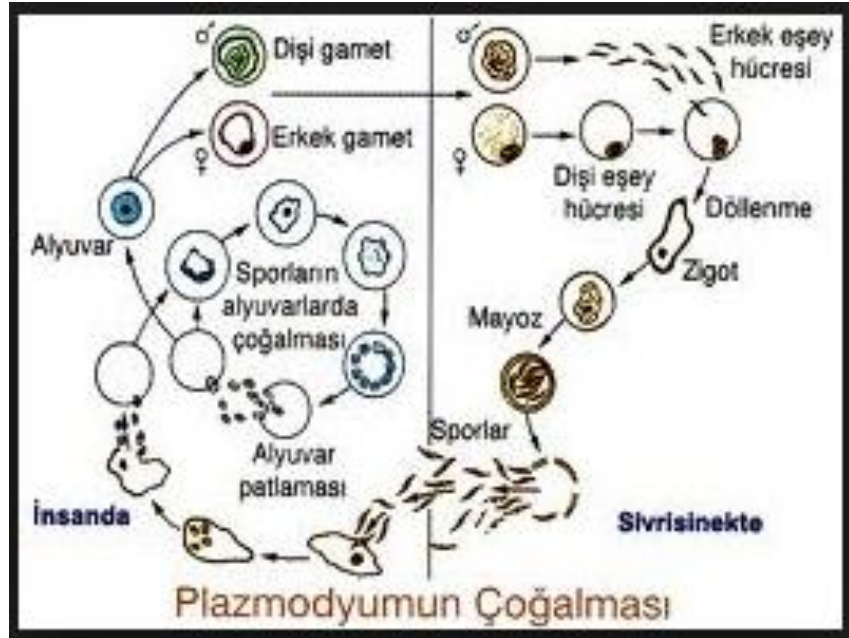
(<http://aramel.free.fr/INSECTES15-3.shtml>)

Dünya genelinde Vivax, Malariae, Ovale ve Falciparum olmak üzere dört tip sıtma enfeksiyonu tespit edilmiştir. *Plasmodium falciparum* insan plasmodiumları arasında en tehlikeli olanıdır ve yetersiz tedavi sonucunda insanlar ölüme götürebilmektedir (Şekil 2.3).



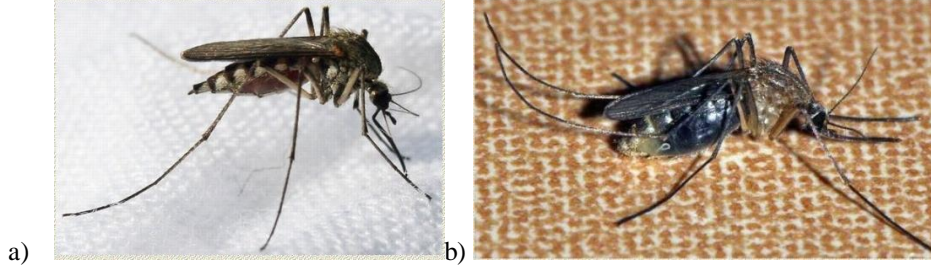
Şekil 2.3 *Plasmodium falciparum* plasmodiumunun vücuttaki döngüsü (<http://okulsel.net/docs/index-150634.html>)

Yurdumuzda görülen sıtma vakalarına *Plasmodium vivax* türü neden olmaktadır. Şekil 2.4'te döngüsü görülen öldürücü olmayan bu tür insanları yıpratmakta ve iş gücü kaybına neden olmaktadır.



Şekil 2.4 *Plasmodium vivax* plasmodiumunun vücuttaki döngüsü (<http://mail-grubu.com/shared/resources/22828,omurgasizlar/71010,sunumlar>)

Hızlı nüfus artışının getirdiği sosyo-ekonomik dengesizlik ve insan göçleri sonucunda sıtma hastalığı yurdumuzda kontrol altına alınması gereken ciddi bir sorun haline gelmiştir (Alten ve Çağlar, 1998). Ayrıca yurdumuzun Ege ve Akdeniz kıyı şeridinde baskın sivrisinek türü olan *Culex pipiens*, Fil Hastalığı'na (Elephantiasis) neden olan *Wuchereria bancrofti* mikroflaryanın en önemli vektörlerindedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 a) *Culex pipiens*; b) *Culex quinquefasciata* (<http://aramel.free.fr/INSECTES15-3.shtml>)

## 2.2 Sivrisineklere Karşı Yürütülen Kontrol Programları

Günümüzde giderek artan küresel ısınma sonucunda gerçekleşen iklimsel değişiklikler sivrisineklerin yayılım alanlarını genişletmekte ve sivrisineklerin insanlar üzerinde oluşturduğu riskin boyutlarını arttırmaktadır. Bu riskin ortadan kaldırılması için çeşitli kontrol programları uygulanmaktadır. Kontrol programları çerçevesinde yapılacak mücadele yönteminin niteliği, canlılar arasındaki doğal denge açısından büyük önem taşımaktadır.

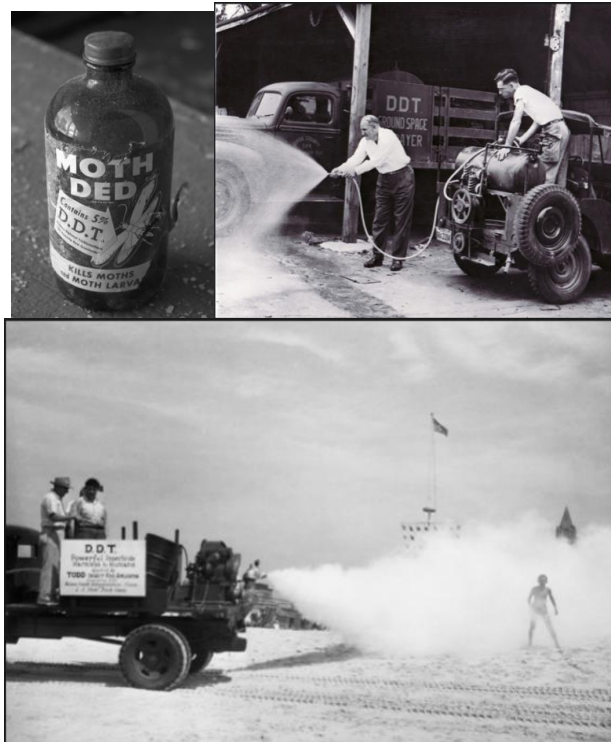
Dünya genelinde zararlı böceklerle karşı kullanılan savaşım yöntemleri; *mekanik mücadele* (bataklıkların kurutulması, akarsuların ıslahı, çeşitli tuzakların kullanımı), *kimyasal mücadele* (insektisitlerin kullanımı) ve *biyolojik mücadele* (steril erkeklerin doğaya salınımı, böceklerin kendi hormonlarını kullanımı, kitin sentez inhibitörlerinin kullanımı, parazit, parazitoid ve predatör kullanımı) olmak üzere üç grupta toplanabilir.

Kimyasal mücadele yöntemleri, maliyetin düşük oluşu, uygulama kolaylığı ve çok uzun süre kalıcı etki göstermesi gibi özellikleri nedeni ile dünyanın birçok ülkesinde uzun yıllar boyunca tercih edilen yöntem olmuştur.

Ancak pestisitlerin zararlarının insan sağlığı ve evre açısından tehlikeli boyutlara varması üzerine pek çok ülke ve kuruluş soruna titizlikle eğilirken, ülkemizde konuya gereken önem verilmemektedir.

Pestisitlerin yaygın olarak kullanılmasından kısa süre sonra 1950’li yıllarda önce DDT (dikloro difenil trikloroethan)’nin daha sonrada kullanılan diğer ilaçların insanlar ve hedef olmayan canlılara zararlı etkileri ortaya konmaya başlanmıştır (şekil 2.6-a).

Kullanılan pestisitler yüzey ve yer altı sularına bulaşmakta ve toprakta birikmektedirler. Doğada birikim sonucunda besin zincirine dahil olan kimyasallar, hedef dışı organizmaları etkilemektedir. Bunun yanında aynı kimyasal maddenin uzun süreli kullanımı ile savaşılan zararlı organizmalarda seleksiyon sonucu dirençli popülasyonlar ortaya kmaktadır. Bu olay sonucunda daha yüksek oranda kimyasal kullanımı veya daha etkili maddelerin kullanımı gerekmektedir (şekil 2.6-b). Böylece doğada biriken kimyasal madde miktarı sürekli olarak artmaktadır.



**şekil 2.6-a** DDT kullanımı (<http://www1.umn.edu/ships/pesticides/background.htm>; <http://www.audubonmagazine.org/articles/conservation/ddt-here-stay>; <http://organic-center.org/hot-science/great-grandparents-exposure-to-ddt-may-affect-your-weight/>)



Şekil 2.6-b Kimyasal insektisit kullanımı <http://foto.internetara.com/?a=insektisit&id=352228>)

Kimyasal mücadelenin getirdiği tüm bu olumsuzluklar sebebiyle, dünyanın birçok ülkesinde biyolojik mücadelenin önemi anlaşılmış ve bu doğrultuda yapılan çalışmalar sonucunda sivrisinek kontrolünde *Bacillus thuringiensis subs. israelensis* (Bti) ve *Bacillus sphaericus* (Bs) bakterilerinin biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabilecekleri farkedilmiştir. Sivrisinek larvaları üzerine öldürücü etki gösteren bu bakteriler minimum çevresel riskleri, hedef türe spesifik oluşları ve yüksek etki oranı gibi özellikleri ile sivrisinek kontrol çalışmalarında kullanılan pestisitlerin alternatifi olarak görülmektedirler. Aynı zamanda bu bakterilerin sporlarını ve toksinlerini içeren ticari formülasyonların uzun raf ömürleri ve kolay uygulama koşulları sayesinde, günümüzde dünyanın birçok ülkesinde sivrisineklere karşı yapılan kontrol çalışmalarında *Bacillus sphaericus* ve *Bacillus thuringiensis subs. israelensis* bakterileri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Cry proteinleri, böcek öldürücü aktiviteleri ile geniş bir spektrumdaki böceklere karşı etkili olmakla birlikte birkaç familya için özellikle toksin özellik taşırlar. Bu gruplar, Lepidoptera (kelebek ve güve), Diptera (sinek ve sivrisinekler), Coleoptera (kım kanatlılar ve ekin/buğday) ve Hymenoptera (eşek arısı, arı) olarak belirlenmiştir.

Kristal toksinlerin az bir kısmı ise böcek olmayan türler grubunda yer alanlara, örneğin nematodlara karşı da aktivite gösterirler.



## 2.3 Biyokontrol Ajanı Olarak *Bacillus* Genusu

*Bacillus* cinsi bakteriler, geniş metabolik aktiviteye sahip oluşu, izolasyonunun kolaylığı, üretiminde kompleks besi ortamına ihtiyaç duymaması ve kısa sürede gelişimi vb. nedenlerden dolayı araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bitki hastalıklarının kontrolünde kullanılan kimyasal insektisit ve pestisitlerin yarattığı çevre kirliliği ve patojen dirençliliği, patojene özgü doğal bakteriyel antagonist ajanlarla biyolojik kontrol sağlamanın önemini ortaya çıkarmıştır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003). *Bacillus* bakterileri bu açıdan ciddi potansiyele sahiptirler ve bitki hastalıklarını baskılayan birçok metabolit üretirler.

Son yıllarda kimyasal mücadelenin insan ve hayvan sağlığı ile çevre üzerindeki olumsuz etkileri her geçen gün daha iyi anlaşılmaktadır. Buna bağlı olarak, tarımsal üretimde kimyasal pestisitlerin kullanımını azaltan veya yasaklayan yeni tarım politikalarının (organik tarım ve sürdürülebilir tarım) geliştirilmesi ile tarımsal savaş stratejileri içerisinde biyolojik mücadele oldukça fazla ilgi görmeye başlamıştır. Bu nedenle, özellikle gelişmiş ülkelerde biyolojik kontrol ajanlarının tespiti ve bu ajanların değişik çevre şartlarına adaptasyonu, sera ve tarla şartlarında etkinlikleri, uzun vadeli depolama ve taşıma şartlarına dayanıklı formülasyonların geliştirilmesi üzerine çok sayıda bilimsel çalışmalar yapılması dikkat çekmektedir (Şahin vd., 2013).

*Bacillus thuringiensis*'in insanlara, faydalı böceklerin çoğuna ve diğer canlılara toksik etkisinin olmaması nedeniyle, geleneksel insektisitlerin meydana getirdiği çevre ve sağlık sorunlarına neden olmamaktadır. Genetik mühendisliğindeki son gelişmeler ile *Bacillus thuringiensis* genlerinin pamuk, tütün ve domates gibi önemli ürünlere ve bitkilerde yaşayan ve patojenik olmayan bazı bakterilere nakledilmesi ayrıca farklı konukçu spektrumuna sahip yeni ırkların geliştirilmesi bu bakterinin önemini oldukça artırmıştır (Tuncer ve Ecevit, 1994).

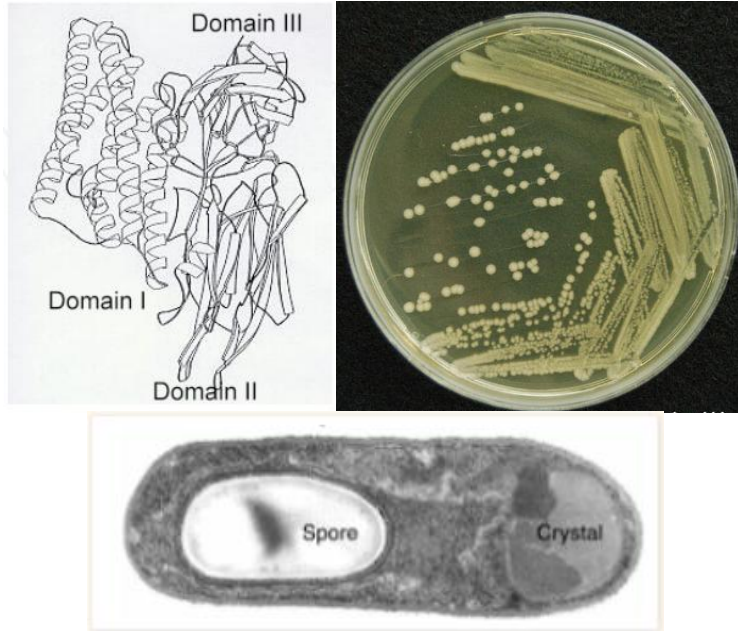
### 2.3.1 *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* (Bt), fakültatif anaerobik, gram-pozitif bakterilerdir. Bt ilk olarak 1901 yılında Japonya'da hastalıklı ipek böceği larvalarından izole edilmiştir. Bt bakterileri uygun olmayan koşullarda elipsoidal sporlar ve karakteristik parasporal kristaller ( $\delta$ -endotoksin) oluştururlar (Şekil 2.9).

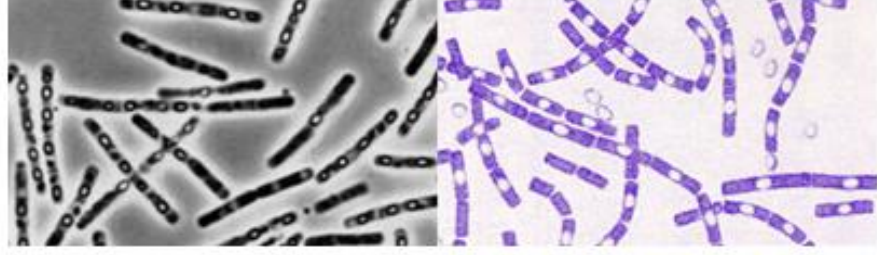
Bu kristaller birçok böcek türü üzerinde öldürücü etki gösterirler (Şekil 2.7). Bt kristalleri bipiramidal, kübik, yassı veya bunların birleşimi şeklindedir (Doğaroğlu, 2008).

*Bacillus thuringiensis* bilimsel olarak ilgilenilen ve büyük tarımsal uygulamaları olan bir bakteri türüdür (Şekil 2.8). Bu bakteri ve alt türleri çok çeşitli böcek konakçılarını hatta nematotları bile öldürebilme özelliğine sahiptir; ancak her suş, yüksek özgüllük gösterir. Bu ise, bakterinin sporlanması sırasında ürettiği kristal proteinleri ile açıklanabilmektedir (Maagd et al., 2001). Cry proteinleri, böcek öldürücü aktiviteleri ile geniş bir spektrumdaki böceklere karşı etkili olmakla birlikte birkaç familya için özellikle toksin özellik taşırlar. Bu gruplar, Lepidoptera (kelebek ve güve-butterflies and moths), Diptera (sinek ve sivrisinekler, flies and mosquitoes), Coleoptera (kım kanatlılar ve ekin/buğday biti-beetles and weevils) ve Hymenoptera (eşek arısı, arı –wasps and bees) olarak belirlenmiştir.

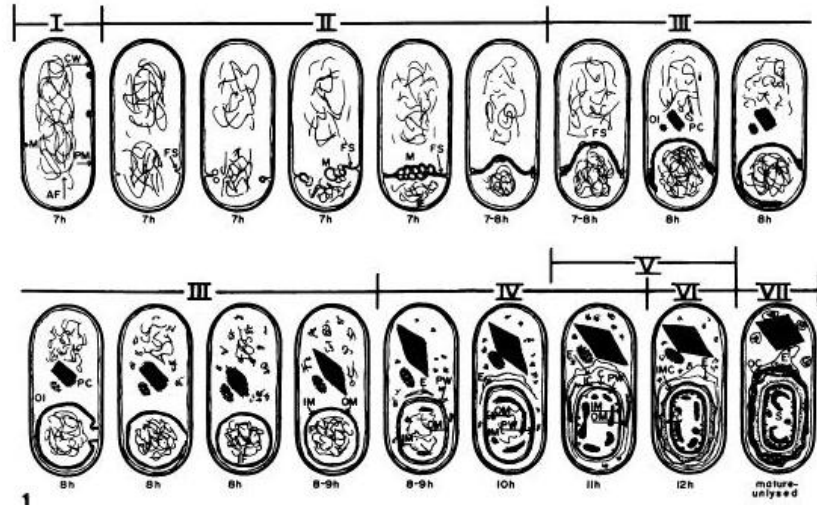
Kristal toksinlerin az bir kısmı ise böcek olmayan türler grubunda yer alanlara, örneğin nematodlara karşı da aktivite gösterirler.



**Şekil 2.7** *Bacillus thuringiensis* petri görüntüsü  
(<http://genpeace.blogspot.com.tr/2013/06/failure-to-demonstrate-any-harm-from.html>; <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/44118.pdf>)



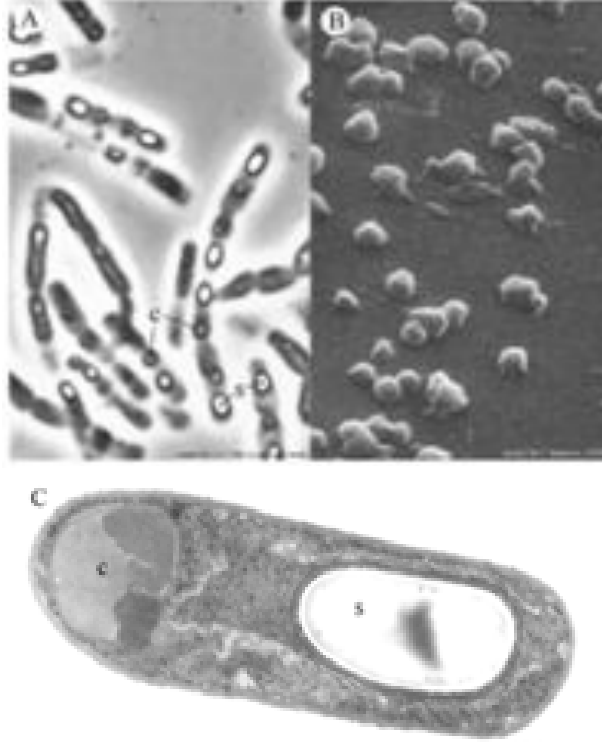
Şekil 2.8 *Bacillus thuringiensis* genüsüne ait faz kontrast mikroskobu görüntüsü  
([http://worldofvet.blogspot.com.tr/2011\\_11\\_01\\_archive.html](http://worldofvet.blogspot.com.tr/2011_11_01_archive.html);  
<http://textbookofbacteriology.net/Anthrax.html>)



Şekil 2.9 *Bacillus thuringiensis* bakterisine ait sporlanma döngüsü  
(<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Bt5.JPG>)

### 2.3.2 *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis*

*Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* (Bti), ilk olarak 1976 yılında İsrail’de bulunmuş, özellikle sivrisinek larvalarına ve kara sinek larvalarına karşı yüksek etki gösterdiği için sivrisinek mücadelesinde yaygın olarak kullanımı ise 1980’li yıllarda başlamıştır (Şekil 2.10). Bu bakterilerin hedef dışı organizmalar ve çevre üzerine zararlı etkisi olmadığı gözlenmiştir. Bti sporları ölü sivrisinek larvaları üzerinden çoğalamadığından ve uygulama ortamındaki kalıcılıkları çevresel faktörlere bağlı olduğundan; Bti uygulanan alanlarda, uygulamadan hemen sonra spor sayısında önemli ölçüde azalmalar olmaktadır. Bu nedenle Bti uygulamalarının belirli periyotlar ile (ortamdaki suyun organik madde özelliklerine göre 7-14 günde bir ) tekrarlanması gerekmektedir (Doğaroğlu, 2008).

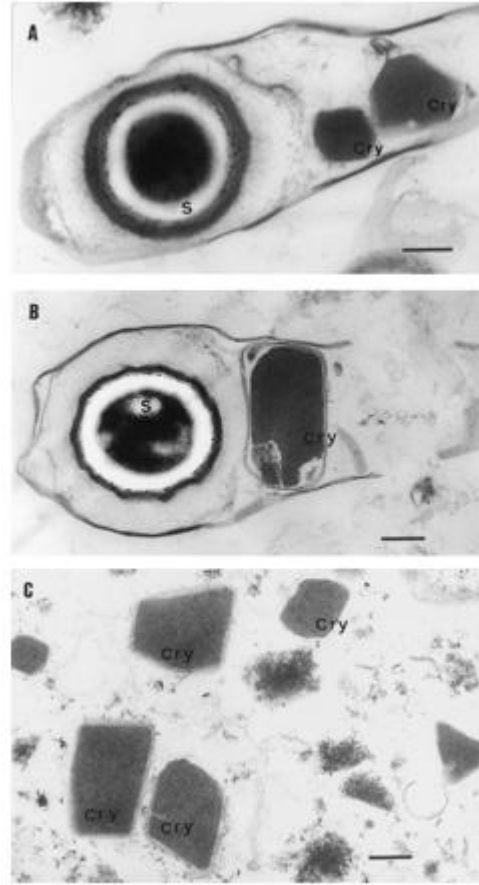


**Şekil 2.10** *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* bakterisine ait görüntü: **a)** faz kontrastta alınan protein ve endospor görüntüsü, **b)** saflaştırılmış proteinlerin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü, **c)** spor ve kristal protein görüntüsü. (<http://www.mddefp.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti/chap3.htm>)

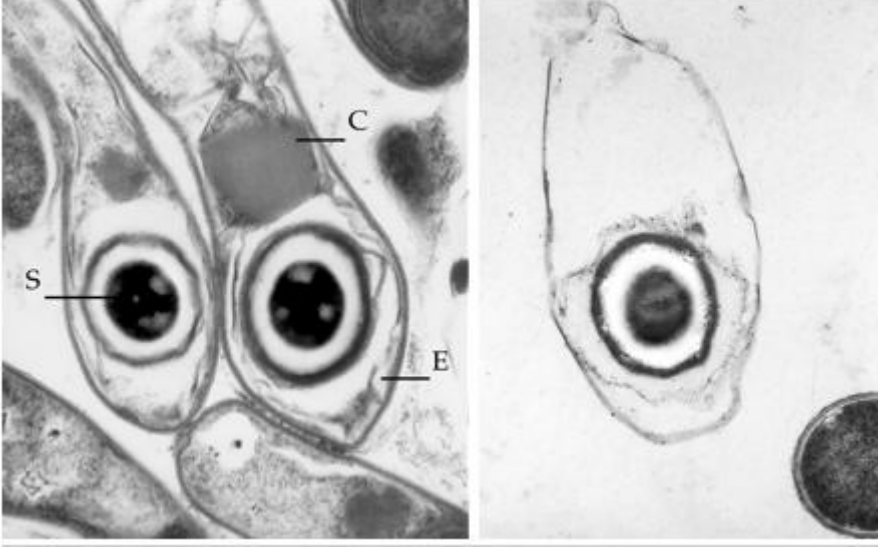
### 2.3.3 *Bacillus sphaericus*

*Bacillus sphaericus* (Bs), aerobik, gram pozitif çubuk şekilli bakterilerdir. Larvisidal etkisi olduğu 1960'lı yıllarda öğrenilmiştir. Yaygın olarak toprakta ve sucul çevrelerde bulunurlar. Bs bakterileri sporlanma esnasında kristal proteinler üretirler (Şekil 2.11; Şekil 2.12). Bu kristal proteinler sivrisinek larvaları üzerinde öldürücü etkiye sahiptirler. Sivrisinek kontrol çalışmalarında Bs kullanılmasının minimum çevresel etki, türe özel oluşu, yüksek etki oranı ve uzun kalıcılık süresi gibi birçok avantajı vardır. Bs'nin sucul böcekler ve invertebratlar üzerine zararlı bir etkisinin olmadığı bilinmektedir. Farelere ve balıklara, üzerlerinde Bs sporları bulunan ölü sivrisinek larvalar yedirilmiş ve hiçbir zararlı etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bs uygulamalarının çevresel faktörlere bağlı olarak yaklaşık dört haftalık rezidüel etkiye sahip olduğu bilinmektedir.

*Bacillus sphaericus* uygulamalarının *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* uygulamalarına göre daha uzun süre kalıcı etki göstermesinin nedeni, Bs sporlarının ölü sivrisinek larvaları üzerinde çoğalabilmeleridir. Bu yetenek, uygulamadan birkaç hafta sonra dahi yumurtadan yeni çıkan sivrisinek larvalarının enfekte edilmesini ve rezidüel etkinin artmasını sağlar. *Culex quinquefasciatus* türü sivrisinek larvalarının kadavraları üzerinde ortalama olarak  $10^5$ - $10^6$  arası Bs sporu olduğu belirtilmiştir. Bs özellikle *Culex* ve bazı *Anopheles* türleri üzerine çok etkilidir (Doğaroğlu, 2008).



**Şekil 2.11A.** Rekombinant *Bacillus sphaericus* 2297 (pcyt1A1) suşunun hücre lizisi sonrası elektron mikroskobu görüntüsü, **B.** *Bacillus sphaericus* 2297'nin spor kristalinin elektron mikroskobu görüntüsü, **C.** Rekombinant 2297 (pMK3) suşuna ait saflaştırılmış inkuluzyon cisimciklerinin görüntüsü (200 nm). S: spor; Cry: Kristal. (<http://aem.asm.org/content/64/10/3910.full>)

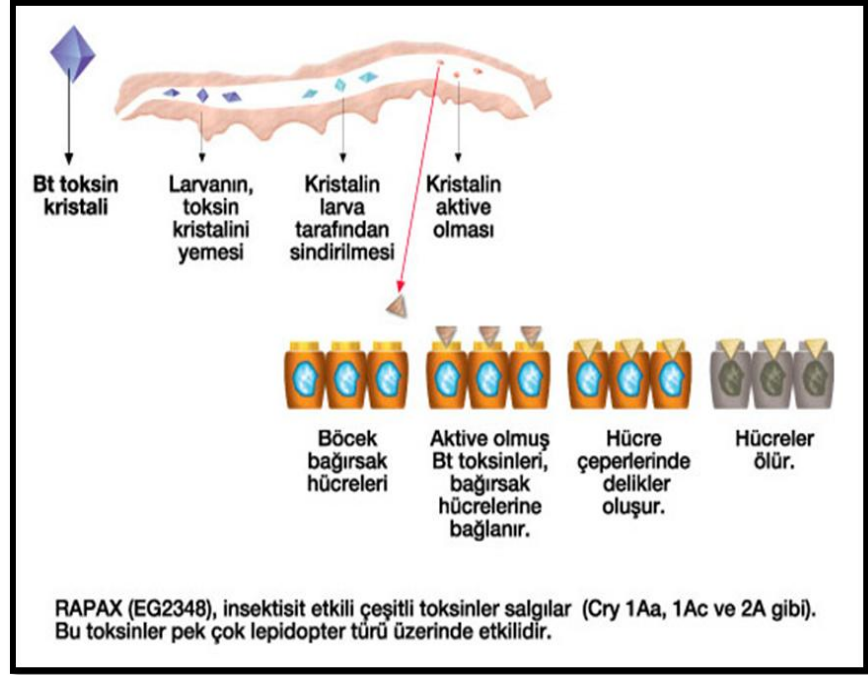


**Şekil 2.12** *Bacillus sphaericus* 2297 ve *Bacillus sphaericus* 2297 (pBB544-trP42A) suşlarına ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (<http://aem.asm.org/content/68/7/3300/F5.expansion.html>)

#### 2.4 *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* Bakterilerinin Etki Mekanizması

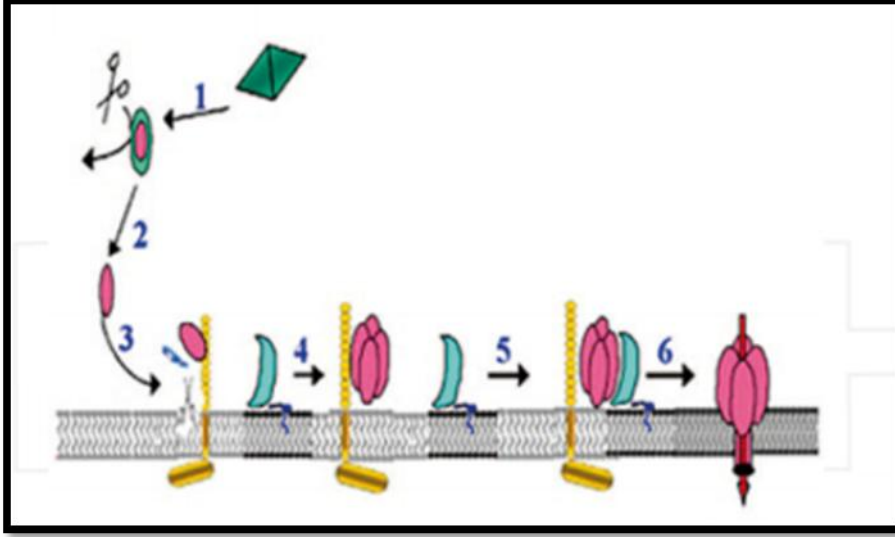
*Bacillus thuringiensis*lerin ekolojisi tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu bakteriler; topraktan, tahıl depolarından, ölü böceklerden, bitki yüzeylerinden izole edilebilir ve bu habitatlar onun patojen olduğunun bir göstergesidir. Sporlanma esnasında kristal proteinin sentezinin bakterinin kendi geleceğini güvence altına almak için olduğu düşünülebilir. Ölü bir böcek, etkin olmayan bir sporun germinasyona geçmesi için yeterli miktarda besini sağlayabilir. Var olan bir çok patojenik faktöre rağmen Bt memelilere karşı patojenlik göstermemektedir, bu sebeple çalışmalar böcek öldürücü olan kristal proteinlerin (aynı zamanda  $\delta$  endotoksin de denilen Cry, Cyt proteinleri,) üzerinde yoğunlaşmaktadır (Maagd et al., 2001). Bu toksik proteinler, sivrisinek larvaları tarafından beslenme yolu ile alınır ve larval orta bağırsak epitel hücrelerinin yıkımı sonucunda larvanın ölümüne neden olurlar. Kristal toksinlerinin çalışma mekanizması şöyle açıklanabilir; sivrisinek larvası kristal proteini beslenme yolu ile sudan alır, kristal protein yüksek pH (alkalin) ortamındaki orta bağırsakta çözünür, proteazların etkisi ile aktif hale geçer, aktif toksin orta bağırsak hücresinin apikal mikrovilluslarındaki reseptörlere bağlanır (Şekil 2.13).

Toksinin özel bir kısmı reseptöre bağlandıktan sonra, toksin hücre zarını geçer ve zarda delikler açar. Bu durumda bağırsak epitel hücresinin iyon dengesi bozulur ve larva ölür (Şekil 2.14). Sivrisinek larvalarına Bti ve Bs uygulanmasından yaklaşık olarak bir saat sonra larvanın beslenmesi durmaktadır, iki saat içerisinde larval aktivitede azalmalar gözlenmekte ve altı saat sonunda ise larva felç olmaktadır (Doğaroğlu, 2008).



**Şekil 2.13** Bti ve Bs bakterilerinin etki mekanizması  
(<http://www.boyuft.com/rapax.php>)

Bir kaç toksin de 2 ya da 3 böcek sınıfını içeren bir gruba karşı aktivite gösterirler. En çok bilinen, kın kanatlılara, sineklere ve güvelere karşı etkili olan Cry1Ba toksinidir. Toksinlerin uzun yıllardır karışık toksinler halde sprey formda biyolojik böcek öldürücü olarak kullanılmalarının yanı sıra, Cry toksinleri tek tek olarak transgenik bitkilerde, ürünleri bitki zararlısı böceklerle karşı dirençli hale getirmek üzere ifade edilmektedirler. Cry geni taşıyan transgenik mısır, pamuk ve patatesler 1996'dan bu yana özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde büyük bir pazar potansiyeline sahip olarak bulunmaktadır (Maagd et al., 2001).



**Şekil 2.14** *Bacillus* kristal proteinlerinin etki mekanizması 1. Kristal toksinin çözünmesi, 2. Sindirim kanalındaki proteazlarla ilk açılımların sağlanması, 3. Reseptörlere toksin monomerlerin bağlanması ve ikinci açılımın olması, 4. Membrana girilme ve oligomerlerin oluşması, 5. Reseptörlere oligomerik toksinlerin bağlanması, 6. Litik por oluşumu. (<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/44118.pdf>)

## 2.5 *Bacillus sphaericus* ve *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* Uygulamalarının Kalıcılık Süresine Etki Eden Faktörler

Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda bu bakterilerin etkinliklerinin sıcaklık, su kalitesi ve su derinliği, vejetasyon zamanı ve pH gibi faktörler ile değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir. Bti bakterisinin insektisidal toksinlerinin mikroorganizmalar tarafından inaktive edildiği bilinmektedir (Tuncer ve Ecevit, 1994). Dalgaboyu 300-700 nm arasındaki güneş ışınları Bti spor ve kristallerini 3 gün içerisinde inaktive ederken Bs sporları çok daha kısa sürelerde etkisini kaybetmektedirler. Düşük su sıcaklığı, hem bakterilerin toksik etkisini hem de larvanın beslenme oranını azalttığından mücadele çalışmalarında başarı oranını düşürmektedir. Bti için ideal gelişim ve toksin üretim sıcaklığı 25 ile 30 °C arasındadır. Bs 25 ve 40 °C arasında yaşayabilirken, 35 °C'den yüksek sıcaklıklarda toksin üretimi inhibe olmaktadır. Bti, 5.5 ve 8.5 pH aralıklarında yaşayabilirken, ideal pH aralığı 6.8 ve 7.2 aralığıdır. Bs için ise pH 7,0 idealdir (Usta, C., 2013). Sulardaki atık madde oranı ve bakterinin maruz kaldığı güneş ışınlarının şiddeti arttıkça rezidüel etki azalmaktadır.



Aynı zamanda larva yoğunluğu ve etki oranı arasında ters ilişki vardır. Çok miktarda larva bulunan sularda, larva başına düşecek bakteri sayısı azalacağından kullanılan formülasyonun dozu artırılmalıdır (Tuncer ve Ecevit, 1994). Aynı şekilde, larva mücadelesi yapılacak olan sularda filtrasyon ile beslenen diğer canlıların miktarı da bakteri oranını etkilemektedir (Doğaroğlu, 2008; Usta, C., 2013).

## 2.6 Dünya'da Ve Türkiye'de Sivrisinek Mücadelesi İçin Biyoinsektisit

### Geliştirmek Üzere *Bacillus* Suşları İle İlgili Yürütülen Bilimsel Çalışmalar

Dünya'da *Bacillus* türlerinin insektisidal aktivitesinden yararlanmak üzere birçok bilimsel biyolojik mücadele araştırmaları yapan araştırma merkezleri bulunmaktadır. Bu ülkelerin çoğunda sivrisinek mücadelesinde kullanmak üzere yeni suş arayışıyla ilgili çalışmalar bu araştırma merkezlerinde ve üniversitelerde sürdürülmektedir.

ABD (Park et al., 2007, 2008) , İspanya (Iriarte et al., 1997), Hindistan (Surendran and Vennison, 2011; Patel et al., 2012), Mısır (Foda et al., 2010), Brezilya (Regis et al., 2000), Kanada (Mostafa et al., 2005; Gringorten et al., 1992; Morris, 1973) , Belçika (Brunet et al., 2010), İskoçya (Pendleton, 1969), İsviçre (Perronand Benz, 1968), İngiltere (Burges and Bailey, 1968), Finlandiya (Meretoja and Carlberg, 1977), Almanya (Heckel, 2012), Çin (Gong et al., 2010), Tunus (Zouari and Jaoua, 1999), Hollanda (Geest and Wassink, 1972), Avustralya (Pinnock, 1994), İran (Keshavarzi, 2008), Nijerya (Obeta, 1986) ve diğer bir çok ülkede biyoinsektisit özelliğine sahip *Bacillus* türlerinin izolasyonu, tanımlanması, sivrisinekler üzerindeki etkinliği, uygulama alanlarındaki etkinliklerinin belirlenmesi konusunda sürekli sayısız araştırmalar yapılmaktadır.

*Bacillus thuringiensis* alt türleri ve *Bacillus sphaericus* bakterilerinin biyoinsektisit özellikleri uzun yıllardır bilinmektedir. Konu hakkında Türkiye'de de yıllardanberi birçok çalışma yapılmış ve halen yapılmaya devam etmektedir. Bu çalışmaların büyük bir kısmında *Bacillus thuringiensis* alt türlerinin ve *Bacillus sphaericus*'un izolasyonu ve tanımlanması amaçlanmaktadır.

Ayrıca araştırmalar, biyolojik etkinlik belirleme çalışmalarına (Yazıcı vd., 2013; Doruk vd., 2013; Dođarođlu, 2008; Öztürk, 2007; Demirci, 2006; Bozlađan, 2006; Apaydın, 2004; Aslım vd., 2002; Tuncer ve Ecevit, 1994; Karacasu, 1998; Nałçacıođlu, 1998; çökmüş, 1989) yöneliktir.

Günümüzde tanımlama testleri daha çok moleküler yöntemlerle yapılmaktadır. *Bacillus thuringiensis* alttürlerinin ve *Bacillus sphaericus*'un üretim parametreleri üzerine çok fazla çalışma yapılmamıştır. Bu türlerden endospor ve toksin proteininin üretimi üzerine de genellikle laboratuvar ölçeğinde yapılmış alışmalar (Özcan, 2008; Igen vd., 2002; Tokcaer vd., 2006; Özkan vd., 2003) mevcuttur.

## **2.7 *Bacillus thuringiensis*'in Üretimi ve Biyolojik Etkinliğinin Ölçülmesi**

*Bacillus thuringiensis*'in biyoteknolojik olarak üretiminde birçok parametrenin aynı anda değerlendirilmesi ve de uygun koşulların tasarlanması gerekebilir. Öncelikli olarak suşların izolasyonu ve suş seçimi önem taşımaktadır. Bunun için farklı biyokimyasal testler olmakla beraber mikroskopik incelemeler de seçimler için yapılabilir. Üretim ortamının çok iyi olarak optimizasyonunun yapılması gereklidir. Bunun için genellikle soya, glukoz, sakaroz, protein (pepton olabilir), nişasta, maya ekstraktı ve çeşitli iz elementlerin farklı oranlarda bulunduğu ortamlarda istatistiksel deney düzeneklerine dayanan denemelerle en iyi vejetatif hücre ve ardından spor oluşumunu teşvik eden ortam bileşenleri ve oranları belirlenmektedir. Üretim için en uygun sıcaklık olarak 30°C (Park et al., 2008) ve çalkalama olarak da 150-200 rpm aralığı (Prabakaran et al., 2005; Anderson et al., 2002) verilmektedir. Büyük ölçekli üretimele geçilecek olursa burada oksijen temini, karıştırma hızı gibi ekstra parametreler devreye girmektedir ki bu durum başka deneme setlerinin kurulumunu da gerektirmektedir.

Üretimin sonlarına doğru vejetatif hücre büyümesi duracak seviyeye gelir, spor ve kristal oluşumu başlar. Biyoinsektisit özelliği gösteren kısım da bu spor ve kristal formlardır. Bu aşamadan sonra laboratuvar ölçeği üretimler için 5000 g 10 dakikalık 3 tekrar santrifüj uygulaması ile hücreler fermentasyon ortamından ayrılabilir (Thomas and Ellar, 1983).

Liyofilizasyon, püskürtmeli kurutma gibi yöntemler ile hücreler toz halinde veya başka formülasyon ajanları ile de sıvı halde olarak hücreler ürün haline dönüştürülebilir (Boyetchko et al.,1999).

Biyoinsektisit özellik gösterdiği bilinen *Bacillus* türleri üzerinde biyolojik etkinlik testleri yapılmaktadır. Bu sayede *Bacillus*ların spesifikliğinden yararlanılarak hangi böcek türleri üzerinde etkin olduğu belirlenmeye çalışılmaktadır, üstelik buradan mortalite oranlarına da ulaşılmakta bu sayede elde edilen veriler, ticari ürünlerin ne kadar miktarda ve yoğunlukta kullanılacağı ile ilgili açıklamada yararlanılan potens katsayısına ulaşmayı sağlamaktadır.

$$\text{Ürünün Potensi} = \text{Standartın potensi} \times \text{LC50 (mg/ml)} / \text{Ürünün LC50 (mg/ml)}$$

## 2.8 Biyoinsektisit Kullanımındaki Kısıtlamalar

*Bacillus thuringiensis* ürünlerinin kullanımındaki en büyük tehditlerden biri böcek direncinin görülmesidir. Cry toksinlerine karşı direnç, böceklerde mutasyonun meydana gelmesi ile oluşabilir ve bu mutasyonlar Cry toksinlerinin etkilerinin her aşamasında belirebilir. Laboratuarda seçilmiş dirençli böcek popülasyonları göstermiştir ki Cry toksin aktivasyonunu da içeren değişik mekanizmalarla direnç oluşabilmektedir. Bu mekanizmalar; esterez veya lipoproteinlerle toksinlerin ayrılmasıyla, yüksek immün cevaplarla, böceklerin mide/bağırsak membranına bağlanmada azalmaya yol açacak toksin reseptörlerindeki değişmelerle olabilmektedir. *C. elegans* mutasyonları, Cry5 toksinlerine karşı direncin oluşumunda glikolipid biyosentezine etki etmektedir. Böcek pestisitlerinde toksinlere karşı şu ana kadar bilinen en yaygın direnç mekanizması, orta mide/bağırsak hücrelerine toksinlerin bağlanmasındaki azalmadır, bu da değişik böcek türlerinde Cry toksinlerinin kaderin, ALP veya APN gibi reseptörlerinde mutasyonların olması ile sağlanmaktadır. Son zamanlarda, *H. virescens* dirençli popülasyonundan bir allel, ABC transport moleküllerinde bir genin mutasyonunda tanımlanmıştır. Bu mutasyon, Cry1A toksinlerinin membran vesiküllerine bağlanmasına etki etmiştir. Bu da, ABC transport moleküllerinin yeni Cry1A toksin reseptörü olduğunu ve sonraki membrana girişte oligomer adımlarında gerekli olduğunu göstermektedir.

Aslında, en sık böcek direnç fenotipi, “mode 1 of Resistance” diye ifade edilen ve Cry1A toksin bağlanmasında azalmayla, Cry1Aa, Cry1Ab ve Cry1Ac'nin çapraz direnci ile ve Cry1C'ye karşı direncin olmaması ile karakterize edilir. Bir kaç lepidopteran böceklerinde, mod of 1 direnci, kaderin genindeki mutasyonlarla bağ yaptırılır. Bu koşullarda 3 lepidopteran böcek pestisiti (*Plodia interpunctella*, *Plutella xylostella* ve *T. Ni*), formüle edilmiş Bt ürünlerine karşı direnç geliştirmiştir (Bravo et al., 2011).

Geçtiğimiz yıllarda, Bt ürünlerine karşı en azından 4 direnç durumu kaydedilmiştir. Bunlar: Amerika'da Cry1Ac'yi kodlayan Bt-pamuğa karşı *H. zea*, Porto Riko'da Cry1F 'yi eksprese eden Bt mısıra karşı *S. frugiperda*, Güney Afrika'da Cry1Ab'yi ekspres eden Bt mısıra karşı *Busseola fuscata* ve Hindistan'da Cry1Ac 'yi eksprese eden Bt pamuğa karşı *P. gossypiella*'dir.

Transgenik ürünlere Cry toksinlerine karşı böcek direncinin görülmesi, “High Dose Refuge Strategy” olarak adlandırılan bir durumla ertelenebilmektedir. Bu strateji, yüksek dozda Cry toksini eksprese eden Bt ürünlerinin olduğu civarlara Bt olmayan bitkilerin belirgin bir yüzdelikle ekilmesini gerektirmektedir.

Bt olmayan bitkiler, duyarlı böcek popülasyonlarını devam ettirmek için barınak olarak tasarlanırlar. Cry toksinlerine karşı duyarlı böcekler, dirençli olanlarla eşleşirler ve dirençlilikle karakterize edilen allellerinden resesif olanlardan dolayı duyarlı yavrular oluştururlar. Barınak taktiği olarak bilinen bu modelin çıktıkları olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde Bt pamuğa karşı dirençli *P. gossypiella* oluşumunda gerilemeler sağlanmıştır. Bu durum, Hindistan'da Bt pamuğa karşı aynı böcek türünde direncin görülmesi ile açıklanabilir.

Son çalışmalarda, Bt pamuğu kullanılarak yapılan bir imha programında, dişi kısır *P. gossypiella* salınımı, alanda dirençli allellerin sıklığında etkili bir yavaşlama/azalma olduğunu göstermiştir. Bu strateji, barınak taktiğinin yerine kullanılabilir; çünkü barınak taktiğinde Bt olmayan bitkiler, böcek saldırılarına karşı korunmasız kalmakta ve bu da ürün kaybına yol açmaktadır. Ayrıca bu strateji, barınak taktiğinin uygulanmadığı bölgelerde özellikle uygulanabilir (Bravo et al., 2011).

## 2.9 Biyoinsektisit Kullanımının Geleceği

Biyolojik Mücadele uygulamasının önündeki en büyük engel bu mücadele metodunun bilgi yoğun bir metot olmasıdır. Diğer önemli bir husus ise üretici alışkanlığıdır. Dünya’da Biyolojik Mücadele ile ilgili olarak yapılan çok sayıda araştırma, üretim ve salım çalışmasına ve çok sayıda taltif edici onur verici sözlere rağmen maalesef uzun yıllar bu konuda istenen seviyede bir gelişme olmamıştır. Uluslararası biyoajan üreticileri derneği (IBMA) tarafından 2002 yılında yayınlanan bir rapora göre biyolojik mücadele ürünlerinin toplam kullanımının kimyasal içerikli biyolojik kontrol ürünlerinin ancak %1’i olduğu belirtilmiştir. Fakat ümitvar olan durum ise bu oranın 2010 yılında iki kat artarak toplam biyolojik kontrol ürünleri pazarının %2’sine ulaşmasıdır. Ancak bu miktarın %80’i tek başına *Bacillus thuringiensis*’e aittir. Bu veriler başarısı kanıtlanmış ve iyi pazarlanabilen bir ürünün ne kadar başarılı olacağını göstermektedir (Anonim 2012e).

Ülkemizde Biyolojik Mücadele alanında yapılan bilimsel çalışmalar uzun yıllar yalnızca devlet kurumları ve üniversiteler tarafından çoğunlukla araştırma projeleri şeklinde yürümüştür. Özel sektörün bu alana ilgisi ancak doksanlı yıllarda bazı Avrupa menşeli şirketlerin yeni pazar arayışları neticesinde başlamıştır. Bugüne kadar Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından Türkiye’de Tarımsal Biyolojik Mücadele için Ruhsatlı Mikrobiyal Preparatların sayısı 30 adet olmasına karşılık Sağlık Bakanlığı tarafından sivrisinek mücadelesi kapsamında kullanılmak üzere ruhsatlandırılmış 6 tane mikrobiyal preparat bulunmaktadır (Çizelge 2.1; Şekil 2.15).

Çevre için son derece güvenli olan ve yalnız sivrisinek türü zararlıların larvalarına toksik etki gösteren *Bacillus* kökenli Bakteriyal Larvasitler genellikle Amerika Birleşik Devletleri’nden ithal edildiği için (Çizelge 2.1) ticari pazara çok yüksek maliyetlerle sunulmakta ve yüksek maliyet tüketicilerin çevre sağlığı için son derece güvenli olan bu ürünü kullanmaları üzerinde caydırıcı etki yaratmaktadır. Tüketici yüksek maliyetten dolayı kullanabileceği güvenli “Bakteriyal Larvasitler”in yerine hedef zararlılar dışındaki su faunasına zararlı (toksik etkisi) olan “Gelişim Düzenleyici Hormon (IGR) İçerikli Larvasitler”i kullanmaya yönelmektedirler.

Çizelge 2.1 Sağlık Bakanlığı Tarafından Ruhsatlandırılmış *Bacillus* içerikli biyoinsektisitler

No	Biyoloji Kontrol Ürünü	Mikrobiyal etmen	Uygulanacak zararlı adları	Üretici Firma (Ülke)	İthalatçı Firma adı
1	Vektobak AS (1.200 mg/İTU)	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	Sivrisinek, <i>Simulium</i> (karasinek)	ValentBioSciences Corporation (ABD,Libertyville)	Envirotek Çevre Sağlığı Teknik Eğitim ve Kimyevi Maddeler San. ve Tic. Ltd. Şti.
2	Vektalex WG (600 mg/İTU)	<i>Bacillus sphericus</i>	Sivrisinek	ValentBioSciences Corporation (ABD)	Envirotek Çevre Sağlığı Teknik Eğitim ve Kimyevi Maddeler San. ve Tic. Ltd. Şti.
3	Vektobac G (200 mg/İTU)	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	Sivrisinek	ValentBioSciences Corporation (ABD)	Envirotek Çevre Sağlığı Teknik Eğitim ve Kimyevi Maddeler San. ve Tic. Ltd. Şti.
4	Aquabac AS (1.200 mg/İTU)	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	Sivrisinek, <i>Simulium</i>	BeckerMikrobial (Parkland, Florida)	Kontrol Kimya İlaç Mak.İnş.Tic. A.Ş
5	Aquabac G (200 mg/İTU)	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	Sivrisinek	BeckerMikrobial	İl—Mak Beşeri Zirai Vet.İlaç ve Mak.san ve Tic.Ltd.şti
6	Aquabac DF (3000 mg/İTU)	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	Sivrisinek	BeckerMikrobial	İl-Mak Beşeri Zirai Vet.İlaç ve Mak.san ve Tic.Ltd.şti



Şekil 2.15 Sağlık Bakanlığı tarafından sivrisinek mücadelesi kapsamında kullanılmak üzere ruhsatlandırılmış mikrobiyal preparat ürünleri (<http://publichealth.valentbiosciences.com/products>)

Ülkemizde Sivrisinek Türü Larva Mücadele Hizmetlerini Belediye Kuruluşları, Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu, Tatil Köyleri ve Yazlık Site Yöneticileri ve Bakanlık İzinli Özel Firmalar yapmaktadır. Ülkemizde yıllık larvasit tüketimi 350-400 ton/yıl'dır. Bu miktarın yüksek maliyetinden dolayı sadece 60-80 tonunu bakteri esaslı larvasitler geriye kalan büyük bir kısmını ise gelişim düzenleyici hormon içerikli larvasitler oluşturmaktadır. Larvasit olarak kullanılan ilaçların tüketicie maliyeti 40-60 Milyon TL'sidir. Tamamı ithal olan bu ürünler için Ülkemizin yabancı ülkelere ödediği döviz miktarı ise yıllık olarak yaklaşık 15-20 Milyon A.B.D. dolarıdır.

Sağlık Bakanlığına bağlı olarak yeni kurulmuş bulunan, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı tarafından milli bütçeden vektör mücadelesi amacı ile yıllık olarak 10 milyon TL tutarında Larva Mücadele İlacı satın alınmakta ve alınan bu ilaç İl Halk Sağlığı Kurumları aracılığı ile Belediye Kuruluşu olmayan kırsal kesimlerde larva mücadelesinde kullanılmaktadır.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Bu çalışmada incelenen mikroorganizmalar, Ege Bölgesi'nden daha önce biyoinsektisit (biyolarvasit) uygulaması yapılmamış olan su birikintisi, çamur, bataklık, gölet, çiftliklerden hayvan yıkama suları, ağaçlık alanlar gibi habitatlardan gelen su, çamur ve toprak numunelerinden izole edilmiş olan olası *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* izolatlarıdır.

Ayrıca EÜ “Biyomühendislik Bölümü *Bacillus* Koleksiyonu”nda yer alan *Bacillus thuringiensis* Bt 1i ve *B. thuringiensis* Bt 7i kodlu izolatlardan da denemelerde faydanılmıştır.

##### 3.1.2 Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

###### 3.1.2.1 Kullanılan besiyerleri

###### Nutrient agar ve Nutrient broth

*Bacillus* izolatlarının üretim, aktifleştirme ve saklanması ticari olarak hazır halde satılan Nutrient Agar (*Merck*, 105450) ve Nutrient Broth (*Merck*, 105443) besiyerleri kullanılmıştır.

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
Nutrient Agar	20,0 g
Distile Su	1000 ml

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
Nutrient Broth	8,0 g
Distile Su	1000 ml



### **LB Agar (Luria Bertani Agar) ve LB Broth (Luria BertaniBroth)**

Çalışma kapsamında asetatlı seçim yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen izolasyon işleminde kullanılan besiyeridir (LB Broth (MERCK, 1102850500), (Travers et al., 1980;Massie et al., 1985; Park et al., 2008; Foda et al., 2010).

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
LB Broth	25 g
Distile Su	1000 ml

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
LB Agar	25 g LB Broth %2 Agar Agar
Distile Su	1000 ml

### **T-3 ortamı**

Endospor üretimini teşvik edici üretim ortamı belirleme denemelerinde kullanılan besiyeridir (Keshavarzi, 2008).

(Sodyum fosfat (Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat) – MERCK M1063451000; Maya Özütü – MERCK – 103753; Triptoz – MERCK 110676; Tripton – MERCK, 110859; Mangan Klorür (Mangan Klorür Tetrahidrat) – MERCK M1059271000).

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
Tripton	3 g
Triptoz	2 g
Maya Özütü (Yeast Ekstrakt)	1,5 g
Sodyum Fosfat (pH:6.8)	0,05 M
MnCl <sub>2</sub>	0,005 g
Distile Su	1000 ml

### **NY (Nutrient Yeast) Ortamı**

Endospor üretimini teşvik edici üretim ortamı belirleme denemelerinde kullanılan besiyeridir (Foda et al., 2010).

<b>Bileşeni Adı</b>	<b>Miktarı</b>
Nutrient Broth	8,0 g
Maya Özütü	-
Distile Su	1000 ml

### **NYSM (Nutrient Yeast Salt Medium) Ortamı**

Endospor üretimini teşvik edici üretim ortamı belirleme denemelerinde kullanılan besiyeridir (Prabakaran and Hoti, 2012).

(Glukoz – SİGMA G8270; NaCl – SİGMA 746398; Pepton – MERCK 107213; Beef Ekstrakt – MERCK 103979; Magnezyum Klorür (Magnezyum Klorür Hekzahidrat) – MERCK M1058331000; Kalsiyum Klorür – MERCK M1023821000).

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
Glukoz	10 g
Pepton	5 g
NaCl	5 g
Beef Ekstrakt	3 g
Maya Özütü	0.5 g
MgCl <sub>2</sub>	0.203 g
CaCl <sub>2</sub>	0.102 g
MnCl <sub>2</sub>	0.01 g
Distile Su	1000 ml
pH	7

### **Tirozin Agar**

*Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının ayırımında faydalanılan biyokimyasal testlerden olan *tirozin hidroliz testinde* kullanılan besiyeridir (Aydın, 2004).

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
Pepton	5 g
Sığır Et Özütü	3 g
Agar	15 g
L-Trozin	5 g
Distile Su	1000 ml

### **Nitrat Broth**

*Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının ayrımında faydalanılan biyokimyasal testlerden olan *nitrat redüksiyon testinde* kullanılan besiyeridir (Aydın, 2004) (Potasyum Nitrat KNO<sub>3</sub> – SİGMA P8394).

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
Beef Ekstrakt	3 g
Pepton	5 g
Potasyum Nitrat	1 g
Distile Su	1000 ml

### **Karbonhidrat fermantasyonunda kullanılan bazal medium**

*Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının ayrımında faydalanılan biyokimyasal testlerden olan *karbonhidrat fermantasyon testinde* kullanılan besiyeridir (Tamer vd.,1989).

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
Nutrient Broth	8 g
Şeker	5 g
Distile Su	1000 ml

### **3.1.2.2 Kullanılan çözeltiler**

#### **Nitrat redüksiyon testinde kullanılan çözeltiler**

Nitrate Reagent A ( $\alpha$ -naphthylamine) – SİGMA 38497-100ML-F

Nitrate Reagent B (sulfanilic acid) – SİGMA 39441-100ML-F

Fenol Red – SİGMA 32661-10G

## **Gram boyamada kullanılan çözeltiler**

### *Kristal Viyolel Çözeltilisi*

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>	
Kristal Viyolel (%90 boya içeren)	2 g	A Çözeltilisi
Etanol (%95 v/v)	20 ml	
Amonyum Okzalat	0,8 g	B Çözeltilisi
Distile Su	80 ml	

Kullanılan kristal violet çözeltilisi; ayrı ayrı hazırlanan A ve B solüsyonları birleştirilip, iyice karıştırılıp ve filtre edilerek hazırlanmıştır (Etanol – SİGMA 32205-1L ; Kristal Viyolel – SİGMA C3886 – Gram Boyama Kiti – Fluka 77730).

### *Gram İyodür Çözeltilisi*

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
Potasyum İyodür	2 g
İyot	1 g
Distile Su	300 ml

Kullanılan Gram iyodür solüsyonu; potasyum iyodür ve iyotun bir kap içerisinde iyice ezilerek karıştırılması ve yavaş yavaş su eklenmesi ile hazırlanmıştır. Koyu renk şişelerde muhafaza edilerek kullanılmıştır.

### *Safranin Çözeltilisi*

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
Safranin	0,25 g
Etanol (%95 v/v)	10 ml
Distile Su	100 ml

Safranin 10 ml etanol içerisinde iyice çözülmüş ve üzerine 100 ml distile su eklenmiştir, iyice karıştırılarak birkaç gün dinlenmesi sağlanmıştır. Kullanılmadan önce filtreden geçirilerek boyama için hazır hale getirilmiştir (Safranin – SİGMA 94635).

### **Protein boyamada kullanılan çözeltiler**

*Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının biyoinsektisit özellik göstermelerini sağlayan toksin proteinlerin boyanmasında Commasie Brilliant Blue çözeltisi kullanılmıştır.

(Commasie Brilliant Blue – SİGMA 27815-25G-F ; Asetik Asit – SİGMA - 320099-2.5L).

#### *Commasie Brilliant Blue Çözeltisi*

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
Commasie Brillant Blue	0.3 g/100 ml
Asetik Asit	10 ml
Etanol	45 ml
Distile Su	45 ml

### **3.1.3 Kullanılan cihazlar**

#### **3.1.3.1 Hassas terazi**

Mettler Toledo AL204 hassas terazi, kullanılan besiyerlerinin ve Commasie Brilliant Blue ve Gram Boyama çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

#### **3.1.3.2 Isıtıcıly manyetik karıştırıcı**

Heidolph MR 3001 ısıtıcıly manyetik karıştırıcı, kullanılan besiyeri ve diğer çözeltilerin istenilen koşullarda ve istenilen özelliklerde olması için homojenizasyonun sağlanmasında kullanılmıştır.

### **3.1.3.3 Otoklav**

Hirayama Hiclave HVE-50 marka ve model numaralı otoklav gerekli besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanmasında, sterilizasyonun sağlanması amacı ile kullanılmıştır.

Ayrıca yapılan analizler sonucunda açığa çıkan, mikrobiyolojik olarak bulaşık haldeki cam materyalin tekrar kullanılabilir hale getirilmesi ve tek kullanımlık materyallerin ise çöpe atılmadan önce tüm mikroorganizmalardan arındırılması amacı ile kullanılmıştır.

### **3.1.3.4 Pastör fırını**

Binder marka ısıtıcı fırın, 180<sup>0</sup>C’de 2-3 saat tutularak cam malzemelerin sterilizasyonu için kullanılmıştır.

### **3.1.3.5 İnkübatörler**

Nüve EN 120 inkübatör, 30<sup>0</sup>C’de petri kültürasyonları için kullanılmıştır.

### **3.1.3.6 Çalkalamalı inkübatör**

Certomat R-HK marka çalkalamalı inkübatör, sıvı kültürde hücrelerin ve endosporların gelişiminin sağlanması vetoksin protein üretimi amacı ile kullanılmıştır.

### **3.1.3.7 Santrifüj**

Sigma 4K15 marka ve model numaralı santrifüj 6x250 ml’lik 121256 kod numaralı rotor ile birlikte hücre hasatı için +4 <sup>0</sup>C’de kullanılmıştır.

### **3.1.3.8 pH metre**

InoLab WTW pH metre hazırlanan besiyeri ve diğer karışımların pH değerlerinin kontrol edilerek ayarlanması amacı ile kullanılmıştır.

### **3.1.3.9 Vorteks**

IKA-WERKE TTS 2 (test tube shaker) vorteks, dökme plaka yapılırken seyreltmelerin homojen olabilmesi amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.3.10 Biyoreaktörler**

İnfors HT labfors 3,5 litre biyoreaktör, Sartorius marka 5 L'lik A plus reaktör, endospor ve toksin protein miktarının artırılması amacıyla üretimde kullanılmıştır.

### **3.1.3.11 Faz kontrast mikroskobu**

Faz Kontrast Mikroskobu (OLYMPUS-CKX41).

### **3.1.3.12 Işık Mikroskobu**

Işık mikroskobu (OLYMPUS-CX31).

### **3.1.3.13 Liyofilizatör**

CHRIST Freeze Dryer Model BETA 2- 8 LD Plus.

## **3.2 Metot**

### **3.2.1 Olası *Bacillus thuringiensis* ve *B. sphaericus* türlerinin seçici izolasyonu**

Çalışmada incelenen mikroorganizmaların izolasyonunda öncelikle Ege Bölgesi'nden daha önce biyoinsektisit (biyolarvasit) uygulaması yapılmamış olan su birikintisi, çamur, bataklık, gölet, çiftliklerden hayvan yıkama suları, ağaçlıkalanlar gibihabitatlardan gelen su, çamur ve toprak numuneleri olmak üzere toplam 18 adet istasyondan 29 numune incelenmiştir. Bu kaynaklardan biyolarvasit olarak kullanılacak, endotoksin üreten, olası *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* türlerinin izolasyonu amaçlanmıştır. Çalışmamızda kullanılan numunelerin kaynakları ve kodları, aşağıdaki Çizelge 3.1'de verilmiştir.

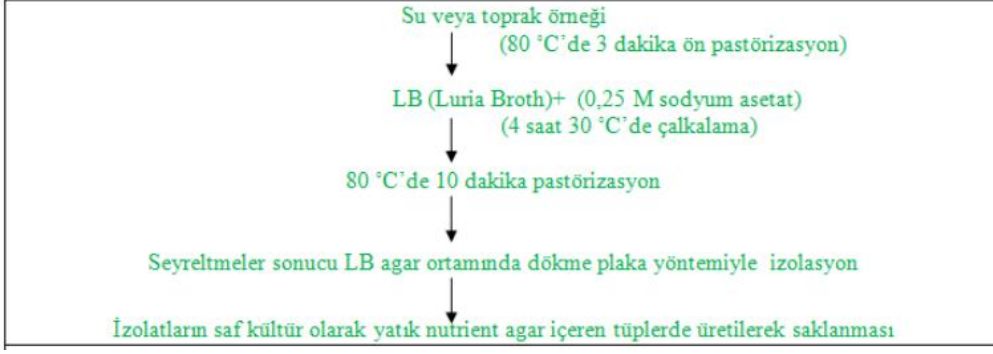
**Çizelge 3.1** Çalışmamızda kullanılan numunelerin kaynakları ve kodları

<b>N o</b>	<b>Numune Alınan Yer</b>	<b>Tarih</b>	<b>Numune sayısı ve Kodu</b>	<b>Numune Cinsi</b>
<b>1</b>	KUŞ cenneti göz. İst. Arkası 3 su birikintisi	15.11.2012 saat 16:00	1-K, 2-K, 3-K, 3- K-S	Su (3 kova)
<b>2</b>	KUŞ cenneti gözlem İst. 300-400 m. Uzağı su kanalı	15.11.2012 saat 14:30	4-K-a, 4-K-b	Su (2 kova)
<b>3</b>	Bayındır-Tire yolu, Tire çıkışı 5 km çiftlik (yolun sağında)		T-1, T-2, T-3, T-4	Su (beklemiş havuz suyu) (4 kova)
<b>4</b>	Ödemiş'e gelmeden 2 km sağda çiftlik evi	13.12.2012	Ö-1, Ö-2, Ö-3, Ö- 4	Su (ölü larvalı beklemiş su) (4 kavanoz)
<b>5</b>	Bayındır / Bayındır Güney yönü / Zeytin bahçesi	21.11.2012	B-1	Toprak (1 kavanoz)
<b>6</b>	Bayındır-Tire yolu Batı Yönü	21.11.2012	B-2	Toprak (Çiftlik toprağı)(1 kavanoz)
<b>7</b>	Tire / İzmir Tire Kuzey yönü / Mısır Tarlası	21.11.2012	T-5	Toprak (1 kavanoz)
<b>8</b>	Ödemiş Bademli / Bademli Barajı kenarı orman toprağı Batı yönü	21.11.2012	Ö-5	Toprak (1 kavanoz)
<b>9</b>	Ödemiş Bademli Güney Yönü Allah deresi Kestane ormanı	21.11.2012	Ö-6	Toprak (1 kavanoz)



<b>10</b>	Torbalı aybaşı ky Hayvan iftliği Hayvan Yıkama Havuzu	21.11.2012	-1	Su (1 kova)
<b>11</b>	Torbalı aybaşı Sulama havuzu kenarı su birikintisi	21.11.2012	-2	Su (1 kova)
<b>12</b>	Torbalı aybaşı Hayvan iftliği Yıkama suyu	21.11.2012	-3	Su (1 kova)
<b>13</b>	Kuş Cenneti Gözlem İst. 100-150 m. evresi	15.11.2012sa at: 13:30	K-5	amur (1 kavanoz)
<b>14</b>	Kuş Cenneti Gzlem İst. Yaklaşık 1000 m. Uzağı Sulama Kanalı	15.11.2012sa at: 14:30	K-6	amur (1 kavanoz)
<b>15</b>	Kuş Cenneti Gzlem İst. Yaklaşık 500 m. Kara ii	15.11.2012sa at: 13:50	K-7	amur (1 kavanoz)
<b>16</b>	Kuş Cenneti Gzlem İst. Yaklaşık 500 m.Sazlık Alan Etrafi	15.11.2012 saat: 14:00	K-8	amur (1 kavanoz)
<b>17</b>	Kuş Cenneti etrafı sulama kanalları ve civarı gözlem ist. Yaklaşık 1 km	15.11.2012sa at: 14:40	K-9	amur (1 kavanoz)
<b>18</b>	demiş Gölcük - 1 su şişesi		G-1	Su (1 şişe-500 ml)

Çalışmada izolasyonu hedeflenen başlıca türler olan *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* suşlarının izolasyonunda (Travers et al., 1980; Massie et al., 1985; Park et al., 2008; Foda et al., 2010) çeşitli makalelerden derlenen modifiye bir yöntem kullanılmıştır.



**Şekil 3.1** Toprak ve su örneklerinden *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* türlerinin asetatlı seçim yöntemiyle izolasyon şeması

İzolasyonda öncelikle numuneler 80°C'de 3 dakika bekletilerek vejetatif hücrelerden arındırılmaya çalışılmıştır, ön pastörizasyon denen bu işlemle spor oluşturma yeteneği olan hücreler geriye kalmıştır. Ön pastörizasyondan geçirilen numuneler, çift kuvvet olarak önceden hazırlanıp steril edilmiş olan içeriği 3.1.2.1'de verilen Luria BertaniBroth ve 0,25 M sodyum asetat içeren ortama aktarılmıştır. Karışım, 30 °C'de 4 saat 150 rpm'de çalkalamaya bırakılmıştır. 4 saatin sonunda yine pastörizasyon işlemine geçilmiş olup bu adımdaki pastörizasyon işlemi, 80 °C'de 10 dakika sürmüştür (Park et al., 2008). Devamında aseptik koşullarda seri seyreltmeler yapılarak dökme plaka yöntemi uygulanmıştır. Dökme plaka için içeriği 3.1.2.1'de belirtilen Luria Bertani Agar kullanılmıştır. 30 °C'de (Park et al., 2008) 3-4 gün süreyle inkübe edilen petrilerden saf kültür elde etme amacıyla quadrant ya da T çizgi ekimleri yapılarak saf kültürler elde edilmiştir.

### 3.2.2 Olası *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* izolatlarının tanımlanması

*Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının tanımlanmasında bu suşlara ait endospor ve toksin proteini oluşturma özelliklerinden yararlanılmıştır.

Bu özelliklerin belirlenebilmesi için öncelikle ışık mikroskobu, faz kontrast mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobunda incelemeler yapılmıştır (Iriarte et al., 1998; Keshavarzi, 2008). Daha sonra çeşitli biyokimyasal testler yapılmıştır (Thiery and Frachon, 1997; Park et al., 2008; Aslım vd. 2000; Foda et al., 2010; Massie et al., 1985).

### **3.2.2.1 Işık mikroskobu ve faz kontrast mikroskobu incelemeleri**

İzolatların tanımlanmasında öncelikle izolatların parasporal kristal proteinleri içerip içermediğinin belirlenebilmesi amacıyla protein boyamada kullanılan Coomassie Brilliant Blue çözeltisi kullanılmıştır. Her bir izolat petrilere endospor ve toksin proteini üretimi için 5-10 gün arası yeterli sürelerde inkübe edildikten sonra lam üzerine 1 damla su koyarak yayılıp ince bir film halinde kurutulmuş preparata, Coomassie Brilliant Blue çözeltisi damlatıp 1 dakika bekletilip distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra incelenmiştir (Rampersad et al., 2002). Mikroskobik olarak endospor ve endotoksin varlığı hem ışık mikroskobu (OLYMPUS- CX31) hem de Faz Kontrast Mikroskobu (OLYMPUS-CKX41) ile incelenmiştir.

### **3.2.2.2 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)**

Bu çalışma kapsamında çeşitli numunelerden izole edilen bazı izolatların faz kontrast mikroskobunda incelenmesinden sonra taramalı elektron mikroskobunda incelemeleri yapılarak görüntüler alınmıştır.

### **3.2.2.3 Biyokimyasal Testler**

Çalışmada elde edilen izolatların içinden *Bacillus thuringiensis* ve *B. sphaericus* suşlarını seçebilmek amacıyla bu suşlara özgü biyokimyasal özelliklerden faydalanılmıştır. İzolasyon işleminin ardından faz kontrast ve elektron mikroskobu gibi morfolojik özelliklerin belirlenmesine dayanan yöntemlerin yanında; nitrat indirgenmesi, anaerobik büyüme, tirozin dehidrasyonu, karbonhidrat metabolizması (şeker indirgenmesi) gibi bir çok farklı biyokimyasal testler de yapılmıştır.

Testler sonucunda *Bacillus thuringiensis* ve *B. sphaericus* suşlarının ayırt edilmesi hedeflenmiştir (Thiery and Frachon, 1997; Foda et al., 2010; Aslım vd., 2002).

**Çizelge 3.2** *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* ve *Bacillus sphaericus* türlerinin ayırt edilmesinde kullanılan biyokimyasal testler

UYGULANACAK TEST	ORGANİZMA TÜRÜ	
	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i>	<i>B. sphaericus</i>
<b>Aerobik/Anaerobik</b>	Anaerobik / fakültatif	Aerobik
<b>Tirozin İndirgenmesi</b>	+ (pozitif)	- (negatif)
<b>Nitrat Kullanımı</b>	+ (pozitif)	- (negatif)
<b>Şeker İndirgenmesi (Karbonhidrat Metabolizması)</b>		
<b>Gliserolden asit</b>	+ (pozitif)	- (negatif)
<b>Niştastadan asit</b>	+ (pozitif)	- (negatif)
<b>Glikozdan asit ve gaz</b>	+ (pozitif)	- (negatif)

### **Karbonhidrat fermantasyon testleri**

Bir bakteri hücrelerinde hangi şekerleri fermente edebilen metabolizmanın bulunduğu o bakteri suşu için identik değer taşır (Aydın, M., 2004). Literatür çalışmaları sonucunda istenilen organizmaların metabolizmasına göre de nişasta, gliserol ve glukoz ile şeker fermentasyon testlerinin yapılacağı kararlaştırılmıştır (Foda et al., 2010; Thiery and Frachon, 1997; Keshavarzi, 2008). Testin uygulanışına bakıldığında, bu test, incelenecek bakterinin (*Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus*) üreyebileceği besiyerinin terkibine sadece denenecek olan karbonhidratın ilave edilerek, fermente olup olmadığının izlenmesinden ibarettir (Aydın, M., 2004).

Yapılan denemede besi ortamı ve fermente edilmesi istenen şekeri içeren tüplere bir pH indikatörü (fenol red) ilave edilmiştir (Tamer vd., 1989). Bakteri, inkübasyon dönemi sonunda bu şekeri fermente edip asit oluşturabilmiş ise ortamın pH'sı 5.5 sınır değerinin altına düşer (Aydın, M., 2004). Dolayısıyla indikatör olarak kullandığımız fenol kırmızısının rengi de kırmızıdan sarıya dönüşmüştür. Çalışmada gaz üretimi ise Durham tüplerindeki gaz birikimi ile gözlenmiştir (Tamer vd., 1989).

Denemelerde öncelikle, saf kültür halindeki bakteri kolonisinden bakterinin çoğalması için uygun olan besiyerine (Nutrient Broth) ekim yapıldı. 30 °C'de 1 gün inkübasyona bırakıldı.

Bu besiyerine denenecek şekerden gereken (3.1.2.1) miktarda eklendi ve ardından Durham tüpü ters çevirilerek havası alındı ve bu halde sterilizasyon yapıldı (121 °C, 15-20 dakika). Sterilizasyonun ardından uygun sıcaklığa gelen ortamlara bakteri kültüründen 1'er ml inokulasyon yapılarak 2-3 gün boyunca 30°C'de inkübasyona bırakıldı ve her gün gözlem yapıldı.

Testin prosedürü gereği inkübasyon dönemi sonucunda oluşan sarı renk ortamdaki şekerin fermentasyonu sonucunda asit oluştuğunu ve pozitif test sonucunu ifade etmektedir. Bunu göz önüne alınarak inkübasyon sonuçları değerlendirilmiştir.

Renk değişiminin daha net olarak fark edilebilmesi için kontrol olarak ekim yapılmamış bir tüp besiyeri ile birlikte inkübasyon yapılmıştır. Testin diğer bir sonucu olarak gaz oluşumu ise ters çevrili durumdaki Durham tüplerindeki gaz birikimi ile gözlenmiştir. (Tamer vd.,1989).

**Nişasta fermentasyon testi :** Şeker fermentasyon bazal medium (3.1.2.1) içerisinde şeker kaynağı olarak nişasta eklenmiştir ve yukarıda açıklanan yöntemle izolatların nişasta fermentasyon yetenekleri gözlenmiştir.

**Gliserol fermentasyon testi :** Şeker fermentasyon bazal medium (3.1.2.1) içerisinde şeker kaynağı olarak gliserol eklenmiştir ve yukarıda açıklanan yöntemle izolatların gliserol fermentasyon yetenekleri gözlenmiştir.

**Glukoz fermentasyon testi :** Şeker fermentasyon bazal medium (3.1.2.1) içerisinde şeker kaynağı olarak glukoz eklenmiştir ve yukarıda açıklanan yöntemle izolatların glukoz fermentasyon yetenekleri gözlenmiştir.

Fenol red indikatörü normalde (pH=7) kırmızı renktedir.  $pH \leq 5$  iken sarı renk alırken  $pH \geq 7.5$  ise koyu kırmızı, pembe renk alır. Durham tüpleri (Şekil 3.2) içerisinde oluşmuş gaz kabarcıkları fermentasyon sonucu oluşan katabolik gaz ürünlerinin ( $CO_2$ ,  $H_2$ ,  $H_2S$ ) bulunduğu kalitatif göstergesidir (Aydın, M., 2004).

#### **Tirozin hidroliz testi**

İzolatları ayırt etmek için tirozin hidroliz testi de uygulanabilir.

Tirozin indirgenme testi ile çalışmamızın diğer adımlarında kullanılacak hedef organizmalar olan *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının ayırt edilmesi amaçlanmıştır.

Tirozin, fosfoenolpiruvattan sentezlenen hidroksifenilpiruvat'ın aminlenmiş bir derivasyonudur. Aromatik bir amino asittir. Bilhassa *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acetobacter* ve eugonic *Mycobacteria*'lar bu aminoasitten melanin oluşturabilir.

Tirozinin deaminasyonu tyrosinase enzimi ile olur ve bu test, ortaya çıkan siyah renkli melaninin tespit edilmesine dayanır.

Tirozin hidroliz testi için, tirozin agar (3.1.2.1) içine veya et infuzyon buyyon içerisine 0.1 % tyrosine ilave edilerek (tirozin, filtrasyon yöntemi ile steril edilmiştir) ekim yapılmıştır. Türe uygun süre kadar inkübe edilerek her gün siyah renk aranmıştır.

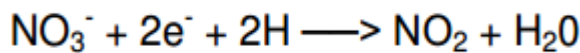
Tirozin hidroliz testinde tirozin agara ekim yapılmışsa siyah koloni oluşumu yanında, koloni çevresinde ve altında (agar içerisinde) saydamlaşma görülmesi beklenir (Aydın, M.,2004).

Testin değerlendirilmesi yapılırken, koloni çevresinde hem siyah pigmentasyon ve hem de agarda saydamlaşma pozitif test sonucu olarak yorumlanmıştır.

### **Nitrat indirgenme testi**

Nitrat redüksiyon testi için asetatlı seçilim yöntemi ile izole edilen ve biyolojik etkinlik testleri yapılan bazı *Bacillus* izolatları kullanılmıştır. Bu test ile çalışmamızın diğer adımlarında kullanılacak hedef organizmalar olan *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının ayrımı amaçlanmıştır.

Testin uygulanmasında 3.1.2.1'de içeriği verilen Nitrat Broth ortamı kullanılmıştır, bu ortamda büyüyen bakteri çözeltisi üzerine Ayıraç-A ve Ayıraç-B damlatılmıştır, renk değişimi gözlenmiştir. Bu test gerçekleşirken bakteri kolonisi üzerine ayıraçlar damlatıldığında ortamda nitrit varsa p-sulfobenzene-azo- $\alpha$ -naphthylamine oluşmaktadır. Bu madde kırmızı renkli bir diazonium boyasıdır. Gerçekleşen reaksiyonunun kimyasal ifadesi:



Bakteri çözeltilisi üzerine Ayıraç A ve B nin sırasıyla bir kaç damla damlatılmasından yaklaşık 30 saniye kadar sonra renk değişimi incelenmiştir. Kırmızı rengin gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilirken kırmızı rengin gözlenmemesi durumuna farklı yorumlar getirilmiştir. Bu yorumlar ya testin sonucunun negatif olduğunu ya da nitritin başka komponentlerle bağlanmış olduğunu desteklemektedir. Bakteri nitratı redükleyemezse kırmızı renk gözlenmez ve test negatif sonuçlanır. Bakteri nitratı nitrite redükler, nitrit de başka komponentlerle bağlanırsa (Örneğin nitrat iki defa redüklenirse sonuçta nitrit değil, NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>, NO, N<sub>2</sub>O veya hydroxylamine şekline dönüşür) ayıraçlar bu durumun ayırt edilmesine yardımcı olamaz ve sonuç negatifmiş gibi algılanabilir (Aydın, M., 2004.)

Çalışmada nitrat redüksiyon testindeki anlam kargaşasını ortadan kaldırmak için renk değişimi gözlenemeyen denemelerde son adım olarak bakteri çözeltilisine manuel olarak küçük bir metalik çinko parçası atılmıştır. Böylece ortamda indirgenmeden kalan nitrat varsa manuel olarak nitrite indirgenmesi sağlanmıştır, yani negatif sonuç olduğu ispatlanmıştır.

### **Anaerobik Büyüme**

Anaerobik kültürleme testi ile Çizelge 3.2’de görüldüğü üzere çalışmamızda önem taşıyan *Bacillus sphaericus* ve *Bacillus thuringiensis* suşlarının ayrımı amaçlanmıştır (Foda et al., 2010; Thiery and Frachon, 1997; Keshavarzi, 2008).

Bazı durumlarda bakteri türleri elektron akseptörü olarak nitratlar gibi bazı akseptörleri kullanabilir; bu yüzden ortam nutrientleri, mineral akseptörleri içermemelidir. Bu testin uygulanma adımları ise şöyledir:

- Yarı katı ortam (nitrat içermeyen jeltain agar), çözülmüş oksijeni elimine etmek için 3 dakika kaynar suda bekletilir.
- Erimiş ortam 50-55 °C’de tutulmaya devam edilirken sıvı vejetatif kültürden erimiş yüzeye dipten yukarı doğru pastör pipeti ile inokulasyon yapılır. Hızlı bir şekilde soğutulur.
- Koloni oluşana kadar bir kaç gün 30°C’de inkübe edilir (Çizelge 4.6).

### 3.2.3 Olası *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* izolatlarının laboratuvar ölçeğinde üretilmesi

#### 3.2.3.1 Sporlanma ve toksin proteini üretimini teşvik eden ekonomik bir “üretim ortamı” belirlenmesi

Tez çalışmamızda biyokimyasal testler sonucu seçilmiş olan endotoksin üreticisi muhtemel *Bacillus thuringiensis* ve *B. sphaericus* izolatlarının endotoksin kristalleri ve endospor formunda üretilmesi amaçlandığından çalışmanın ilk basamağında sporlanma ve toksin proteini üretimini indükleyecek bir üretim ortamının seçilmesine yönelinmiştir. Bu amaçla literatürden elde edilen bilgilere dayandırılarak *Bacillus*'larda spor ve toksin proteini üretiminde kullanılan farklı kompozisyonlarda çeşitli sporlanma ortamları, denenmiştir. Bu noktada üretim ortamlarının içeriğindeki karbon ve azot kaynakları ve mineral tuz oranları önem kazanmaktadır. En kısa sürede en yüksek spor sayısının elde edildiği, mümkün olan en ekonomik besiyeri belirlenmiştir (Monteiro et al., 2005, Prabakaran et al., 2007, Sarrafzadeh et al., 2005, Atehortua et al., 2007).

Çalışmada, içerikleri 3.1.2.1'de verilen T-3, NY ve NYSM besiyerleri karşılaştırmalı olarak denenmiştir.

Yukarıda belirtilen ortamların kullanılmasıyla yapılan üretimler sonucu üretim ortamından örnek alınarak endospor sayımı yapılmış ve buradan elde edilen sayım sonuçlarına göre üretim ortamı seçimi yapılmıştır.

#### **Kültürlerin aktivasyonu ve saflık kontrolü**

Toprak, su gibi numunelerden dökme plaka ile elde edilen izolatlar, T veya çizgi ekimler ile saflık kontrolünden geçirilerek yatık Nutrient Agar (3.1.2.1) içeren tüplerde 4 °C'de saklanmıştır. Tanımlama ya da ortam belirleme çalışmalarında tekrar kullanılmak üzere izolatların aktivasyonu, Nutrient Agar ya da Nutrient Broth kullanılarak 30 °'de (Park et al., 2008) yapılmıştır.

#### **İnokulum üretimi ve inokulasyon**

Yatık Nutrient Agar besiyerinde stok olarak saklanan *Bacillus* izolatından bir öze alınarak Nutrient Broth ortamına ekim yapılmıştır.



24 saat 30 °C'de inkübasyondan sonra aseptik koşullarda % 2 oranında 100 ml'lik endospor üretim ortamlarına inokülasyon yapılmıştır.

### **Üretim Koşulları**

İnokülasyondan sonra erlenler, 30 °C'de, 150 rpm'de 4 gün süreyle inkübe edilmiştir. Üretimin sonlandırılmasının ardından birer ml örnek alınarak endospor sayısı belirlenmiştir. Çalışmalar 2 paralel halinde yürütülmüştür.

### **Dökme plaka yöntemi ile endospor sayımı**

1- Fermantasyon sıvısından alınıp 80 °C'de 10 dakika su banyosunda bekletilen 1 ml kültür sıvısı 9 ml distile su bulunan steril tüpe aktarılarak 1/10 oranında seyreltilmiştir.

2- 1/10 oranında seyreltilmiş örnek sonra bunun içerisinden steril bir pipet ile 1 ml çekilerek içinde 9 ml distile su bulunan bir başka steril tüpe aktarılmıştır.

3- Bundan sonra aynı yollar izlenerek 1/10000000 oranına kadar ardışık seyreltmeler hazırlanmıştır.

4- Fermentasyon sıvısındaki endospor canlı sayımının yapılması için 1/1000000, 1/1000000, ve 1/100000000'lik steril pipet ile birer ml örnek alınarak steril petri kaplarına aseptik koşullarda konmuş ve üzerine 45°C' ye kadar soğutulmuş nutrient agar besiyeri 15-20 ml dökülmüştür. Her bir dilusyon için iki paralel olacak şekilde ekim yapılmıştır.

5- Besiyeri döküldükten hemen sonra petri kapları tezgâh üzerinde içindeki agar katılaşmaya kadar rotasyon hareketi yaptırılarak karıştırılmış ve böylece örneğin besiyerine homojen olarak yayılması sağlanmıştır.

6- Ardından petri kapları ters çevrili olarak 30°C'de 2-3 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 30-300 arasında koloninin olduğu petri plaklarında görülen bütün koloniler tek tek sayılmış; ortalama koloni sayıları bulunarak seyreltme faktörüyle çarpılmıştır.

Sonra bakteri süspansiyonunun ml'sindeki endospor sayıları kob/ml (koloni oluşturma birimi/ml) cinsinden hesaplanmıştır.

### **3.2.3.3 Üretim ortamından endosporların ayrılması**

En yüksek endospor üretiminin sağlandığı besiyerinde üretim tamamlandıktan sonra kültür ortamı 10 dakika 6000-7000 g'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra her seferinde süpernatant (üst sıvı) kısmı uzaklaştırılmış ve üzerine steril deiyonize su eklenerek santrifüjde 3 kez yıkanmıştır. En sonunda pelet halinetoplanan hücreler ya steril distile su ile çözelti halinde ya da iyofilize edilerek saklanmıştır (Thomas and Ellar, 1983; Prabakaran and Balaraman, 2006).

### **3.2.4 Laboratuvarında biyolarvasit biyolojik etkinlik testleri**

Tez çalışması kapsamında laboratuvar ortamında üretimi yapılan izolatların larvalar üzerinde denemeye dayanan “biyolojik etkinlik testleri”, Ege Üni. Fen Fak. Biyoloji Bölümü Zooloji ABD. (Sağlık Bakanlığı Biyosidal Ürün Analizi Yapmaya Yetkili Laboratuvar) ile birlikte yürütülmektedir.

*Biyolarvasit (Bacillus thuringiensis subs. israelensis ve Bacillus sphaericus) etkinliğinin laboratuvar değerlendirme protokolü:*

*Bacillus thuringiensis subs. israelensis (Bti) ve Bacillus sphaericus (Bs) bakterisinden hazırlanan süspansiyon formülasyonu ile biyolarvasitin biyolojik etkisinin laboratuvar koşullarında etkinliğinin değerlendirme protokolü Dünya Sağlık Örgütü'nün sivrisineklere özel larvasitlerin laboratuvar ve arazi değerlendirme işlemlerinin Yürütme Yöntemi ile aynıdır.*

Çalışmanın amacı: Bu çalışmanın amacı, incelenen Biyolarvasitin test kapları içerisindeki 3.-4.dönem Sivrisinek Larvalarına karşı etkisini ve sürekliliğini test ederek değerlendirmektir (Anopheles, Aedes veya herhangi bir Culex cinsi sivrisinek larvası olabilir).

Test için Gerekli Malzemeler:

- Sivrisinek larvaları (belirli 3-4. dönem laboratuvar şartlarında üremiş sivrisinek larvaları (referans suş veya alandan toplanan sivrisinekler)
- 100 litrelik şeffaf beyaz polietilen su deposu
- 12 Adet 20-40 cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip cam veya plastik kap

- musluk suyu.
- Termometre, pH metre
- Normal oda sıcaklığı ve doğal fotoperiyot. (doğal fotoperiyot sağlamak için test kaplarını uygulamadan önce odada yerleştirin)
- Kayıt formları.

Test yöntemi:

I. Laboratuvar değerlendirme testinden önce “Toksik Etki Test Kontrolü” yapılması gerekmektedir. 10 litre musluk suyu içeren cam kavanoz veya plastik kap hazırlanıp yukarıda yazılı çevresel koşullara sahip olan bir oda içinde yerleştirilir. Toksin kontrolü yapmak için testten 72 saat önce, hedef sivrisinek larvalarından 10 adet 3. dönem larva ekleyerek 24 saat içinde ölme kontrolü yapılır. Ölüm sayısı %80'den fazla olduğunda, toksik etkinin olduğu kabul edilir.

## II. Biyolarvasitin larvasit etkinlik değerlendirmesi

Üç takım olarak her bir takımda biri şahit olmak üzere 3 ayrı 15 litre hacimli temiz ve kullanılmamış dört adet cam kavanoz veya plastik kap hazırlanır. Bu kaplara önceden 24 saat dinlendirilmiş musluk suyu doldurulup yukarıda yazılı şartlara uygun ortama yerleştirilir. Biyolarvasit uygulanmadan 24 saat önce her bir kaba 25 Adet 3. - 4. dönem larva eklenir. Not: Testlerde üçüncü ve dördüncü dönem larvalar kullanılmalıdır. Larvalarda herhangi bir anormallik işareti, örneğin parazitlerin varlığı nedeniyle veya küçük boyutlu, arızalı veya hasarlı larvalar sağlıklı larvalar ile değiştirilmelidir.

\*Test kaplarının yüzey alanlarının yüzölçümü hesaplanarak kayıt altına alınır.

\*Birinci Takımdaki herbir test kabına m<sup>2</sup> ye 0,03 ml (300 ml/Ha) su yüzeyine Biyolarvasit uygulanır

\*İkinci takımdaki her bir test kabına m<sup>2</sup> ye 0,05 ml (500 ml/ha) su yüzeyine Biolarvasit uygulanır.

\*Üçüncü takımdaki her bir test kabına m<sup>2</sup> ye 0,07 ml (700 ml/ha) su yüzeyine Biolarvasit uygulanır.

• İlk değerlendirme, Biolarvasit uygulamadan 24 saat önce her bir test kabına bırakılan 50 adet Üçüncü dönem larvaların uygulamadan 24 saat sonra ölüm sayıları tesbit edilerek ve kayıt altına alınarak yapılır.

•Şahit Test kabında bulunan larvalar aynı zamanda sayılarak kayıt altına alınır.

### III. Ölçme

- Uygulamadan sonra larva ölümlerinin kayıt altına alınması,
- Suyun fiziksel ve kimyasal (pH ve sıcaklık). parametrelerinin kayıt altına alınması (Test kabındaki su sıcaklığı 25-28 °C, suyun pH'ı 6-8 arasında olmalıdır)
- Ortamın sıcaklığının kayıt altına alınması.(Ortam Sıcaklığı 24-34 °C arasında olmalıdır).
- Fotoperiyot süresi 12 saat aydınlık 12 saat karanlık şeklinde olmalıdır

### IV. Sonucun Değerlendirilmesi

Larva ölüm yüzdesini hesaplamak için, ölüm halinde olan larvalar ölü sayısında düşünülmelidir.

• Şahit larvalarda ölüm yüzdesi %5-20 arasında ise uygulama yapılmış olan larva gruplarının ölüm sayısı Abbott formülüne göre düzeltilmelidir:

•Test sırasında pupa haline gelmiş larvaların çıkarılması gerekmektedir. Test sırasında larvalardan yüzde 10 fazlası pupa haline dönüşmüş olursa, testin tekrarlanması gerekir.

•Şahit larvaların ölüm yüzdesi %20 ve üzerinde olursa O takıma ait testin tekrarlanması gerekmektedir.

•Ölüm yüzdesi ortalaması %80 nin altında bulunan Takımın test sonucu uygulanan dozun etkisiz olduğu kayıt altına alınır.

Ölü larvalar boyun bölgesine iğne vurulduğu zaman hareketsiz olan larvaları ifade eder.

\*\* Ölüm halinde olan larvalar (makul sürede) su yüzeyine ulaşamayan larvaları ifade eder. Bu larvalarda, bundan önce renk değişimi, anormal pozisyonlar, koordinasyon eksikliği gözlemlenir.

### 3.2.5 Biyoreaktör denemesi

EÜ “Biyomühendislik Bölümü *Bacillus* Koleksiyonu”nda yer alan *Bacillus thuringiensis* Bt 1i ve *B. thuringiensis* Bt 7i kodlu izolatlar ile endospor üretim denemesi yapılmıştır.

Fermentör üretimine geçmeden önce bu suşlar ile erlenlerde endospor üretim denemeleri yapılmıştır. Literatür çalışmaları sonucu endospor üretimini teşvik edici belirtilen ortamlardan T-3 ortamı, üretim ortamı olarak seçilmiştir. 500 ml erlenlerde 100 ml çalışma hacminde çalışılmıştır.

% 2 oranında aşı miktarıyla çalkalayıcıda 150 rpm'de üretim yapılmıştır. İnokulum ortamı nutrient broth tercih edilmiş olup aşı 24 saat 30 °C inkübasyon sonucu elde edilmiştir. Çalkalayıcıda ne kadar süre üretim yapılacağına kararı ise erlenlerden her gün alınan örneklerden hazırlanmış preparatların Commasie Brilliant Blue Çözeltisi ile boyanması ile yapılan mikroskopik gözlemler sonucu belirlenmiştir.

Erlenlerle laboratuvar ölçeğinde yapılan üretimlerin ardından biyoreaktör çalışmasına geçilmiştir. Bt 7i suşu için 3 lt'lik fermentörde 1 lt çalışma hacminde, Bt 1i suşu için 5 lt 'lik fermentörde 3lt çalışma hacminde üretim yapılmıştır.

Biyoreaktör üretiminde T-3 ortamı için, 121 °C'de 30 dakikada sterilizasyon yapılmıştır. Sterilizasyonun ardından ortam, uygun sıcaklığa geldikten sonra % 2 oranında 24 saatlik aşı inoküle edilmiştir. Üretim koşulları yine belirlenen optimum rpm ve sıcaklıkta, optimum fermentasyon süresinde gerçekleştirilmiştir. Oksijen 2 l/l havalandırma ve karıştırma 150 rpm ayarlanarak sabit tutulmuştur. Köpürme olmaması için üretim ortamına köpük kırıcı olarak silikon bazlı köpük kırıcı ilave edilmiştir.

Her bir fermentasyon sonunda örnek alınarak endospor sayımı yapılmıştır. Organizmanın oksijen tüketim profili belirlenmiştir. Bu profile göre fermentasyon boyunca ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonunun % 30 ve % 50 değerlerinin altına inmeyecek şekilde havalandırma ve karıştırma hızı ayarlanarak yapılan endospor üretimleri gerçekleştirilmiştir. pH ise T-3 ortamının gerektirdiği şekilde (pH:6.8) ayarlanmıştır.

Üretim sonlandırılmasının ardından ortamdan santrifügasyon işlemi ile endosporlar ayrılmıştır ve kurutma işlemi yapılmıştır. Liyofilizasyon yöntemi ile kurutma için endosporlar fermentasyon ortamından ayrıldıktan sonra bir gece -20 °C) sıcaklıkta bekletildikten sonra liyofilizatöre konmuştur.

CHRIST Freeze Dryer Model BETA 2- 8 LD Plus liyofilizatör kullanılarak örnek hacmine bağlı olarak seçilen sürelerde kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kurutma işleminin ardından aseptik koşullarda homojenizasyon gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.6 Biyolojik Etkinliğine göre seçilen *Bacillus* izolatının laboratuvar ölçeğinde endospor üretim optimizasyonu**

Biyolojik etkinlik denemeleri yapılan izolatlardan mortalite oranı yüksek olan bir izolat seçilmiştir. 3.2.3.1’de açıklandığı şekilde daha önceden yapılan denemelerle seçilen ve endospor ve toksin protein üretimini en hızlı ve fazla olarak sağlayan ortamda, seçilen bu izolat için üretim yapılmıştır. Bu ortam kullanılarak izolat için üretim süresi belirlenmiştir. Sürenin belirlenmesinin ardından pH, inokulum miktarı ve ortamdaki karbon (C) kaynağını faktör olarak kabul ettiğimiz RSM çalışması yapılmıştır.

#### **3.2.6.1 Üretim süresinin belirlenmesi çalışması**

Üretim süresi üzerinde yapılan denemeler, üretim süresinin üretim ortamına göre de değiştiğini göstermiştir. Bu durumlar göz önünde bulundurularak seçilen üretim ortamı kullanılarak erlenlerde üretilip üzerinde biyolojik etkinlik testi denenerek yüksek mortalite yeteneğine sahip olduğu gözlenen biyolojik olarak etkinliği belirlenmiş suş üzerinde üretim süresi denemesi yapılmıştır. Bu çalışmada en uygun ve kısa sürede spor üretiminin sağlandığı ortamın tespit edilmesinden sonra (3.2.3.1) 150 rpm ve 30 °C koşullarında laboratuvar ölçeğinde seçilen organizma için üretime başlanılmış ve her gün aynı saatte olmak üzere aseptik koşullarda örnek alınarak hem canlı hem spor sayımları yapılmıştır.

#### **3.2.6.2 Optimizasyon için diğer parametrelerin belirlenmesi çalışması**

Spor üretimi için en uygun ortam (3.1.2.1’de içeriği verilen) ve sürenin belirlenmesinin (3.2.6.1) ardından biyolojik olarak etkin izolat üzerinde endospor miktarını artırıcı optimizasyon denemeleri yapılmıştır. Seçilen *Bacillus* izolatının maksimum endospor üretimlerinin gerçekleştirilmesi için çalışmamızda optimize edilmesi planlanan değişkenler: inokulum miktarı (%), pH, C kaynağı oranı (%) olarak belirlenmiştir (Chauhan and Gupta, 2004; Naveena et al., 2005; Aouadhi et al., 2013; Oskouie et al., 2008; Tanyildizi vd., 2005; Tokcaer vd., 2006). Yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak optimizasyon şeması hazırlanmıştır.

Şema hazırlanırken kullanılan RSM yönteminin gerektirdiği deney tasarımı ve ilgili tüm matematiksel ve istatistiksel analizler Design-Expert 9.0.0 programı ile gerçekleştirilmiştir.

### \*Set için deney tasarımı ve analizler

Design expert programı, deneylere dayanan çalışmalarda kısa zamanda güvenilir ve geniş kapsamlı sonuçlara ulaşmayı sağladığından dolayı optimizasyon çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir programdır ve özellikle biyoproses çalışmalarında bir çok faktörü bir arada ve az sayıda denemelerle karşılaştırma imkanı verdiği için dolayı büyük önem taşımaktadır. Ayrıca bağımsız verileri ortak noktalarda kesiştirerek üretim için uygun koşulları ifade etmede bu programdan yararlanılmaktadır (Mandenius et al., 2008).

Sette optimize edilecek parametreler inokulum miktarı, pH ve C kaynağıdır. Dolayısıyla, RSM analizi için deney tasarımı olarak, merkezde 6 tekrarı içeren  $2^3$ -tam faktöriyel merkezi kompozit tasarımı (" $2^3$ -full factorial central composite design, CCD") uygun bulunmuştur. Tasarım parametrelerinin programa girilmesinin ardından, merkezde 6 tekrarlı deney ile toplam 20 deney setinden oluşan aşağıdaki tasarım elde edilmiştir.

Select	Std	Run	Factor 1 A:Inokulum	Factor 2 B:C kaynagi	Factor 3 C:pH	Response 1 spore
12	1	1	5.00	3.52	6.00	
	2	2	8.00	1.00	4.00	
	8	3	8.00	3.00	8.00	
	4	4	8.00	3.00	4.00	
	20	5	5.00	2.00	6.00	
	14	6	5.00	2.00	9.05	
	11	7	5.00	0.48	6.00	
	17	8	5.00	2.00	6.00	
	9	9	0.43	2.00	6.00	
	16	10	5.00	2.00	6.00	
	10	11	9.57	2.00	6.00	
	7	12	2.00	3.00	8.00	
	18	13	5.00	2.00	6.00	
	1	14	2.00	1.00	4.00	
	6	15	8.00	1.00	8.00	
	3	16	2.00	3.00	4.00	
	5	17	2.00	1.00	8.00	
	19	18	5.00	2.00	6.00	
	15	19	5.00	2.00	6.00	
	13	20	5.00	2.00	2.95	

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Kimyasal mücadelenin getirdiği tüm olumsuzluklar sebebiyle, dünyanın birçok ülkesinde biyolojik mücadelenin önemi anlaşılmış ve bu doğrultuda yapılan çalışmalar sonucunda sivrisinek kontrolünde *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* (Bti) ve *Bacillus sphaericus* (Bs) bakterilerinin biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabilecekleri farkedilmiştir. Sivrisinek larvaları üzerine öldürücü etki gösteren bu bakteriler minimum çevresel riskleri, hedef türe spesifik oluşları ve yüksek etki oranı gibi özellikleri ile sivrisinek kontrol çalışmalarında kullanılan pestisitlerin alternatifi olarak görülmektedirler. Aynı zamanda bu bakterilerin sporlarını ve toksinlerini içeren ticari formülasyonların uzun raf ömürleri ve kolay uygulama koşulları sayesinde, günümüzde dünyanın bir çok ülkesinde sivrisineklere karşı yapılan kontrol çalışmalarında Bs ve Bti bakterileri yaygın olarak kullanılmaktadır.

### 4.1 *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* Suşlarının İzolasyon Çalışması

Çalışmamızda kullanılan mikroorganizmaların izolasyonunda öncelikle Ege Bölgesi'nden daha önce biyoinsektisit (biyolarvasit) uygulaması yapılmamış olan su birikintisi, çamur, bataklık, gölet, çiftliklerden hayvan yıkama suları, ağaçlıkalanlar gibihabitatlardan gelen su, çamur ve toprak numuneleri kullanılmıştır (Şekil 4.1). Bu kaynaklardan endotoksin üreten *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* türlerinin izolasyonu yapılmıştır.

İzolasyonun yapılacağı kaynakların özellikle Ege Bölgesi'nden seçilmesinin sebebi, bu bölgenin çalışmamız için kaynak sağlayan firma çalışanları tarafından oldukça iyi tanınmasıdır. Bu sayede daha önce ticari biyoinsektisit uygulaması yapılmamış olan yerlerden numuneler sağlanmıştır. Böylece çalışmanın sonucunda biyoinsektisit özelliği olduğu görülen suşun ticari bir ürün olmadığından emin olunulmuştur.

Çalışmada bakterilerin elde edileceği numuneler kaynaklarına göre ayrılarak 18 grup oluşturulmuştur.



Asetatlı seçim yöntemi ile elde edilen izolat sayısı 1097 olmak üzere toplamda **1574** adet izolat elde edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan tüm izolatların kaynakları ve kodları, sayıları ile birlikte Çizelge 3.1’de verilmiştir. İzolasyon işlemi ise Şekil 3.1’de özetlendiği ve 3.2.1’de açıklandığı şekilde sodyum asetat içeren Luria Bertani Broth ortamında yapılmıştır. *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus*’un (Travers et al., 1980) 0,25 M sodyum asetat varlığında çimlenmelerinin inhibe olması nedeniyle bu izolasyon yöntemi ile incelenen numunelerden büyük olasılıkla hedeflediğimiz *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* suşlarının izole edilmiş olduğu düşünülmektedir (Vettori et al., 2003).

Çalışmada bakterilerin nerelerden izole edileceğine literatür çalışmaları sonucu karar verilmiştir. Bu konuda gerek yurt içinde gerekse yurt dışında geniş çalışmalar bulunmaktadır. Yurt içi ve bölgesel kaynaklardan izolasyon çalışmalarına örnek olarak Aslım ve ark., 2002’de yayınlanan çalışmaları incelendiğine istenilen *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının izolasyon çalışmalarında Ankara’nın Elmadağ, Çubuk, Gölbaşı, Haymana, Polatlı ve Kazan ilçelerinde bulunan otlakların 0-15 cm. aralığındaki tabakalardan örnekler alındığı görülmektedir.

Yurt dışı çalışmalar incelendiğinde ise daha çok numune kaynaklarına göre gruplandırma yapıldığı görülmektedir. Çalışmalar daha çok gölet, bataklık, ağaçlık alan (Massie et al., 1985), sulak alan dere kenarı, tarımsal alan gibi bölgelerden alınan örneklerle sürdürülmüştür (Surendan et al., 2011; Keshavarzi, 2008).

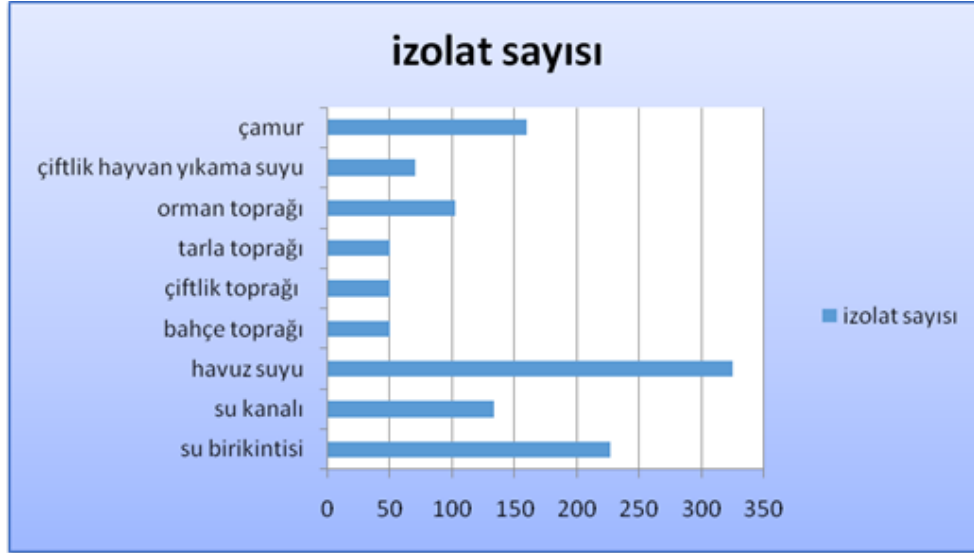
Yurt dışında bölgesel bir çalışmaya örnek olabilecek nitelikteki Irıarte ve arkadaşlarının 1998 yılındaki çalışmalarında kaynak olarak biraz daha farklı olan (ekilmemiş tarımsal alanlar, tahıl depolarının atıkları, ölü böcekler) numuneler kullanılmıştır.

Park ve arkadaşlarının 2008 yılında biyoinsektisit özellik taşıyan *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* suşlarının izolasyonuna dayanan çalışmalarında da izolasyonun sağlanacağı örnekler; su birikintisi, bataklık, çamur, gölet, ağaçlık alan ve hendek gibi alanlardan sağlanmıştır (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1** Park ve ark., *Bacillus* türlerine yönelik izolasyon çalışmasında kullandığı kaynaklar

Numune Alınan Yer/Cinsi	Örnek Sayısı
hendek	34
tuz bataklığı	8
su birikintisi	2
bataklık	5
ormanlık	3
gölet	7
bodur alanlar	5
sulak alan	2
derin çukur alanlar	1
kirli alanlar	1
dere kenarı	1
yağmur suyu drenajı	1
ağaç kökü çukurlukları (çotuk)	1
havza	1

Çalışmamızda *Bacillus*ların izolasyonunda faydalanılan doğal kaynakları çeşitlerine göre gruplandırıp her çeşit gruptan edinilen izolat sayısına göre dağılımı Şekil 4.1’de verilmiştir.



**Şekil 4.1** *Bacillus*ların izolasyonunda faydalanılan doğal kaynakların çeşitlerine göre izole edinilen izolat sayısı

## 4.2 *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* Suşlarının Tanımlanması

*Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının tanımlanmasında bu suşlara ait endospor ve toksin protein oluşturma özelliklerinden yararlanılmıştır. Ayrıca bu türlerin ayırt edilmesine yarayan bazı biyokimyasal testler de uygulanmıştır.

Literatürler incelendiğinde *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının diğer türlerden ayrımında morfolojik izlenimlerden (Keshavarzi, 2008) ve bazı biyokimyasal testlerden ((Foda et al., 2010; Thiery and Frachon, 1997; Keshavarzi, 2008) faydalandığı görülmektedir.

Thiery ve Frachon (1997) bu konu üzerinde detaylı bir inceleme yapmış ve türlerin ayrımına dayanan hem morfolojik hem de biyokimyasal testleri derlemişlerdir.

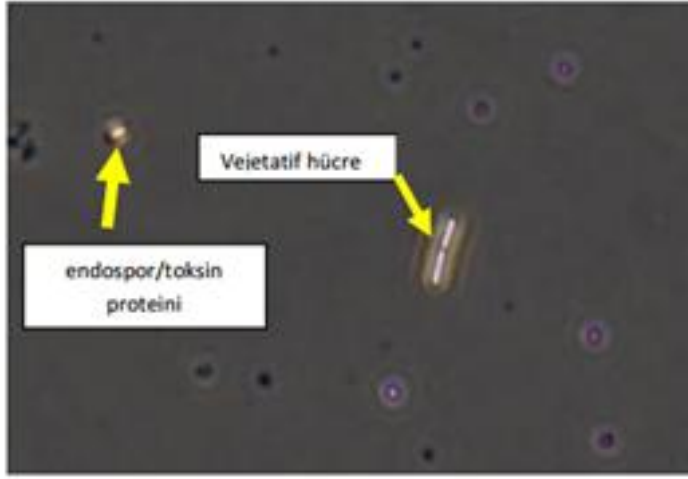
*Bacillus*ların proteolitik ve antimikrobiyal özellikleri kullanılarak da bazı tanımlama çalışmalarının yapıldığı görülmektedir (Aslım vd., 2002). Aynı ekibin *Bacillus*lar üzerinde moleküler tanımlama çalışmalarına da rastlanmıştır.

*Bacillus*ların tanımlama çalışmalarında öncelikle kolay ve hızlı sonuç alınabilmesinden dolayı, genellikle morfolojik tanımlama (Park et al., 2008) çalışmalarına yönelinmiştir. *Bacillus*ların Gram (+) özelliğinden de faydalanılarak bu türler için tanımlama çalışması yapılmıştır (Park et al., 2008).

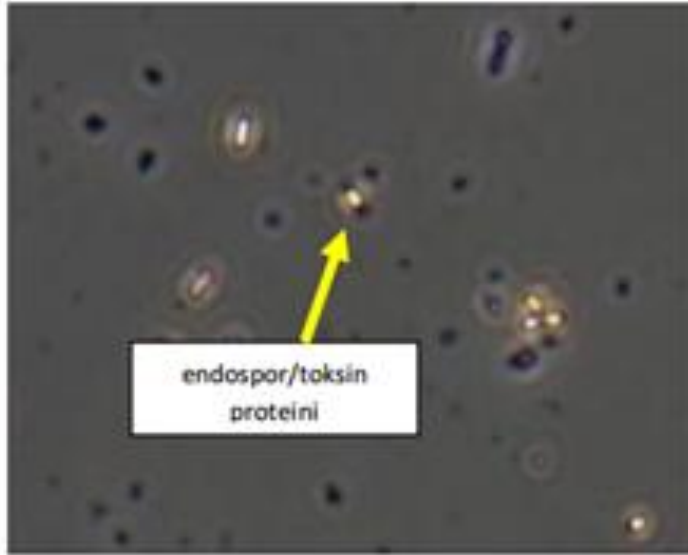
Günümüzde bu türler üzerinde moleküler tanımlama çalışmalarına da (Içgen vd., 2002; Doruk ve ark., 2013; Özkan ve ark., 2002; Nalçacıoğlu, 1998; Vachon et al., 2012; Bravo et al, 2007; Iriarte et al., 2007; Avisar et al., 2009; Go 'mez et al., 2007; Park et al., Thomas et al., 1983) yoğunlaşmıştır.

### 4.2.1 Işık mikroskobu ve faz kontrast mikroskobu incelemeleri

Çalışmamızda izole edilen izolatların mikroskobik olarak endospor ve endotoksin varlığı hem ışık mikroskobu hem de faz kontrast mikroskobu ile gözlenmiştir. Asetatlı seçilim yöntemi ile izole edilen 1097 adet izolatın 850 tanesi için faz kontrast mikroskobunda toksin protein içerip içermediğine bakılmış ve bazı izolatlara ait faz kontrast mikroskobundan alınan görüntüler Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

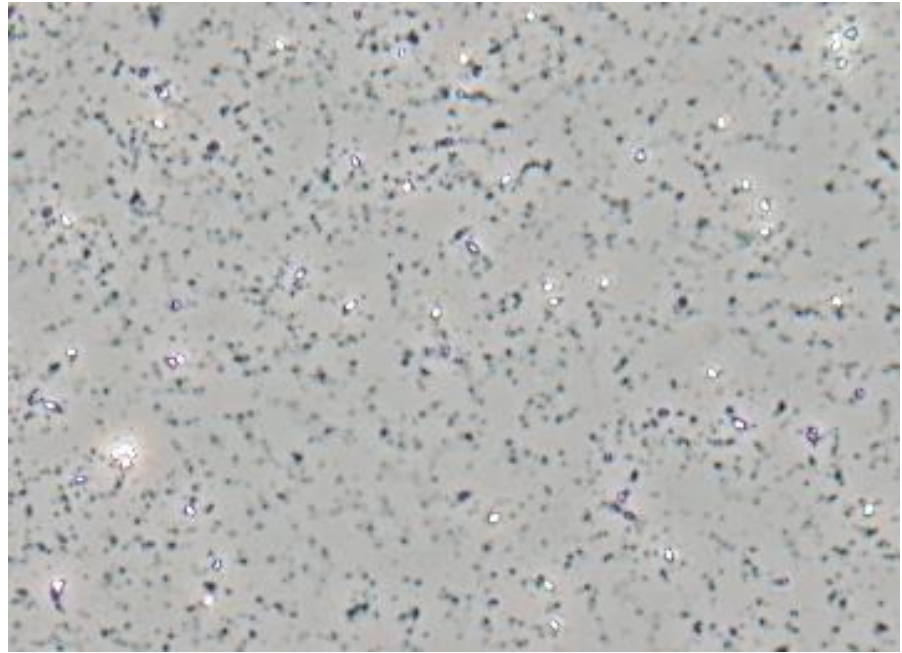


*Bacillus sp. 3-K-S-45* izolatu

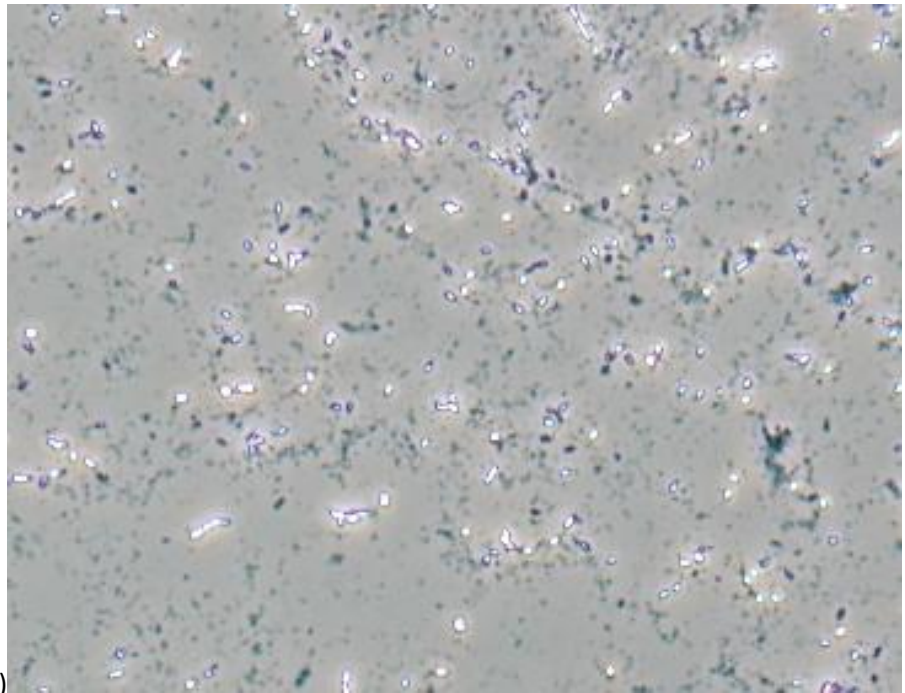


*Bacillus sp. T-3-9* izolatu

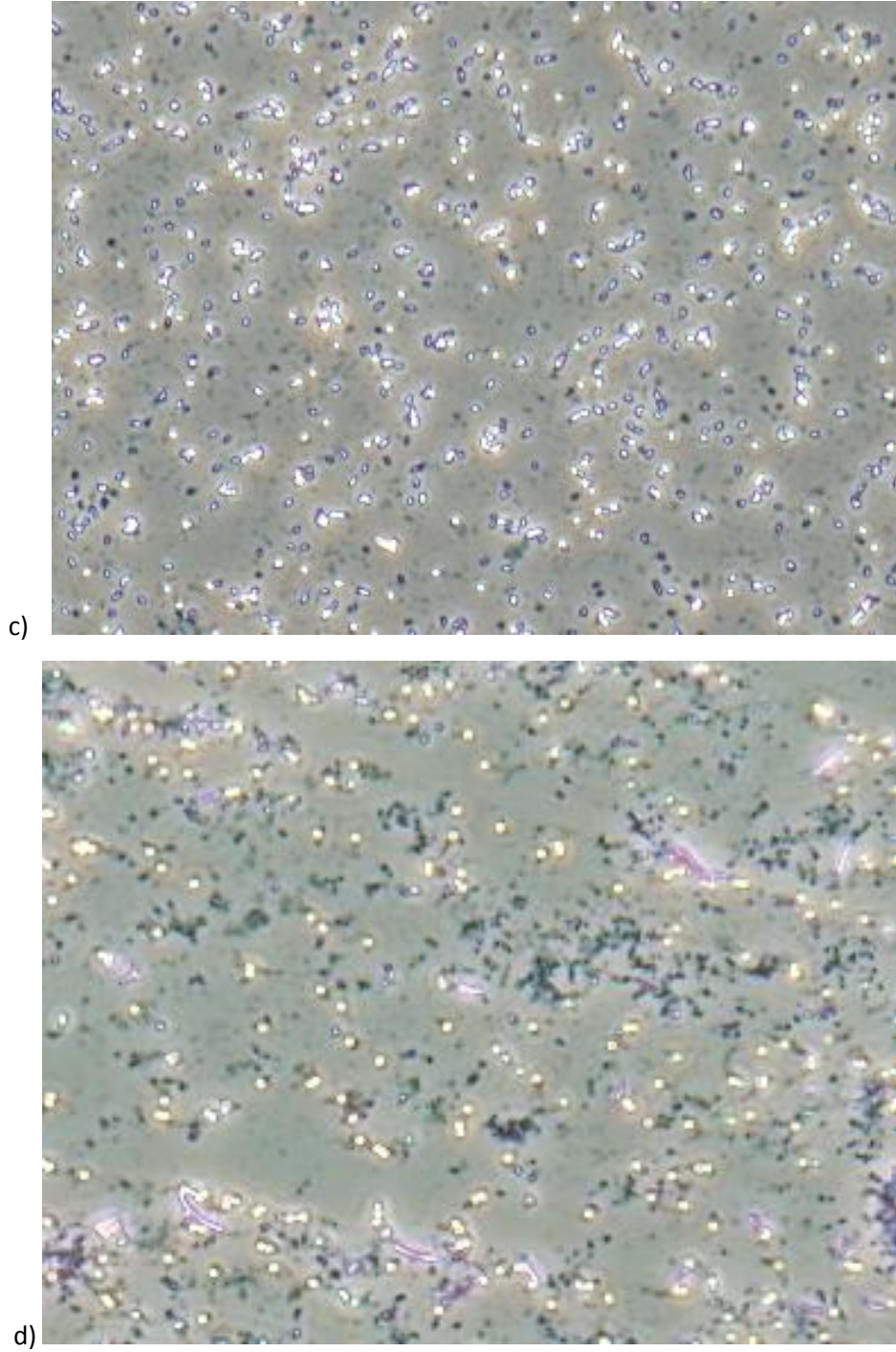
**Şekil 4.2** Su örneklerinden Şekil 3.1'deki yöntemle izole edilen çeşitli *Bacillus* izolatlarına ait faz kontrast mikroskobunda boyanmamış endospor ve ucunda koyu mavi renkli boyanmış toksin proteini



a)



b)

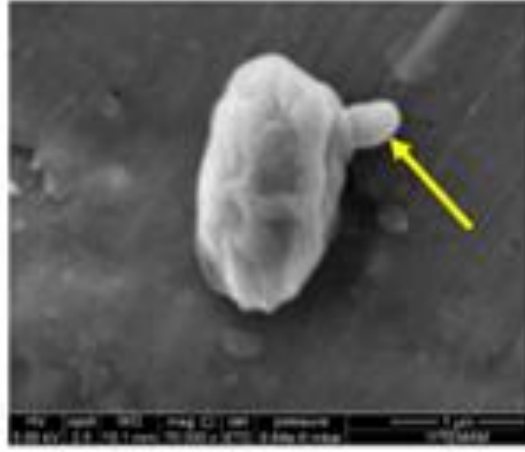


**Şekil 4.3** Çeşitli Bacillus izolatlarına ait faz kontrast mikroskobu görüntüleri; **a)** Ö-4-40 kodlu izolata ait faz kontrast görüntüsü; **b)** Ç-1-27 kodlu izolata ait faz kontrast görüntüsü; **c)** Ç-2-20 kodlu izolata ait faz kontrast görüntüsü; **d)** K-8-18 kodlu izolata ait faz kontrast görüntüsü.

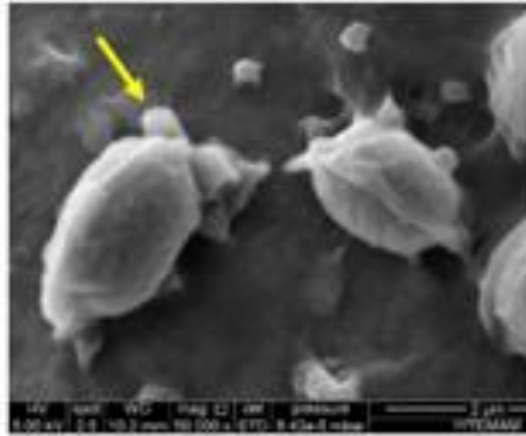
#### 4.2.2 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)

Bu çalışma kapsamında çeşitli su örneklerinden izole edilen bazı izolatların (*Bacillus sp.* T-2-20, *Bacillus sp.* T-3-9, *Bacillus sp.* 3-K-S-45 ve *Bacillus sp.* Ö-2-70) faz kontrast mikroskopunda incelenmesinden sonra taramalı elektron mikroskopunda incelemeleri yapılarak görüntüler alınmıştır.

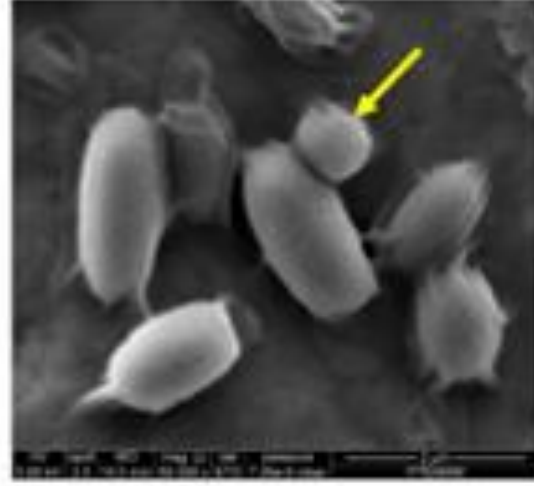
Bazı izolatların SEM görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir. Şekil 4.4'teki oklar, endospor halindeki *Bacillus*ların toksin proteinini işaret etmektedir.



T-2-20



T-3-9



3-K-S-45



Ö-2-70

**Şekil 4.4** Su örneklerinden Şekil 3.1'deki yöntemle izole edilen çeşitli *Bacillus* izolatlarına ait SEM mikroskobunda endospor ve toksin proteini

#### 4.2.3 Biyokimyasal testler

Çalışmada elde edilen izolatların içinden *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* ve *B. sphaericus* suşlarını seçebilmek amacıyla bu suşlara özgü biyokimyasal özelliklerden faydalanılmıştır. İzolasyon işleminin ardından faz kontrast ve elektron mikroskobu gibi morfoloji ayırımına dayanan yöntemlerden faydalanılmıştır.



Ayrıca ek olarak nitrat indirgenmesi, anaerobik kültürleme, tirozin hidrolizi, karbohidrat metabolizması (şeker indirgenmesi) gibi bir çok farklı biyokimyasal (Foda et al., 2010; Thiery and Frachon, 1997; Keshavarzi, 2008; Massie et al., 1985) testler de yapılmıştır. Çizelge 3.2’de belirtilen testlerin uygulanması ile alınan sonuçlarla *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının ayırt edilmesi hedeflenmiştir.

#### **4.2.3.1 Şeker fermentasyon testleri**

Bir bakteri hücresinde hangi şekerleri fermente edebilen metabolizmanın bulunduğu o bakteri suşu için identik değer taşır (Aydın, M., 2004). Literatür çalışmaları sonucunda istenilen organizmaların metabolizmasına göre de nişasta, gliserol ve glukoz ile şeker fermentasyon testlerinin yapılacağı kararlaştırılmıştır (Foda et al., 2010; Thiery and Frachon, 1997; Keshavarzi, 2008).

Mikroorganizmalar ATP sentezi için çok çeşitli enerji kaynaklarını kullanabilirler. ATP sentezinde kimyasal ve ışık enerjilerinin her ikisi de kullanılabilir. Kimyasal maddeler organik ve inorganik maddelerdir. Bu maddeler enerji kaynağı olarak kullanıldığında hem elektron donörü hem de elektron akseptörü olarak iş görebilirler (Tamer vd.,1989).

İlk elektron vericisi ve son elektron alıcısı organik madde olan ve enerji veren reaksiyona *fermentasyon* denir. Fermentasyon tipik olarak oksijen yokluğunda yani anaerobik olarak oluşur. Herhangi bir karbonhidratın fermente edilip edilememesi, mikroorganizmanın içerdiği enzimlere bağlıdır (Tamer vd.,1989).

Şekil 3.1’de şematize edilen asetatlı seçilim yöntemi ile izole edilen ve 3.1.2.1’de içeriği verilen NYSM ortamı ile (Foda et al., 2010) üretilip 3.2.3.2 ve 3.2.3.3’te açıklanan şekilde elde edilen endosporların biyolojik etkinlik testlerinin (3.2.4) uygulanmasının ardından yanıt alınan bazı izolatlar üzerinde şeker fermentasyon testleri denenmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 ; Çizelge 4.2; 4.3; 4.4).

Alınan sonuçlara göre tabloda yazan değerlerin ifadesi şöyledir:

- Renk kategorisinde:

**Açık sarı** = pH ≤ 5.5 (ortamda asitlik fazla)

**Sarı** = pH < 5.5 (ortamda asitlik var)

**kırmızı** = pH = 7 (ortamda asitlik yok)

**pembe** = pH ≥ 7.5 (ortamda baziklik var)

- Üreme kategorisinde:

*Var* = Tüplerde üreme vardır.

*Yok* = Tüplerde üreme yoktur.

- .. Gaz kategorisinde:

*Var* = Durham tüplerinde gaz kabarcığının görülmüştür.

*Yok* = Durham tüplerinde gaz kabarcığının görülmemiştir.

- .. Asit kategorisinde:

*Var* = Tüplerde renk değişimine dayalı asit üretimi vardır.

*Yok* = Tüplerde renk değişimine dayalı asit üretimi yoktur.

- SONUÇ kategorisinde:

*Pozitif* = Tüplerde bulunan organizmalar, ortamdaki şekeri fermente edebilmektedirler.

*Negatif* = Tüplerde bulunan organizmalar, ortamdaki şekeri fermente edememektedir.

Şeker fermentasyon testi denenen izolatlardan elde edilen sonuçlar, aşağıda şeker kaynaklarına göre gruplandırılmış halde verilmektedir (Çizelge 4.2.; 4.3; 4.4).

### Nişasta fermantasyon testinin sonuçları

Çizelge 4.2 Çeşitli *Bacillus* izolatlarına uygulanan nişasta fermantasyon testi sonuçları

<b>İzolat kodu</b>	<b>Renk</b>	<b>Üreme</b>	<b>gaz oluşumu</b>	<b>asit üretimi</b>	<b>SONUÇ</b>
<i>Bacillus sp. B-2-8</i>	açık sarı	Var	Yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. Ö-4-35</i>	Kırmızı	Var	Yok	yok	Negatif
<i>Bacillus sp. Ö-4-37</i>	açık sarı	Var	Yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. Ö-4-78-b</i>	açık sarı	Var	Yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-2-24</i>	Pembe	Var	Yok	yok	Negatif
<i>Bacillus sp. Ö-4-49-c</i>	Sarı	Var	Yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. K-6-36</i>	açık sarı	Var	Yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-1-25</i>	açık sarı	Var	Yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-1-11</i>	açık sarı	Var	Yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-2-18</i>	Kırmızı	Var	Yok	yok	Negatif
<i>Bacillus sp. B-2-4</i>	Sarı	Var	Yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-2-12</i>	açık sarı	Var	Yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. K-6-3</i>	Kırmızı	Var	Yok	yok	Negatif
<i>Bacillus sp. Ö-5-7</i>	Kırmızı	Var	Yok	yok	Negatif
<b>KONTROL</b>	Kırmızı	Yok	Yok	yok	Negatif

### Gliserol fermantasyon testinin sonuçları

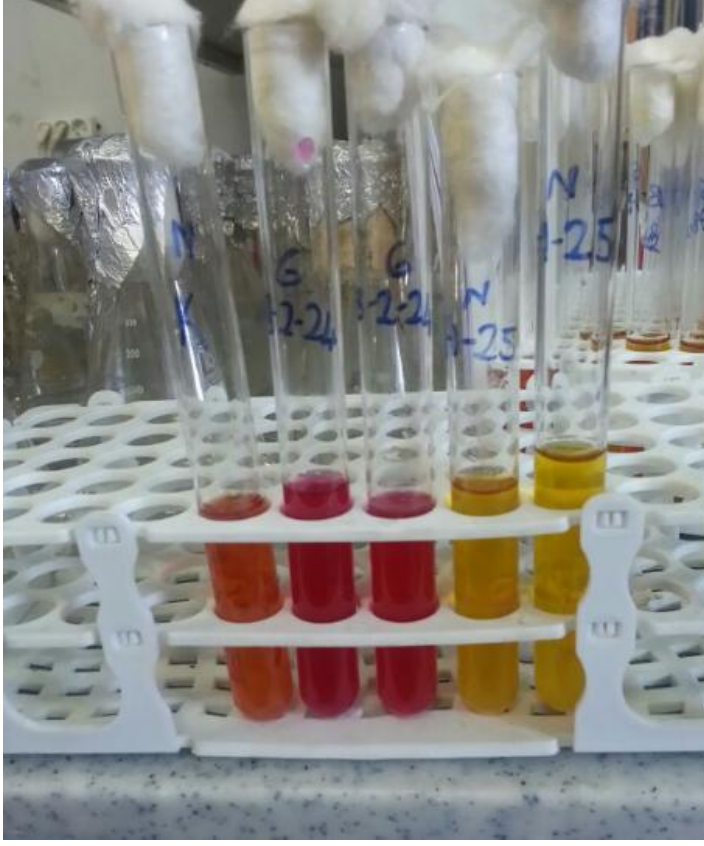
Çizelge 4.3 Çeşitli *Bacillus* izolatlarına uygulanan gliserolfermantasyon testi sonuçları

izolat kodu	Renk	üreme	gaz oluşumu	asit üretimi	SONUÇ
<i>Bacillus sp. B-2-8</i>	açık sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. Ö-4-35</i>	Kırmızı	Var	yok	yok	Negatif
<i>Bacillus sp. Ö-4-37</i>	açık sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. Ö-4-78-b</i>	açık sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-2-24</i>	Pembe	Var	yok	yok	Negatif
<i>Bacillus sp. Ö-4-49-c</i>	açık sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. K-6-36</i>	açık sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-1-25</i>	açık sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-1-11</i>	açık sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-2-18</i>	açık sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-2-4</i>	açık sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-2-12</i>	açık sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. K-6-3</i>	Sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. Ö-5-7</i>	Kırmızı	Var	yok	yok	Negatif
<b>KONTROL</b>	Kırmızı	Yok	yok	yok	Negatif

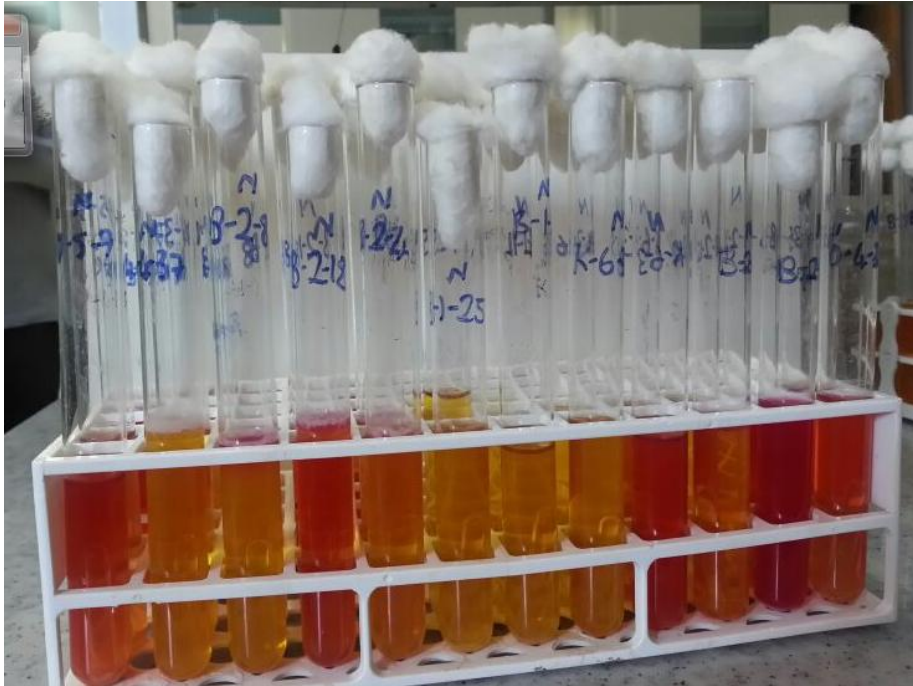
### Glukoz fermantasyon testinin sonuçları

Çizelge 4.4 Çeşitli *Bacillus* izolatlarına uygulanan glukoz fermantasyon testi sonuçları

izolat kodu	Renk	Üreme	gaz oluşumu	asit üretimi	SONUÇ
<i>Bacillus sp. B-2-8</i>	açık sarı	Var	yok	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp. Ö-4-35</i>	koyu sarı	Var	yok	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp. Ö-4-37</i>	açık sarı	Var	yok	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp. Ö-4-78-b</i>	Sarı	Var	yok	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-2-24</i>	Sarı	Var	yok	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp. Ö-4-49-c</i>	Sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. K-6-36</i>	Sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-1-25</i>	Sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-1-11</i>	Sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-2-18</i>	Sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-2-4</i>	Sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. B-2-12</i>	Sarı	Var	yok	var	Pozitif
<i>Bacillus sp. K-6-3</i>	Kırmızı	Var	yok	az	Negatif
<i>Bacillus sp. Ö-5-7</i>	Kırmızı	Var	yok	az	Negatif
<b>KONTROL</b>	Kırmızı	Yok	yok	yok	Negatif



Şekil 4.5 Çeşitli *Bacillus* izolatlarına uygulanan şeker fermantasyonu testinin sonuçları-I



Şekil 4.6 Çeşitli *Bacillus* izolatlarına uygulanan şeker fermantasyonu testinin görsel sonuçları-

II

#### **4.2.3.2 Tirozin hidroliz testi**

Şekil 3.1’de şematize edilen asetatlı seçilim yöntemi ile izole edilen ve Çizelge 3.3’te içeriği verilen NYSM ortamı ile (Foda et al., 2010) üretilip 3.2.3.2 ve 3.2.3.3’te açıklanan şekilde elde edilen endosporların biyolojik etkinlik testlerinin (3.2.4) uygulanmasının ardından yanıt alınan bazı izolatlar üzerinde tirozin hidroliz testleri denenmiştir (Çizelge 4.5).

Tirozin hidroliz testleri uygulanırken tirozin içeren agarlı petrilere bakterilerin nokta şeklinde ekimleri yapılmıştır, ancak 3.2.2.3’te anlatılan ve testin sonucunun pozitif değerlendirilmesi (Tirozin hidroliz testinde tirozin agara ekim yapılmışsa siyah koloni oluşumu yanında, koloni çevresinde ve altında (agar içerisinde) saydamlaşma görülmesi beklenir) için gereken yanıtlar, bu petrilere alınmamıştır. Bunun üzerine agar içeren ortamlara farklı oranlarda (% 0,1; 0,5; 1) tirozin eklenmesi yapılarak denemeler tekrarlanmıştır. Ancak yine de testin sonucunun pozitif olduğunu gösteren siyah koloni oluşumu ve agarda saydamlaşma gerçekleşmesi gözlenememiştir. Tirozin hidroliz testi, denen tüm izolatlar için negatif olmuştur (Çizelge 4.5.).

**Çizelge 4.5** Çeşitli *Bacillus* izolatlarına uygulanan tirozin hidroliz testinin sonuçları

<b>izolat kodu</b>	<b>siyah koloni oluşumu</b>	<b>koloni çevresinde ve altında (agarda) saydamlaşma gerçekleşmesi</b>	<b>SONUÇ</b>
<i>Bacillus sp. B-2-8</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. Ö-4-35</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. Ö-4-37</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. Ö-4-78-b</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. B-2-24</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. Ö-4-49-c</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. K-6-36</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. B-1-25</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. B-1-11</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. B-2-18</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. B-2-4</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. B-2-12</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. K-6-3</i>	Yok	Yok	Negatif
<i>Bacillus sp. Ö-5-7</i>	Yok	Yok	Negatif
<b>KONTROL</b>	Yok	Yok	Negatif

### **4.2.3.3 Nitrat indirgenme testi**

Şekil 3.1’de şematize edilen asetatlı seçilim yöntemi ile izole edilen ve Çizelge 3.3’te içeriği verilen NYSM ortamı ile (Foda et al., 2010) üretilip 3.2.3.2 ve 3.2.3.3’te açıklanan şekilde elde edilen endosporların biyolojik etkinlik testlerinin (3.2.4) uygulanmasının ardından yanıt alınan bazı izolatlar üzerinde nitrat indirgenme testleri denenmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.7).

Alınan sonuçlara göre tabloda yazan değerlerin ifadesi şöyledir:

- Reagent (ayıraç) A sonrası renk kategorisinde:

*Sarı* = sonuç net değildir, 2. adıma geçilir (reagent B eklenir).

*kırmızı* = sonuç pozitifdir.

- . Reagent (ayıraç) B sonrası renk kategorisinde:

*Sarı* = Test sonucu net değildir, sonraki adıma geçilir.

- . Çinko tozu eklemesinden sonra:

*Sarı* = Test pozitifdir. Bakteri nitratı nitrite redüklemiş, nitrit de başka komponentlerle bağlanmış demektir, yani ortamda nitrat yoktur.

*Kırmızı* = Test negatiftir. Ortamda nitrat vardır ve bu nitrat bakteri tarafından redüklenememiş, çinko tozuyla tepkimeye girdiği için renk değişimi sağlanmıştır.

- Üreme kategorisinde:

*Var* = Tüplerde üreme vardır.

*Yok* = Tüplerde üreme yoktur.

- SONUÇ kategorisinde:

*Pozitif* = Tüplerde bulunan organizmalar, ortamdaki nitratı indirgeyebilmektedirler.

*Negatif* = Tüplerde bulunan organizmalar, ortamdaki nitratı indirgeyemezler.

Çizelge 4.6 Çeşitli *Bacillus* izolatlarına uygulanan nitrat indirgenme testinin sonuçları

izolat kodu	Reagent A sonrası renk	Reagent B sonrası renk	Çinko tozu sonrası renk	tüplerde üreme	SONUÇ
<i>Bacillus sp.</i> B-2-8	Kırmızı	Yok	Sarı	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp.</i> Ö-4-35	Sarı	Sarı	Sarı	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp.</i> Ö-4-37	Kırmızı	Yok	Sarı	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp.</i> Ö-4-78-b	Sarı	Sarı	Kırmızı	Var	Negatif
<i>Bacillus sp.</i> B-2-24	Sarı	Sarı	Kırmızı	Var	Negatif
<i>Bacillus sp.</i> Ö-4-49-c	Sarı	Sarı	Sarı	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp.</i> K-6-36	Sarı	Sarı	Kırmızı	Var	Negatif
<i>Bacillus sp.</i> B-1-25	Sarı	Sarı	Kırmızı	Var	Negatif
<i>Bacillus sp.</i> B-1-11	Sarı	Sarı	Kırmızı	Var	Negatif
<i>Bacillus sp.</i> B-2-18	Sarı	Sarı	Sarı	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp.</i> B-2-4	Sarı	Sarı	Sarı	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp.</i> B-2-12	Kırmızı	Yok	Sarı	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp.</i> K-6-3	Kırmızı	Yok	Sarı	Var	Pozitif
<i>Bacillus sp.</i> Ö-5-7	Sarı	Sarı	Kırmızı	Var	Negatif
KONTROL	Kırmızı	Yok	Yok	Var	Pozitif
	Sarı	Sarı	Sarı	Var	Pozitif
	Sarı	Sarı	Kırmızı	Var	Negatif

Şekil 4.7 Çeşitli *Bacillus* izolatlarına uygulanan nitrat indirgenme testinin görsel sonuçları

#### **4.2.3.4 Anaerobik kültürleme**

Şekil 3.1’de şematize edilen asetatlı seçilim yöntemi ile izole edilen ve Çizelge 3.3’te içeriği verilen NYSM ortamı ile (Foda et al., 2010) üretilip 3.2.3.2 ve 3.2.3.3’te açıklanan şekilde elde edilen endosporların biyolojik etkinlik testlerinin (3.2.4) uygulanmasının ardından yanıt alınan bazı izolatlar üzerinde anaerobik kültürleme testleri denenmiştir (Çizelge 4.7).

Anaerobik kültürleme testi, diğer biyokimyasal testlerle birlikte *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının ayırımında önem taşımaktadır (çizelge 3.2). Anaerobik kültürleme testi, 3.2.2.3’te anlatıldığı şekilde uygulanmış olup sonuçlar aşağıda Çizelge 4.7’de verilmiştir.

**Çizelge 4.7** Çeşitli *Bacillus* izolatlarına uygulanan anaerobik kültürleme testinin sonuçları

<b>İZOLAT KODU</b>	<b>Aerobik</b>	<b>Anaerobik</b>	<b>Fakültatif Aerobik</b>	<b>Fakültatif Anaerobik</b>
<i>Bacillus sp.</i> B-2-8			+	
<i>Bacillus sp.</i> B-2-18			+	
<i>Bacillus sp.</i> B-1-11	+			
<i>Bacillus sp.</i> Ö-4-40			+	
<i>Bacillus sp.</i> Ö-4-51			+	
<i>Bacillus sp.</i> Ö-4-2			+	
<i>Bacillus sp.</i> Ö-4-21			+	
<i>Bacillus sp.</i> Ö-2-61-a	+			
<i>Bacillus sp.</i> B-1-25			+	
<i>Bacillus sp.</i> B-2-4			+	
<i>Bacillus sp.</i> Ö-4-35			+	
<i>Bacillus sp.</i> Ö-5-7	+			
<i>Bacillus sp.</i> B-2-4			+	
<i>Bacillus sp.</i> T-2-20			+	
<i>Bacillus sp.</i> B-2-34			+	
<i>Bacillus sp.</i> Ö-2-75	+			
<i>Bacillus sp.</i> T-5-10	+			
<i>Bacillus sp.</i> K-6-3	+			
<i>Bacillus sp.</i> K-6-36	+			
<i>Bacillus sp.</i> T-3-9	+			
<i>Bacillus sp.</i> T-5-6	+			
<i>Bacillus sp.</i> K-6-35	+			
<i>Bacillus sp.</i> B-2-34			+	
<i>Bacillus sp.</i> Ö-4-78-b	+			
<i>Bacillus sp.</i> Ö-4-37			+	
<i>Bacillus sp.</i> Ö-4-49-c			+	
<i>Bacillus sp.</i> B-1-17	+			
<i>Bacillus sp.</i> B-2-12			+	



İZOLAT KODU	Aerobik	Anaerobik	Fakültatif Aerobik	Fakültatif Anaerobik
<i>Bacillus sp. K-6-11</i>	+			
<i>Bacillus sp. K-6-28</i>	+			
<i>Bacillus sp. K-7-33</i>	+			
<i>Bacillus sp. K-7-26</i>	+			
<i>Bacillus sp. 30-4-3</i>			+	
<i>Bacillus sp. 30-10-2</i>			+	
<i>Bacillus sp. 30-11</i>			+	
<i>Bacillus sp. 30-7-2</i>			+	
<i>Bacillus sp. 30-1</i>			+	
<i>Bacillus sp. 30-2</i>			+	
<i>Bacillus sp. 30-4-2-2</i>			+	
<i>Bacillus sp. 30-5</i>			+	
<i>Bacillus sp. 30-8</i>			+	
<i>Bacillus sp. 30-4-2-1</i>	+			
<i>Bacillus sp. 30-7-1</i>	+			
<i>Bacillus sp. 30-3</i>	+			
<i>Bacillus sp. 30-6</i>	+			
<i>Bacillus sp. 30-10-1</i>	+			
<i>Bacillus sp. 30-9</i>	+			

Anaerobik kültürleme testi sonucu suşlar aerobik ya da fakültatif çıkmıştır. Sadece bu testin sonuçlarına göre izolatların ayırımı için net bir ifadeye bulunulamayacağından uygulanan diğer biyokimyasal testlerle karşılaştırmalı olarak türlerin ayırımına çalışılmıştır. Ancak testlerin sonuçlarına bakıldığında tutarsızlık olduğu saptanmıştır, bunun sonucunda biyokimyasal testlerin uygulanmasının yerine morfolojik gözlemler ve de izolatlara ait biyolojik etkinlik testlerinin yapılmasının izolatların değerlendirilmesinde daha uygun olacağına karar verilmiş olup diğer izolatlar için yukarıda açıklanan biyokimyasal testler uygulanmamıştır.

#### 4.3 *Bacillus thuringiensis subs. israelensis* ve *Bacillus sphaericus* Suşlarının Laboratuvar Ölçeğinde Üretilmesi

Biyoinsektisit özellikleri ile ön plana çıkan *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarıyla ilgili olarak uzun yıllardan beri süregelen çalışmalar mevcut olmakla birlikte son zamanlarda moleküler yöntemlerin gelişimiyle, bu türlere ait moleküler tanımlama çalışmalarına ağırlık verilmiş bulunmaktadır (İçgen vd., 2002; Doruk ve ark., 2013; Özkan ve ark., 2002; Nalçacıoğlu, 1998; Vachon et al., 2012; Bravo et al, 2007; Irıarte et al., 2007; Avisar et al., 2009.)

Moleküler ağırlıklı çalışmalar (Go'mez et al., 2007; Park et al., 2008; Foda et al., 2010; Surendran et al., 2011), daha çok tanımlama adımlarında önem taşımaktadır. Bu türlere ait üretime ve ayırma saflaştırmaya dayanan çalışmalar kısıtlı kalmakla birlikte daha çok mineral tuzların üretime etkisini inceleyen çalışmalara rastlanılmaktadır (Ghribi et al., 2007; Moazami; Özkan vd., 2003; Foda et al., 2010; Park et al., 2008; Massie et al., 1985; El-Bendary, 2006). Büyük ölçekli üretime ve optimizasyona dayanan çalışmaların sayısı oldukça azdır (Moazami, 2007; El-Bendary, 2006; Monteiro, 2005).

#### **4.3.1 Sporlanma ve toksik protein üretimini teşvik eden ekonomik bir “üretim ortamı” belirlenmesi**

Çalışmamızda öncelikle, elimizdeki izolatların biyolojik etkinlik testlerinin denenebilmesi için endospor ve toksin protein üretimini hızlı, kolay ve ekonomik şekilde sağlayabileceğimiz bir ortam tespit edilmeye çalışılmıştır. Literatür taramaları sonucunda çalışmada, içerikleri 3.1.2.1’de verilen T-3, NY ve NYSM besiyerleri karşılaştırmalı olarak denenmiştir.

Buradaki ortamlardan bazıları denenerek en kısa sürede en fazla sayıda endospor sayısını veren ortam seçilmiştir. Üretimler sonucu endospor sayısının belirlenmesinde 3.2.3.2’de açıklandığı şekilde endospor sayımı yapılmıştır.

3.1.2.1’de adı geçen ve içeriği açıklanan ortamlardan T-3 ortamı (Keshavarzi, 2008) ile daha önceden SEM görüntüleri alınarak endospor üretme yeteneği ispatlanmış olan *Bacillus sp.* T-2-20 ve *Bacillus sp.* 3-K-S-45 kodlu izolatlar için laboratuvar ölçeğinde üretim yapılmıştır. Üretimin devam ettiği her gün aynı saatte üretimden aseptik koşullarda örnek alınarak mikroskopik gözlemler yapılmış ve endosporların en fazla miktarda görüldüğü gün tespit edilerek üretim süresi belirlenmeye çalışılmıştır.

Üretim ortamı olarak T-3 ortamının ilk olarak denenmesindeki amaç, bu ortamın literatürlerde endospor oluşumunu teşvik ettiğinin belirtilmesidir (Keshavarzi, 2008). Üstelik endospor oluşum süresi, bu ortam sağlandığında 3-4 gün olarak verilmektedir (Moreira et al., 2007). Ancak aşağıdaki çizelgede de yer aldığı şekilde bu süre çalışmamızda 8 gün kadar olmuştur (Çizelge 4.8).

**Çizelge 4.8** T-2-20 ve 3-K-S-45 izolatlarının T-3 ortamında üretiminden elde edilen spor sayım sonuçları

<b>İzolat Kodu</b>	<b>Üretim ortamı</b>	<b>Üretim süresi (gün)</b>	<b>Endospor sayısı (kob/ml)</b>
<i>Bacillus sp.</i> T-2-20	T-3	8	$2,3 \times 10^7$
<i>Bacillus sp.</i> 3-K-S-45	T-3	8	$4,5 \times 10^7$

T-3 ortamı ile yapılan laboratuvar ölçekli üretimin bitiminde alınan sonuçlar çalışmamızın devamı açısından çok parlak görülmediğinden başka üretim ortamı denemeleri yapılmıştır (Monteiro et al., 2005, Prabakaran et al., 2007, Sarrafzadeh et al., 2005, Atehortua et al., 2007).

SEM ve faz kontrast mikroskobu görüntüleri alınarak endospor ve toksin protein ürettiği görülen *Bacillus sp.* B-2-8, *Bacillus sp.* B-2-18 ve *Bacillus sp.* B-1-11 kodlu izolatlarla içeriği 3.1.2.1’de içeriği verilen NYSM ve NY ortamlarda laboratuvar ölçekli üretimler yapılmıştır. Üretim süresince her gün aynı saatte aseptik koşullarda üretimden örnek alınarak mikroskobik incelemeleri yapılmış ve endosporların en fazla görüldüğü gün tespit edilerek üretim süresi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu denemeye ait veriler, aşağıda Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10’da verilmiştir.

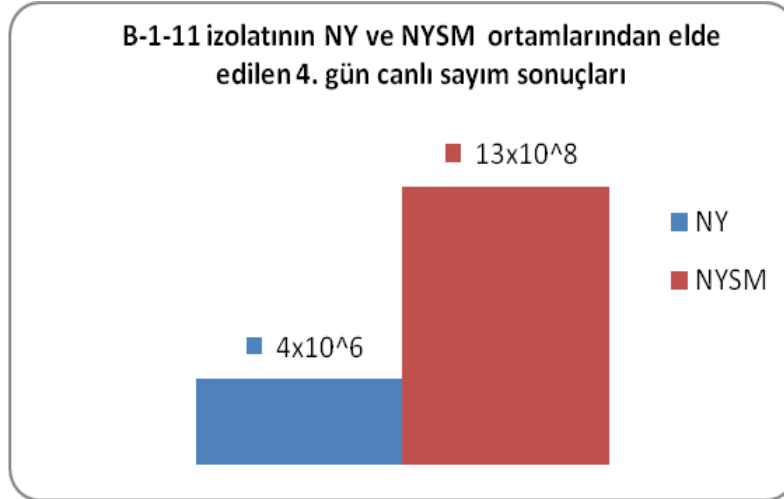
**Çizelge 4.9** Çeşitli *Bacillus* izolatlarının NYSM ve NY ortamlarında üretim sonuçları

<b>izolat kodu</b>	<b>üretim süresi (gün)</b>	<b>üretim ortamı</b>	<b>canlı sayım sonucu (kob/ml)</b>
<i>Bacillus sp.</i> B-2-8	4	NY	$1,5 \times 10^6$
		<b>NYSM</b>	$1,3 \times 10^7$
<i>Bacillus sp.</i> B-2-18	4	NY	$1,5 \times 10^6$
		<b>NYSM</b>	$3,2 \times 10^7$
<i>Bacillus sp.</i> B-1-11	4	NY	$4 \times 10^6$
		<b>NYSM</b>	$1,3 \times 10^9$

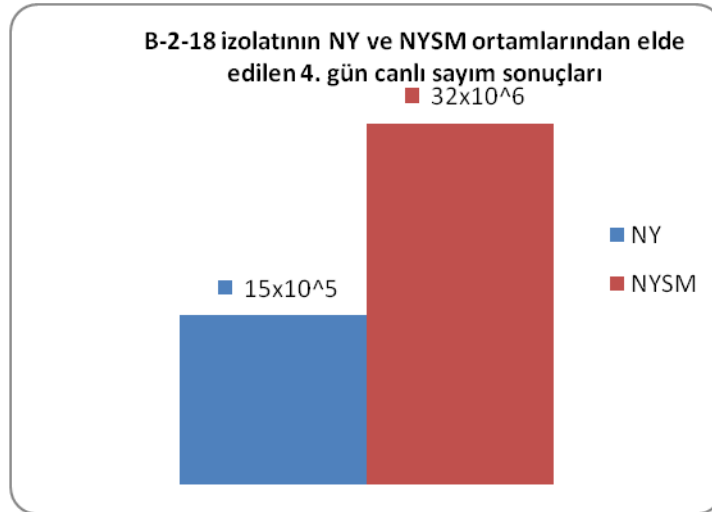
**Çizelge 4.10** Çeşitli *Bacillus* izolatlarının NYSM ortamında 4 gün süren üretimlerinin sonuçları

<b>izolat kodu</b>	<b>spor sayım sonucu (kob/ml)</b>
<b><i>Bacillus sp. B-2-8</i></b>	$3,5 \times 10^6$
<b><i>Bacillus sp. B-2-18</i></b>	$5 \times 10^6$
<b><i>Bacillus sp. B-1-11</i></b>	$1,7 \times 10^7$

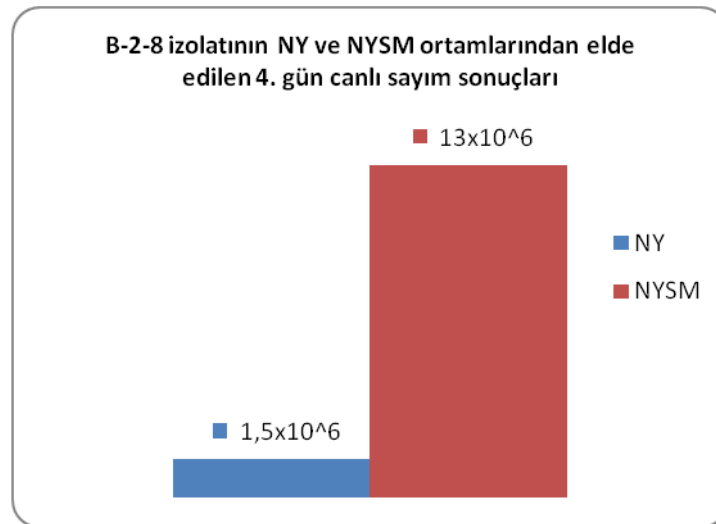
T3, NY, NYSM ortamlarının karşılaştırılması yapılırsa, T3 ortamında organizmanın sporlanma süresi 7-8 gün arasında değişmekte iken NY ve NYSM ortamlarında bu sürenin 4 güne kadar indiği görülmektedir. T3 ortamında 8 gün süren üretim sonucu elde edilen spor sayılarına ( $2,3 \times 10^7$  kob/ml ve  $4,5 \times 10^7$  kob/ml – Çizelge 4.7) NYSM ortamında 4 gün süren üretim ile ulaşılabilmektedir ( $3,5 \times 10^6$  kob/ml ;  $5 \times 10^6$  kob/ml ;  $1,7 \times 10^7$  kob/ml – Çizelge 4.8). NY ve NYSM ortamlarına bakıldığında ise NYSM ortamının NY ortamına göre aynı sürede koloni oluşumunu daha çok teşvik ettiği görülmüştür (Çizelge 4.8).



**Şekil 4.8** *Bacillus sp. B-1-11* izolatına ait NY ve NYSM ortamlarında 4 günlük üretim sonucu alınan canlı sayıları (kob/ml)



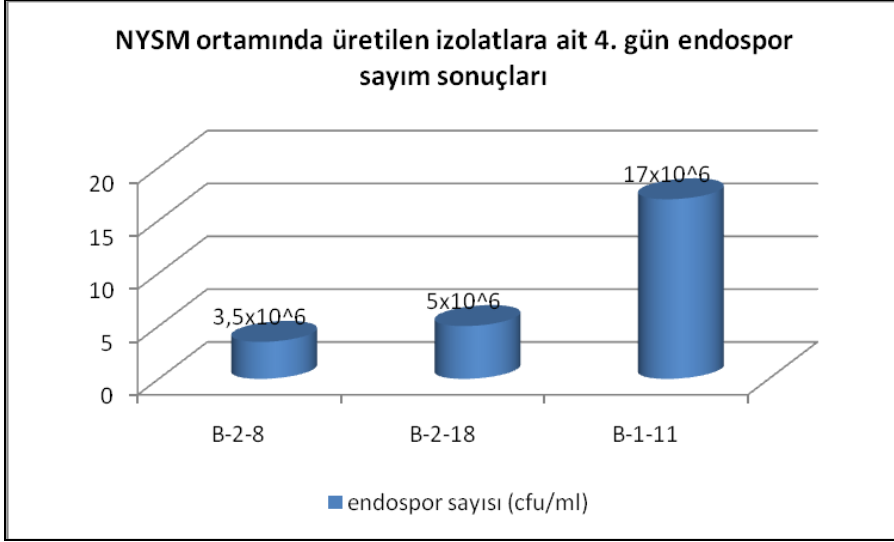
**Şekil 4.9** *Bacillus sp.* B-2-18 izolatına ait NY ve NYSM ortamlarında 4 günlük üretim sonucu alınan canlı sayıları (kob/ml)



**Şekil 4.10** *Bacillus sp.* B-2-8 izolatına ait NY ve NYSM ortamlarında 4 günlük üretim sonucu alınan canlı sayıları (kob/ml)

Şekil 4.8, 4.9, ve 4.10'da görüldüğü gibi her izolat için NYSM ortamında edinilen canlı sayısı, NY ortamından elde edilen sayılara göre daha fazla olmuştur (Çizelge 4.9).

Yukarıdaki şekillerde adı geçen izolatların NYSM ortamında 4 günlük üretimleri sonucu alınan spor sayıları Çizelge 4.10'da verilmekle beraber şematik hali Şekil 4.11'de verilmektedir.

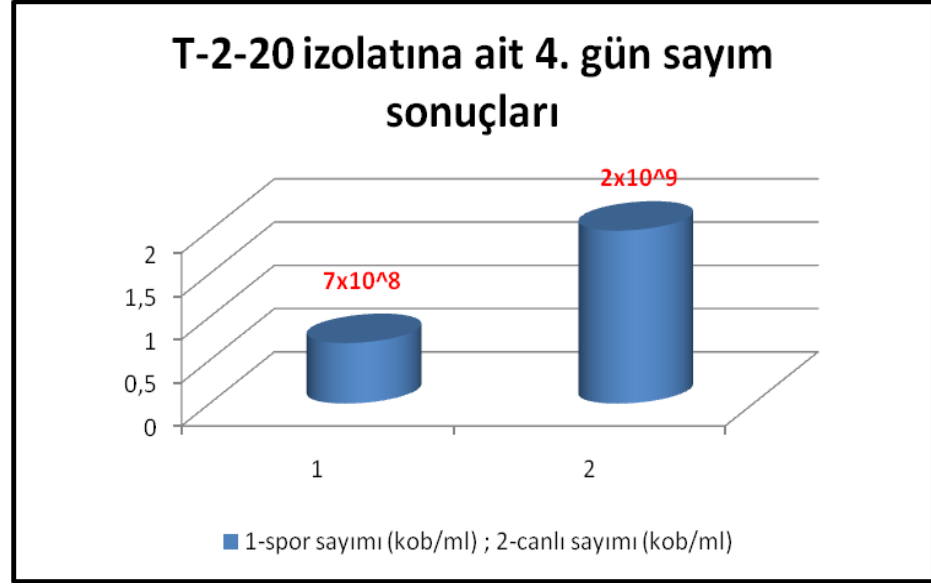


**Şekil 4.11** Çeşitli *Bacillus* izolatlarının NYSM ortamında üretim sonucu alınan spor sayım sonuçları

NYSM ortamında yapılan üretimlerden daha kısa sürede ve daha çok endospor sayısına ulaşıldığının görülmesi üzerine denemelerin karşılaştırılabilir olması amacıyla *Bacillus sp.* T-2-20 kodlu izolat için de NYSM ortamında 4 gün süren üretim denemesi yapılmış olup bu üretimden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11’de ve Şekil 4.12’de verilmektedir.

**Çizelge 4.11** *Bacillus sp.* T-2-20 izolatının NYSM ortamında üretiminden elde edilen spor sayım sonuçları

<b>İzolat Kodu</b>	<b>Üretim ortamı</b>	<b>Üretim süresi (gün)</b>	<b>Endospor sayısı (kob/ml)</b>
<b><i>Bacillus sp.</i> T-2-20</b>	<b>NYSM</b>	<b>4</b>	<b><math>7 \times 10^8</math></b>



Şekil 4.12 *Bacillus sp.* T-2-20 izolatının NYSM ortamında üretim sonucu alınan sayım sonuçları

Aynı izolata ait (*Bacillus sp.* T-2-20) farklı ortamlarda ve sürelerde ancak aynı koşullarda (150 rpm, 30 °C sıcaklık) yapılan üretimler sonucu alınan sayım sonuçlarını özetleyen Çizelge 4.8 ile Çizelge 4.11 karşılaştırıldığında üretim ortamı olarak NYSM seçilmiştir.

### 4.3.2 Üretim ortamlarında endospor sayısının belirlenmesi

#### 4.3.2.1 İnokulum üretimi ve inokulasyon

Yatık nutrient agar besiyerinde stok olarak saklanan *Bacillus* izolatından bir öze alınarak Nutrient Broth (Foda et al., 2010) ortamına ekim yapılmıştır. 24 saat 30 °C'de inkübasyondan sonra aseptik koşullarda % 2 oranında 100 ml'lik endospor üretim ortamlarına inokülasyon yapılmıştır.

#### 4.3.2.2 Üretim Koşulları

İnokülasyondan sonra erlenler, 30 °C (Prabakaran et al., 2005; Park et al., 2008; Anderson et al., 2002)'de, 150 rpm'de 4 gün süreyle inkübe edilmiştir. Üretimin sonlandırılmasının ardından 1'er ml örnek alınarak endospor sayısı belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

#### **4.3.2.3 Üretim ortamlarından endosporların ayrılması**

En yüksek endospor üretiminin sağlandığı besiyerinde üretim tamamlandıktan sonra kültür ortamı 10 dakika 6000-7000 g'de santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra her seferinde süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve üzerine steril deiyonize su eklenerek santrifüjde 3 kez yıkanmıştır. En sonunda pellet halinetoplanan hücreler ya steril distile su ile çözelti halinde ya da iyofilize edilerek saklanmıştır (Thomas and Ellar, 1983; Prabakaran and Balaraman, 2006).

Santrifüj sonrası çöken pelletler üzerine aseptik ortamda steril saf su (50 ml) eklenmiştir ve homojenize edilmiştir. Ardından bu homojen karışımdan alınan örneklerle spor sayımı yapılmıştır. Çeşitli Bacillus izolatlarına ait spor sayım sonuçları Çizelge 4.12'de görülmektedir. Üretimler sonucu endospor sayısının belirlenmesinde 3.2.3.2'de açıklandığı şekilde endospor sayımı yapılmıştır.



Çizelge 4.12 Biyolojik etkinlik testi için üretilen çeşitli *Bacillus* izolatlarına ait spor sayıları

ürün no	izolat kodu	spor sayımı (kob/ml)	ürün no	izolat kodu	spor sayımı (kob/ml)	ürün no	izolat kodu	spor sayımı (kob/ml)
1	<i>Bacillus sp. B-2-8</i>	$3,5 \times 10^6$	55	<i>Bacillus sp. Ç-1-27</i>	$2,9 \times 10^8$	109	<i>Bacillus sp. K-9-35</i>	$1,9 \times 10^9$
2		$1 \times 10^6$	56	<i>Bacillus sp. Ç-2-18</i>	$2,2 \times 10^7$	110	<i>Bacillus sp. K-9-27</i>	$5,1 \times 10^8$
3	<i>Bacillus sp. B-2-18</i>	$5 \times 10^6$	57	<i>Bacillus sp. Ç-2-22</i>	$3,5 \times 10^8$	111	<i>Bacillus sp. K-9-36</i>	$1 \times 10^{10}$
4			58	<i>Bacillus sp. Ç-2-26</i>	$3,8 \times 10^6$	112	<i>Bacillus sp. K-9-5</i>	$2,6 \times 10^9$
5	<i>Bacillus sp. B-1-11</i>	$1,7 \times 10^7$	59	<i>Bacillus sp. Ç-2-4</i>	$2,9 \times 10^7$	113	<i>Bacillus sp. K-9-14</i>	$2,4 \times 10^9$
6			60	<i>Bacillus sp. Ç-1-23</i>	$2,2 \times 10^{10}$	114	<i>Bacillus sp. K-8-30</i>	$1,9 \times 10^8$
7	<i>Bacillus sp. B-1-17</i>	$2 \times 10^8$	61	<i>Bacillus sp. Ç-1-24</i>	$1,1 \times 10^{10}$	115	<i>Bacillus sp. K-8-19</i>	$8,4 \times 10^8$
8	<i>Bacillus sp. Ö-4-37</i>	$8 \times 10^7$	62	<i>Bacillus sp. Ç-2-9</i>	$1 \times 10^6$	116	<i>Bacillus sp. K-8-12</i>	$6 \times 10^8$
9	<i>Bacillus sp. B-2-12</i>	$1,5 \times 10^8$	63	<i>Bacillus sp. Ç-2-14</i>	$1 \times 10^4$	117	<i>Bacillus sp. K-8-24</i>	$2,4 \times 10^8$
10	<i>Bacillus sp. Ö-4-78-b</i>	$3,5 \times 10^8$	64	<i>Bacillus sp. Ç-1-15</i>	$1,8 \times 10^9$	118	<i>Bacillus sp. K-8-22</i>	$2,1 \times 10^8$
11	<i>Bacillus sp. B-2-24</i>	$1 \times 10^7$	65	<i>Bacillus sp. Ç-2-20</i>	$3,8 \times 10^{10}$	119	<i>Bacillus sp. K-8-18</i>	$7,8 \times 10^8$
12	<i>Bacillus sp. Ö-4-49-c</i>	$8,5 \times 10^6$	66	<i>Bacillus sp. Ç-1-22</i>	-	120	<i>Bacillus sp. T-3-9 (LB)</i>	$2,6 \times 10^9$
13	<i>Bacillus sp. Ö-4-2</i>	$2 \times 10^6$	67	<i>Bacillus sp. Ç-2-10</i>	$1,1 \times 10^8$	121	<i>Bacillus sp. T-3-11 (LB)</i>	-
14	<i>Bacillus sp. Ö-4-51</i>	$5,5 \times 10^6$	68	<i>Bacillus sp. Ö-3-6</i>	$4,9 \times 10^8$	122	<i>Bacillus sp. T-3-10 (LB)</i>	$3 \times 10^9$
15	<i>Bacillus sp. B-2-4</i>	$1,5 \times 10^6$	69	<i>Bacillus sp. Ö-3-26-b</i>	$8,2 \times 10^9$	123	<i>Bacillus sp. T-3-33 (LB)</i>	$6 \times 10^6$
16	<i>Bacillus sp. B-1-25</i>	$2,6 \times 10^8$	70	<i>Bacillus sp. Ö-3-32</i>	$3,7 \times 10^7$	124	<i>Bacillus sp. T-3-49 (LB)</i>	$1,9 \times 10^8$

17	<i>Bacillus sp. Ö-4-40</i>	1,3x10 <sup>6</sup>	71	<i>Bacillus sp. Ö-3-48</i>	-	125	<i>Bacillus sp. T-3-43 (LB)</i>	-
18	<i>Bacillus sp. Ö-5-7</i>	1,9x10 <sup>7</sup>	72	<i>Bacillus sp. Ö-3-60</i>	4,1x10 <sup>8</sup>	126	<i>Bacillus sp. K-7-3</i>	2,4x10 <sup>9</sup>
19	<i>Bacillus sp. Ö-4-35</i>	5x10 <sup>4</sup>	73	<i>Bacillus sp. Ö-3-82</i>	2,6x10 <sup>9</sup>	127	<i>Bacillus sp. K-7-10</i>	1,6x10 <sup>8</sup>
20	<i>Bacillus sp. Ö-2-61-a</i>	1,8x10 <sup>8</sup>	74	<i>Bacillus sp. T-4-9</i>	3,5x10 <sup>9</sup>	128	<i>Bacillus sp. K-7-16</i>	2,1x10 <sup>9</sup>
21	<i>Bacillus sp. Ö-4-21</i>	1x10 <sup>6</sup>	75	<i>Bacillus sp. T-4-11</i>	1,1x10 <sup>10</sup>	129	<i>Bacillus sp. K-7-5</i>	2,4x10 <sup>8</sup>
22	<i>Bacillus sp. T-3-9</i>	1x10 <sup>7</sup>	76	<i>Bacillus sp. T-4-14</i>	3,5x10 <sup>9</sup>	130	<i>Bacillus sp. K-7-27</i>	2x10 <sup>8</sup>
23	<i>Bacillus sp. T-5-10</i>	8x10 <sup>7</sup>	77	<i>Bacillus sp. T-4-19</i>	1,2x10 <sup>10</sup>	131	<i>Bacillus sp. K-7-14-1</i>	3,1x10 <sup>9</sup>
24	<i>Bacillus sp. T-5-6</i>	3,1x10 <sup>8</sup>	78	<i>Bacillus sp. T-4-29</i>	3x10 <sup>10</sup>	132	<i>Bacillus sp. T-3-10-b-b-1 (NA)</i>	5,3x10 <sup>9</sup>
25	<i>Bacillus sp. B-2-34</i>	4x10 <sup>7</sup>	79	<i>Bacillus sp. T-4-29</i>	3,3x10 <sup>9</sup>	133	<i>Bacillus sp. T-3-10-b-b-3 (NA)</i>	4,7x10 <sup>9</sup>
26	<i>Bacillus sp. T-2-20</i>	6x10 <sup>8</sup>	80	<i>Bacillus sp. Ö-2-24</i>	6,6x10 <sup>8</sup>	134	<i>Bacillus sp. T-3-10-b-1 (NA)</i>	2,8x10 <sup>9</sup>
27	<i>Bacillus sp. K-6-3</i>	3x10 <sup>7</sup>	81	<i>Bacillus sp. Ö-2-42</i>	3,5x10 <sup>9</sup>	135	<i>Bacillus sp. T-3-20 (NA)</i>	1,5x10 <sup>9</sup>
28	<i>Bacillus sp. K-6-39</i>	1,2x10 <sup>8</sup>	82	<i>Bacillus sp. Ö-2-47</i>	2,1x10 <sup>7</sup>	136	<i>Bacillus sp. T-3-22 (NA)</i>	6x10 <sup>8</sup>
29	<i>Bacillus sp. Ö-2-75</i>	1,4x10 <sup>8</sup>	83	<i>Bacillus sp. Ö-2-78</i>	8,2x10 <sup>8</sup>	137	<i>Bacillus sp. T-3-27 (NA)</i>	5,7x10 <sup>7</sup>
30	<i>Bacillus sp. K-6-36</i>	8x10 <sup>7</sup>	84	<i>Bacillus sp. Ç-3-14</i>	1,9x10 <sup>9</sup>	138	<i>Bacillus sp. T-5-1</i>	8,7x10 <sup>9</sup>
31	<i>Bacillus sp. K-6-11</i>	5x10 <sup>7</sup>	85	<i>Bacillus sp. Ç-3-17</i>	4,6x10 <sup>7</sup>	139	<i>Bacillus sp. T-5-17</i>	2,5x10 <sup>9</sup>
32	<i>Bacillus sp. K-6-28</i>	4x10 <sup>7</sup>	86	<i>Bacillus sp. Ç-3-20</i>	2,8x10 <sup>9</sup>	140	<i>Bacillus sp. T-5-9</i>	1,4x10 <sup>10</sup>
33	<i>Bacillus sp. K-7-26</i>	1,7x10 <sup>8</sup>	87	<i>Bacillus sp. Ç-3-21</i>	2,4x10 <sup>9</sup>	141	<i>Bacillus sp. T-5-18</i>	6,3x10 <sup>9</sup>
34	<i>Bacillus sp. K-6-38</i>	3,9x10 <sup>8</sup>	88	<i>Bacillus sp. Ç-3-27</i>	4x10 <sup>8</sup>	142	<i>Bacillus sp. T-5-13</i>	4x10 <sup>9</sup>
35	<i>Bacillus sp. K-8-38</i>	3,5x10 <sup>7</sup>	89	<i>Bacillus sp. Ç-3-35</i>	7,3x10 <sup>8</sup>	143	<i>Bacillus sp. T-5-14</i>	2,1x10 <sup>9</sup>

36	<i>Bacillus sp. K-7-33</i>	2x10 <sup>7</sup>	90	YOK		144	<i>Bacillus sp. K-6-36</i>	2,5x10 <sup>9</sup>
37	<i>Bacillus sp. 30-2</i>	1,4x10 <sup>7</sup>	91	<i>Bacillus sp. Ö-6-46</i>	8,4x10 <sup>10</sup>	145	<i>Bacillus sp. Ö-1-4</i>	7,2x10 <sup>7</sup>
38	<i>Bacillus sp. 30-3</i>	5,7x10 <sup>8</sup>	92	<i>Bacillus sp. Ö-6-19</i>	2,8x10 <sup>9</sup>	146	<i>Bacillus sp. Ö-1-55</i>	3,2x10 <sup>9</sup>
39	<i>Bacillus sp. 30-4-1</i>	3,6x10 <sup>8</sup>	93	<i>Bacillus sp. Ö-6-12</i>	1,6x10 <sup>9</sup>	147	<i>Bacillus sp. Ö-1-83</i>	7,1x10 <sup>9</sup>
40	<i>Bacillus sp. 30-4-2-1</i>	9,8x10 <sup>8</sup>	94	<i>Bacillus sp. Ö-6-18</i>	1,4x10 <sup>9</sup>	148	<i>Bacillus sp. Ö-1-11</i>	1,2x10 <sup>10</sup>
41	<i>Bacillus sp. 30-5</i>	1,4x10 <sup>8</sup>	95	<i>Bacillus sp. Ö-6-33</i>	2,3x10 <sup>9</sup>	149	<i>Bacillus sp. Ö-1-62</i>	2x10 <sup>10</sup>
42	<i>Bacillus sp. 30-6</i>	4,3x10 <sup>8</sup>	96	<i>Bacillus sp. Ö-6-14</i>	2,5x10 <sup>9</sup>	150	<i>Bacillus sp. T-2-2</i>	3,2x10 <sup>9</sup>
43	<i>Bacillus sp. 30-7-1</i>	3,5x10 <sup>8</sup>	97	<i>Bacillus sp. K-5-18</i>	2,3x10 <sup>9</sup>	151	<i>Bacillus sp. T-2-28</i>	9x10 <sup>6</sup>
44	<i>Bacillus sp. 30-8</i>	2,2x10 <sup>8</sup>	98	<i>Bacillus sp. K-5-25</i>	6,7x10 <sup>8</sup>	152	<i>Bacillus sp. T-2-16</i>	1x10 <sup>10</sup>
45	<i>Bacillus sp. 30-9</i>	1,1x10 <sup>9</sup>	99	<i>Bacillus sp. K-5-36</i>	2,5x10 <sup>9</sup>	153	<i>Bacillus sp. T-2-23</i>	2,1x10 <sup>8</sup>
46	<i>Bacillus sp. 30-10-1</i>	7,5x10 <sup>8</sup>	100	<i>Bacillus sp. K-5-19</i>	2x10 <sup>9</sup>	154	<i>Bacillus sp. T-2-10</i>	1x10 <sup>10</sup>
47	<i>Bacillus sp. 30-10-2</i>	7,6x10 <sup>8</sup>	101	<i>Bacillus sp. K-5-11</i>	6x10 <sup>7</sup>	155	<i>Bacillus sp. T-2-4</i>	-
48	<i>Bacillus sp. 30-11</i>	4,3x10 <sup>8</sup>	102	<i>Bacillus sp. K-5-26</i>	3,8x10 <sup>9</sup>	156	<i>Bacillus sp. T-1-10</i>	3,6x10 <sup>9</sup>
49	<i>Bacillus sp. 30-1</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	103	<i>Bacillus sp. Ö-5-34</i>	3,8x10 <sup>9</sup>	157	<i>Bacillus sp. T-1-5</i>	1,2x10 <sup>10</sup>
50	<i>Bacillus sp. 30-4-2-2</i>	5,2x10 <sup>6</sup>	104	<i>Bacillus sp. Ö-5-47</i>	2,6x10 <sup>10</sup>	158	<i>Bacillus sp. T-1-14</i>	4,4x10 <sup>9</sup>
51	<i>Bacillus sp. 30-4-3</i>	3,9x10 <sup>8</sup>	105	<i>Bacillus sp. Ö-5-36</i>	2,9x10 <sup>8</sup>	159	<i>Bacillus sp. T-1-7</i>	4,8x10 <sup>9</sup>
52	<i>Bacillus sp. 30-7-2</i>	8,4x10 <sup>7</sup>	106	<i>Bacillus sp. Ö-5-33</i>	2,8x10 <sup>9</sup>	160	<i>Bacillus sp. T-1-9</i>	2,1x10 <sup>10</sup>
53	<i>Bacillus sp. Ç-1-17</i>	7,1x10 <sup>8</sup>	107	<i>Bacillus sp. Ö-5-23</i>	2,9x10 <sup>9</sup>			
54	<i>Bacillus sp. Ç-1-21</i>	6,4x10 <sup>7</sup>	108	<i>Bacillus sp. K-9-2</i>	1,9x10 <sup>10</sup>			

#### 4.4 Laboratuvarda biyolarvasit biyolojik etkinlik testleri

Tez çalışması kapsamında laboratuvar ortamında üretimi yapılan izolatların larvalar üzerinde denemeye dayanan “biyolojik etkinlik testleri”, Ege Üni. Fen Fak. Biyoloji Bölümü Zooloji ABD (Sağlık Bakanlığı Biyosidal Ürün Analizi Yapmaya Yetkili Laboratuvar) ile birlikte yürütülmektedir.

Biyolojik etkinlik testinin uygulanması için üretilen ilk 30 örnek içinse tez çalışmamızda bize destek veren Biyokim Haşere Kontrol Hizmetleri Sanayi Ticaret Limited Şirketi bünyesinde bulunan entomoloji laboratuvarından yardım alınmıştır.

Larvalar kullanılarak gerçekleştirilen “biyolojik etkinlik testleri” nden alınan sonuçlar, Çizelge 4.11’de görülmektedir.

Testin değerlendirilmesi yapılırken larvasitlerle ilgili literatür taraması yapılmıştır, edinilen bilgiler sonucunda % 80 ve üzerinde mortalite etkisine sahip olan izolatlar, amaca uygun kabul edilmiştir. Ayrıca denemeler yapılırken 4. Gömlekten larvaların kullanılmasına dikkat edilmiştir (Paula de Araujo et al., 2007; TC. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, 2014).

$$\text{Abbott Formülü: Düzeltilmiş \% ölüm} = \frac{\% \text{ Test ölümü} - \% \text{ kontrol ölüm}}{100 - \% \text{ kontrol ölüm}} \times 100$$

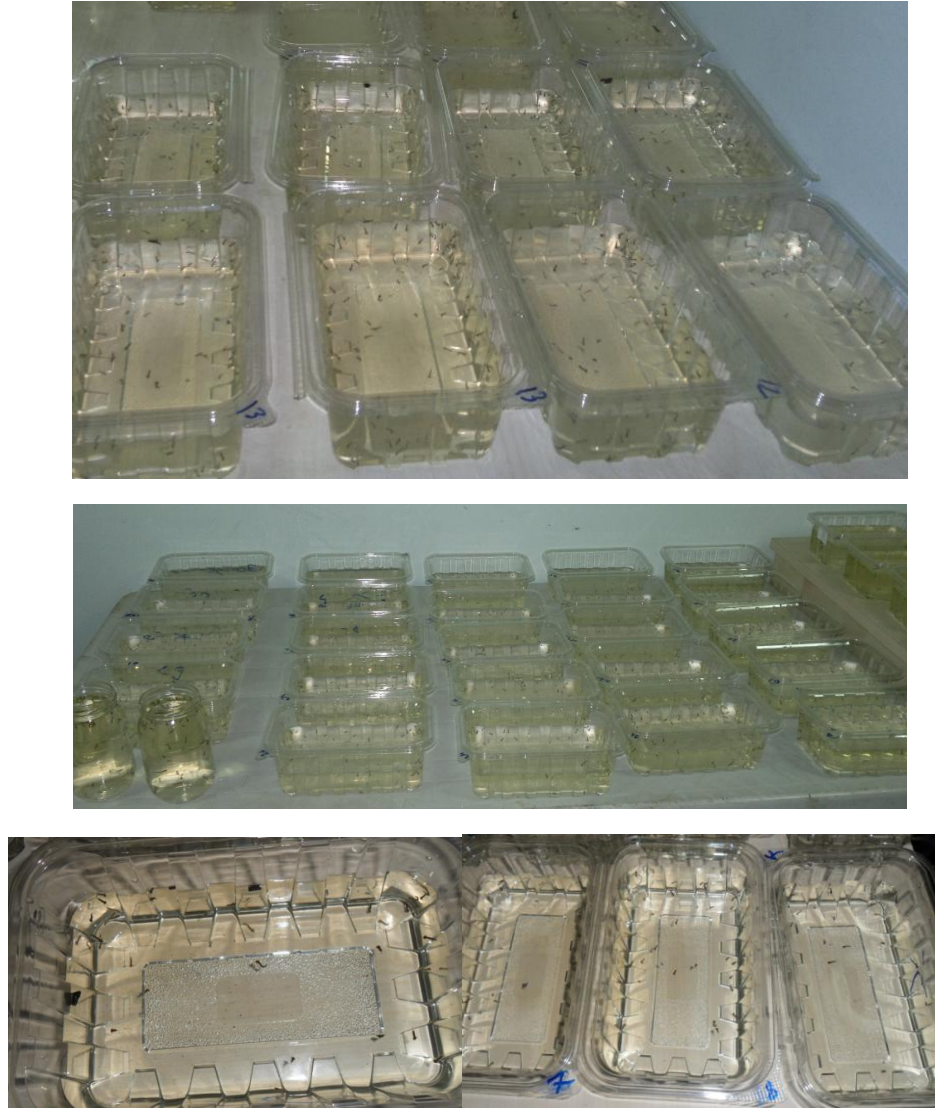
*Bacillus* suşlarına ait biyoinsektisit özelliklerine dayanan çalışmalar çok uzun yıllardır devam etmektedir. Çalışmaların genelinde kullanılan larva çeşidi ise *Culex quinquefasciatus* olarak karşımıza çıkmaktadır (Park et al., 2008). Bu larva türüne karşı özellikle *B. sphaericus* suşunun etkin olduğu ifadelerde yer almaktadır (Park et al., 2008; Surendran et al., 2011). O’Callaghan ve ekibinin biyoassaylerle ilgili yaptıkları detaylı açıklamalarla potens testlerinin bakterilerin larvalar üzerinde ne kadar miktarda ve oranda etkili olduklarını belirlemede önem taşıdığı görülmektedir (Thiery et al., 1997). Bu konuda yapılan bir çok çalışma, bu oranı belirlemeye dayanmaktadır (Foda et al., 2010; Surendran et al., 2011; Regis et al., 2000).

Biyolojik etkinlik denemelerinin iki farklı laboratuvarında denenmesi , en iyi mortalite yüzdesine sahip olan izolatin seçimini zorlaştırmıştır . İzolatların aynı üretim ortamında (NYSM) ve aynı koşullarda (30 °C, 150 rpm, 4 gün) üretildiği göz önüne alındığında, biyolojik etkinlik test sonucu en iyi olan izolatin seçiminde larvalar üzerinde uygulanan spor sayısına (kob/ml) bakılmıştır. Bu sayı, yukarıda da açıklandığı üzere, potens değerini belirlemede önem taşımaktadır ki literatürlerden edinilen bilgiler sonucu spor sayısının az olarak denemeye başlanmasının, olumlu sonuç alınması halinde sayının daha da artırılarak potens testlerine geçilmesinin daha uygun olduğuna karar verilmiştir. Bu yüzden Çizelge 4.13'te verilen izolatlara ait spor sayılarının 30'dan büyük ürün numaraları için, biyolojik etkinlik denemelerinde, Ege Üni. Fen Fak. Biyoloji Bölümü Zooloji ABD'da bulunan entomoloji laboratuvarından yardım alınmış ve denemelerde izolatlara ait endospor sayıları  $1 \times 10^6$  kob/ml olacak şekilde seyreltmeler yapılarak sabit tutularak uygulanmıştır. Dolayısıyla  $1 \times 10^6$  (kob/ml) endospor sayısı uygulanarak elde edilen biyolojik etkinlik deneme sonuçlarından en yüksek mortalite değerine (% dx) sahip izolat olan 37 numaralı (*Bacillus sp.* 30-2 kodlu, Çizelge 4.13) izolat en etkili seçilmiştir. Bu noktadan sonra bu izolat üzerinde bütün optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

Çizelge 4.13 Çeşitli *Bacillus* izolatlarına uygulanan biyolojik etkinlik testlerinden alınan sonuçlar

Biyolojik etkinlik testlerinin sonuçları											
Ürün No	48 Saat (% dx ortalama=mortalite)	Uygulama Yoğunluğu(kob/ml)	Yapıldığı Yer	Ürün No	48 Saat (% dx ortalama=mortalite)	Uygulama Yoğunluğu(kob/ml)	Yapıldığı Yer	Ürün No	48 Saat (% dx ortalama=mortalite)	Uygulama Yoğunluğu(kob/ml)	Yapıldığı Yer
1	82,3	3,5x10 <sup>6</sup>	Biyokim Haşere Kontrol Hizmetleri Sanayi Ticaret Limited Şirketi Entomoloji Laboratuvarı	42	2,67	1x10 <sup>6</sup>	Ege Üni. Fen Fak. Biyoloji Bölümü Zooloji ABD. (Sağlık Bakanlığı Bakanlığı Biyosidal Ürün Analizi Yapmaya Yetkili Laboratuvar)	91	5,33	1x10 <sup>6</sup>	Ege Üni. Fen Fak. Biyoloji Bölümü Zooloji ABD. (Sağlık Bakanlığı Biyosidal Ürün Analizi Yapmaya Yetkili Laboratuvar)
2	20	1x10 <sup>6</sup>		44	1,33			92	2,67		
3	33,3	5x10 <sup>6</sup>		45	1,33			93	1,33		
5	40	1,7x10 <sup>7</sup>		47	1,33			95	17,33		
8	88	8x10 <sup>7</sup>		48	1,33			96	9,33		
9	78	1,5x10 <sup>8</sup>		49	2,67			97	12		
10	58	3,5x10 <sup>8</sup>		51	4			99	6,67		
11	90	1x10 <sup>7</sup>		52	5,33			100	2,67		
12	62	8,5x10 <sup>6</sup>		53	2,67			101	5,33		
15	78	1,5x10 <sup>6</sup>		55	1,33			102	5,33		
16	36	2,6x10 <sup>8</sup>		58	2,67			103	2,67		
18	76	1,9x10 <sup>7</sup>		59	5,33			104	10,67		
19	78	5x10 <sup>4</sup>		64	1,33			105	6,67		
27	86	3x10 <sup>7</sup>		68	1,33			106	4		
30	94	8x10 <sup>7</sup>	71	1,33	107	8					
31	30,67	1x10 <sup>6</sup>	Ege Üni. Fen Fak. Biyoloji Bölümü Zooloji ABD. (Sağlık Bakanlığı Biyosidal Ürün Analizi Yapmaya Yetkili Laboratuvar)	75	1,33	108	8				
32	36			76	1,33	109	9,33				
33	22,67			78	2,67	110	9,33				
34	21,33			79	5,33	111	5,33				
35	16			82	12	112	1,33				
36	34,67			84	2,67	113	2,67				
37	85,3			85	2,67	114	18,67				
38	1,33			87	6,67	115	12				
39	1,33			88	2,67	116	10,67				
40	2,67			89	2,67	119	1,33				
41	2,67			90	9,33	120	6,67				

NOT: Etkinlik sonucu "0" sıfır çıkan izolatlara tabloda yer verilmemiştir.



Şekil 4.13 Çeşitli *Bacillus* izolatlarına uygulanan biyolojik etkinlik testinin görsel sonuçları

#### 4.5 Biyoreaktör Denemesini Sonuçları

EÜ “Biyomühendislik Bölümü *Bacillus* Koleksiyonu”nda yer alan *Bacillus thuringiensis* Bt 1i ve *B. thuringiensis* Bt 7i kodlu izolatlar için biyoreaktörde sporlanmayı artırıcı denemeler yapılmıştır. Bt 7i suşu için 3 lt kapasitesinde 1 lt çalışma hacminde, Bt 1i suşu için 5 lt kapasitesinde 3lt çalışma hacminde üretim yapılmıştır. Biyoreaktör üretiminde T-3 ortamı için, 121 °C’de 30 dakikada sterilizasyon yapılmıştır (Yezza et al., 2005). Sterilizasyonun ardından ortam, uygun sıcaklığa geldikten sonra % 2 oranında 24 saatlik aşı inoküle edilmiştir. Üretim koşulları belirlenen optimum rpm ve sıcaklıkta, optimum fermentasyon süresinde gerçekleştirilmiştir. Oksijen 2 l/l havalandırma (Vora et al., 1999) ve karıştırma 150

rpm, sıcaklık ise 30 °C (Vallejo et al., 1999; Vora et al., 1999; Yezza et al., 2005; Prabakaran et al., 2006) ayarlanarak sabit tutulmuştur. Köpürme olmaması için üretim ortamına köpük kırıcı olarak silikon bazlı köpük kırıcı ilave edilmiştir. Her bir fermentasyon sonunda örnek alınarak endospor sayımı yapılmıştır. Organizmanın oksijen tüketim profili belirlenmiştir. Bu profile göre fermentasyon boyunca ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonunun % 30 ve % 50 (Prabakaran et al., 2006) değerlerinin altına inmeyecek şekilde havalandırma ve karıştırma hızı ayarlanarak yapılan endospor üretimleri gerçekleştirilmiştir. pH ise T-3 ortamının gerektirdiği şekilde (pH:6.8) ayarlanmıştır.

Biyoreaktör denemesi sonucu endospor sayımı yapılmış ve buradan elde edilen biyokütle ile biyolojik etkinlik testi yapılmıştır. Ancak kayda değer bir sonuç alınamamıştır.

Endospor sayısı bakımından çok yüksek sayılara ulaşılammış,  $10^7$  kob/ml ( $5,7 \times 10^7$ ) sayısına çıkılabilmmiştir. Ayrıca biyolojik etkinlik testi sonucunda da kabul değerin ( $\Rightarrow$  % 80) altında mortalite değeri saptanmıştır.

Biyoreaktör denemeleri yapılan ölçek büyütme çalışmalarında ise bu sayılar çok daha yüksektir. Farrera ve arkadaşlarının 1998 yılında *Bacillus thuringiensis* üzerinde C:N oranının etkisinin araştırılması çalışmasında biyoreaktör denemeleri sonucunda  $10^8$  kob/ml spor sayısına ulaşılabilmiştir. Prabakaran ve arkadaşlarının 2005 yılında yayımlanan bir çalışmasında ise spor sayılarının  $10^9$  lara kadar ulaştığı görülmektedir.

#### **4.6 *Bacillus sp.* 30-2 İzolatının Endospor Üretim Optimizasyonu**

##### **4.6.1 Üretim süresinin belirlenmesi çalışması**

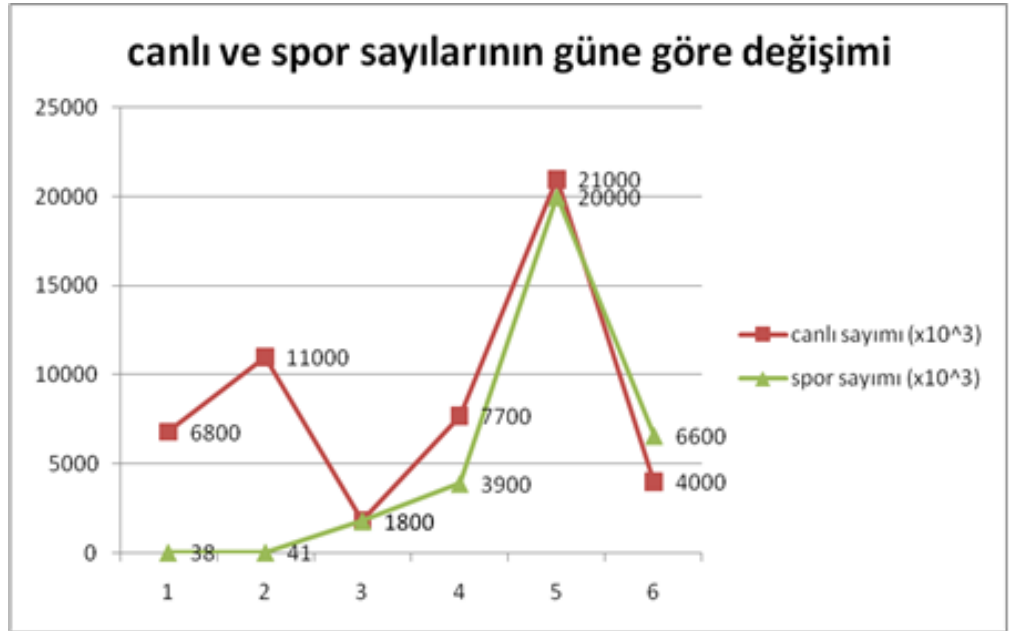
Üretim süresi üzerinde yapılan denemeler, üretim süresinin üretim ortamına göre de değiştiğini göstermiştir. Bu durumlar göz önünde bulundurularak seçilen üretim ortamı kullanılarak erlenlerde üretilip üzerinde biyolojik etkinlik testi denenerek yüksek mortalite yeteneğine sahip olduğu gözlenen *Bacillus sp.* 30-2 kodlu izolat üzerinde üretim süresi denemesi yapılmıştır.



Bu çalışmada en uygun ve kısa sürede spor üretiminin olduğunun görüldüğü NYSM ortamında erlenlerde (500 ml erlenlerde 100 ml çalışma hacminde) 150 rpm ve 30 °C koşullarında laboratuvar ölçeğinde üretime başlanılmış ve her gün aynı saatte olmak üzere aseptik koşullarda örnek alınarak hem canlı hem spor sayımları yapılmıştır. Edinilen sonuçlar Çizelge 4.14'te ve Şekil 4.14'te görülmektedir.

**Çizelge 4.14** *Bacillus sp.* 30-2 izolatının endospor üretim optimizasyon çalışmasında süre belirleme çalışmasının sonuçları

Zaman	Canlı sayımı (kob/ml)	Spor sayımı (kob/ml)
gün 1	$6,8 \times 10^6$	$3,8 \times 10^4$
gün 2	$1,1 \times 10^7$	$4,1 \times 10^4$
gün 3	$1,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
gün 4	$7,7 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$
gün 5	$2,1 \times 10^7$	$2 \times 10^7$
gün 6	$4 \times 10^6$	$6,6 \times 10^6$



**Şekil 4.14** *Bacillus sp.* 30-2 izolatının endospor üretim optimizasyon çalışmasında süre belirleme çalışmasının sonuçları

Çizelge 4.14 ve Şekil 4.14'te görüldüğü gibi laboratuvar ölçekli üretimlerde maksimum endospor sayısının sağlandığı süre 5 günlük üretim süresidir.

#### 4.6.2 RSM oluşturma

Spor üretimi için uygun ortam (4.3.1) ve sürenin (4.6.1) belirlenmesinin ardından seçilen izolat üzerinde endospor miktarını artırıcı optimizasyon denemeleri yapılmıştır. Seçilen *Bacillus sp.* 30-2 izolatının maksimum endospor üretiminin gerçekleştirilmesi için çalışmamızda optimize edilmesi planlanan değişkenler: inokulum miktarı, pH, C kaynağı oranı (%) olarak belirlenmiştir. Yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak optimizasyon şeması hazırlanmıştır. Şema hazırlanırken kullanılan RSM yönteminin gerektirdiği deney tasarımı ve ilgili tüm matematiksel ve istatistiksel analizler Design-Expert 9.0.0 programı ile gerçekleştirilmiştir.

*Bacillus spp.* üzerinde yapılan optimizasyon çalışmaları tarandığında faktör olarak genellikle pH (Liu et al., 2010; Najafi et al., 2010), C kaynağının oranı (%) (Khedher et al. 2011; )ve inokulum miktarı (Reddy et al., 2008; Gangadharan et al., 2008) üzerinde denemelerin yapıldığı görülmüştür (Chauhan and Gupta, 2004; Naveena et al., 2005; Aouadhi et al., 2013; Oskouie et al., 2008; Tanyildizi vd., 2005; Tokcaer vd., 2006).

Sıcaklık faktörü dikkate alınarak yapılan optimizasyon çalışmalarına da sıkça rastlanmakla birlikte bu çalışmada üzerinde durulan *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarının optimum çalışma sıcaklığı hemen hemen her literatürde 30°C olarak belirtildiğinden dolayı sıcaklık, faktör olarak optimizasyona katılmamıştır (Brar et al., 2007; Park et al., 2008; Massie et al., 1985; Prabakaran and Balaraman, 2006 ; Prabakaran and Hoti, 2012).

pH aralığının belirlenmesinde ise *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* türleri için uygun aralık, literatür çalışmaları ile belirlenmiştir. En uygun pH aralığı genellikle *Bacillus thuringiensis* için 7 ve üzeri (Özkan vd., 2003; Brar et al., 2007; Khedher et al., 2011; Ketseoglou and Bouwer, 2013; Jing-Wen et al., 2007) olarak belirtilmekle birlikte *Bacillus sphaericus* için bu değer 3-6 arasında verilmektedir (Tuzen vd., 2007; Moriwaki et al., 2009; Tripathi et al., 2013).

C kaynağı, içeriği 3.1.2.1’de verilen NYSM ortamının içerdiği glikozdur. Ortam reçetesi gereği glikoz ortamda % 1 oranında bulunmaktadır (Prabakaran and Hoti, 2012; Moriwaki et al. 2009; Singh et al. 2004)). Çalışmamızda bu oranın aralığı, literatür verileri ile desteklenerek % 1-3 olarak belirlenmiştir. Programın kendi çalışması gereği bu aralığın da dışına çıkılarak deney setinin bir denemesinde C oranı % 3.52, ve % 0.48 olarak tasarlanmıştır. Bu sayede belirlenen aralıkların dışında da deneme yapabilme imkanına ulaşılmıştır.

Literatür bilgilerinden yola çıkılarak bu çalışma için belirlenen faktörler ve aralıkları Çizelge 4.15’te verilmiştir.

**Çizelge 4.15** RSM faktörlerinin çalışma aralıkları

Faktör / <i>Yanıt</i>	Çalışma Aralığı / <i>Amaç</i>
pH	4-8
İnokülasyon Miktarı (%)	2-8
C Kaynağı (%)	1-3
<b><i>Endospor üretimi</i></b>	<b><i>Maksimizasyon</i></b>

Eldeki veriler ve sonuçlar programa girildiğinde aşağıdaki deney düzeneği elde edilmiştir. Program yapılacak denemelerin sıralamasını rastgele belirlemektedir.

Aşağıdaki Şekil 4.15’te görüldüğü gibi deneytasarımına ANOVA testi uygulanmıştır. Bu deneme için öngörülen modelin ***quadratic*** olduğu görülmektedir. Model bu hali ile anlamlıdır (significant) ve tasarım bu şekilde her faktör için kullanılabilir.

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response 1 spore

ANOVA for Response Surface Quadratic model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	18.56	9	2.06	54.02	< 0.0001	significant
A-Inokulum	8.967E-003	1	8.967E-003	0.23	0.6384	
B-C kaynağı	0.24	1	0.24	6.25	0.0315	
C-pH	0.24	1	0.24	6.36	0.0302	
AB	7.920E-004	1	7.920E-004	0.021	0.8883	
AC	1.782E-003	1	1.782E-003	0.047	0.8333	
BC	0.34	1	0.34	9.02	0.0133	
A <sup>2</sup>	0.42	1	0.42	11.07	0.0077	
B <sup>2</sup>	8.44	1	8.44	221.18	< 0.0001	
C <sup>2</sup>	8.86	1	8.86	232.04	< 0.0001	
Residual	0.38	10	0.038			
Lack of Fit	0.31	5	0.063	4.59	0.0600	not significant
Pure Error	0.068	5	0.014			
Cor Total	18.94	19				

Şekil 4.15 Tasarımın response için ANOVA tablosu.

Her faktör için P değerinin anlamlılık düzeyi olan  $\alpha=0.05$ 'ten küçük olmadığını görüyoruz. Faktör A (inokulum miktarı (%)) için P değeri, response için 0.05'ten büyük çıkmıştır. Bu durumda faktör A için respons üzerinde etkinliğinin en az olduğunu söyleyebiliriz. Bunun dışındaki faktörler içinse alfa değerinden düşüktür P değerleri, model anlamlıdır diyebiliriz. Buna ek olarak gruplar arası fark olduğu söylenebilir.

Modeldeki değerler çıkartıldığında modelin hala anlamlı olup olmadığını test etmek için kullandığımız Lack of Fit değeri de beklenildiği gibi *not significant* çıkmıştır. Bu durum, faktörler arasında etkileşimin olduğunun bir göstergesidir.

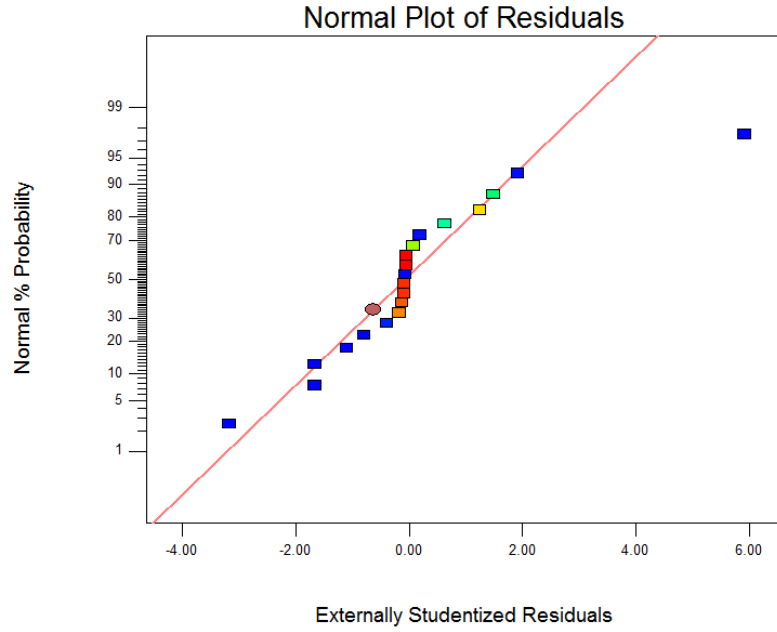
Faktörlerin F değerleri incelendiğinde  $\alpha=0.05$ 'ten küçük çıkması faktörlerin respons üzerindeki etkisini gösterir. Bu durumda respons üzerinde en etkili faktör, en küçük değere sahip olan (0.0302) pH faktörünü ifade eden faktör C'dir. Ardından respons üzerinde C kaynağı oranı değişimine dayanan Faktör B (0.0315) gelmektedir. Respons üzerinde en az etkili olan faktör ise 0.6384 değeri ile inokulum miktarını (%) ifade eden faktör A'dır.

Regresyon analizinden, endospor üretimini (Y) bağımsız değişkenler olan inokulum miktarı(A), C kaynağı (B) ve pH (C) cinsinden ifade eden denklemin aşağıdaki gibi olduğu anlaşılmaktadır (bağımsız değişkenler kodlanmış formdadır):

**Final Equation in Terms of Coded Factors:**

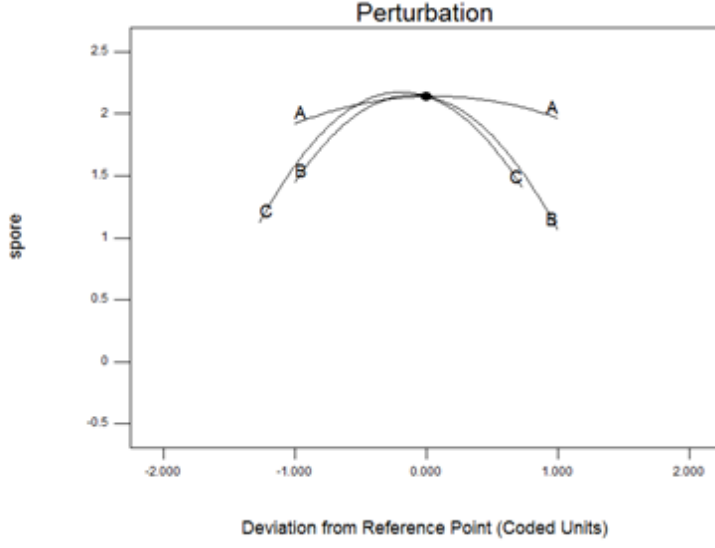
$$\begin{aligned} \text{spore} = & \\ & +2.17 \\ & +0.027 * A \\ & -0.14 * B \\ & +0.14 * C \\ & +9.950E-003 * AB \\ & -0.015 * AC \\ & -0.21 * BC \\ & -0.20 * A^2 \\ & -0.88 * B^2 \\ & -0.91 * C^2 \end{aligned}$$

Optimizasyon setine ilişkin hata dağılım grafiği (Şekil 4.16) belirtilmektedir. Lineer dağılım modelin uygunluğunu desteklemektedir.



**Şekil 4.16** Optimizasyon için hata dağılım grafiği

Pertürbasyon grafiği (Şekil 4.17)'de verilmiştir:



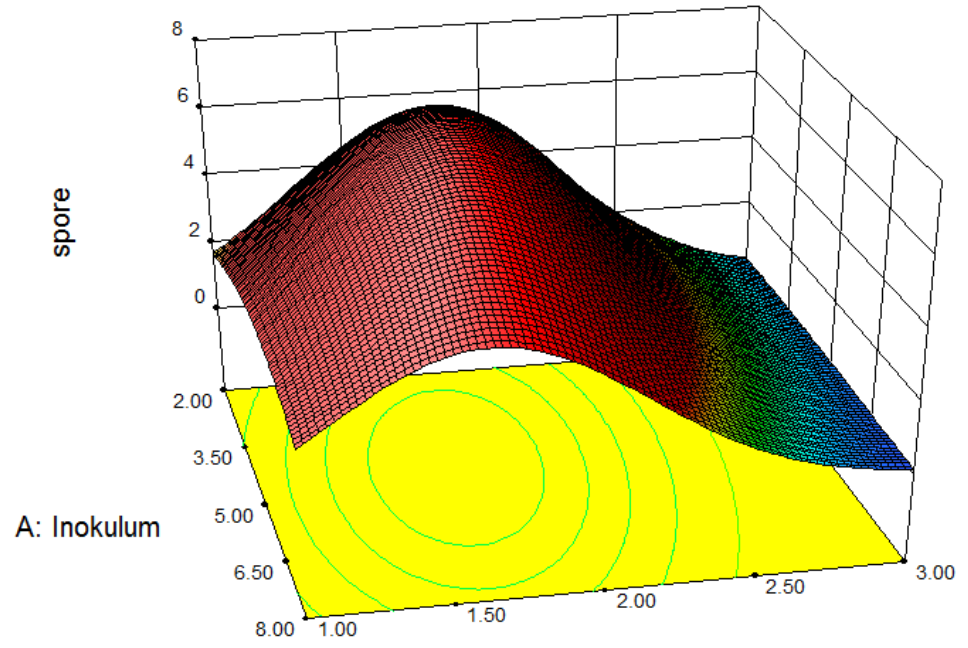
Şekil 4.17 Deney setine ait pertürbasyon grafiği

Şekil 4.17'de pertürbasyon grafiğinde de görüldüğü üzere faktör A'nın respons üzerinde etkisi en azdır.

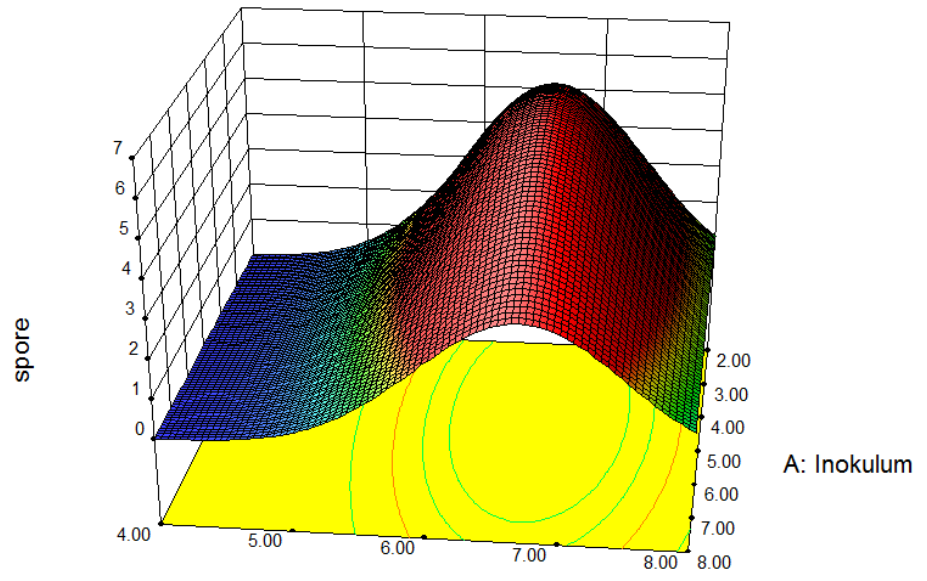
Şekil 4.18'de faktörlerin yanıt üzerindeki etkileri görülmektedir. Üç değişkenin de bir optimum noktası olduğu görülmektedir. Burada en çok etki C kaynağı (B) ve pH (C) üzerindedir.

Çalışmamızda yapılan optimizasyona yönelik pertürbasyon (Şekil 4.17), 3-D grafikleri (Şekil 4.18) incelendiğinde faktörler arasında etkileşim olduğu görülmektedir. Endospor miktarı üzerinde ise en çok pH (faktör C) ve C kaynağı oranı (faktör B) etkili olmaktadır.

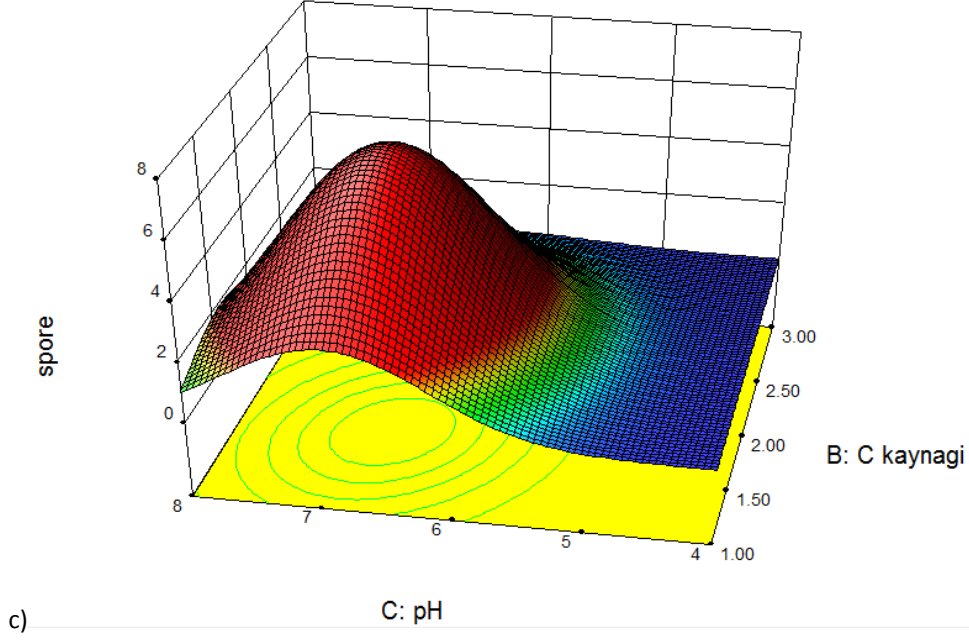
Optimizasyon çalışması sonucunda *Bacillus sp.* 30-2 kodlu izolatın en iyi ürediği koşullar pH: 6.76, karbon kaynağı oranı (%) : 1.70 ve inokulum miktarı (%) : 4.68 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17; 4.18).



a)

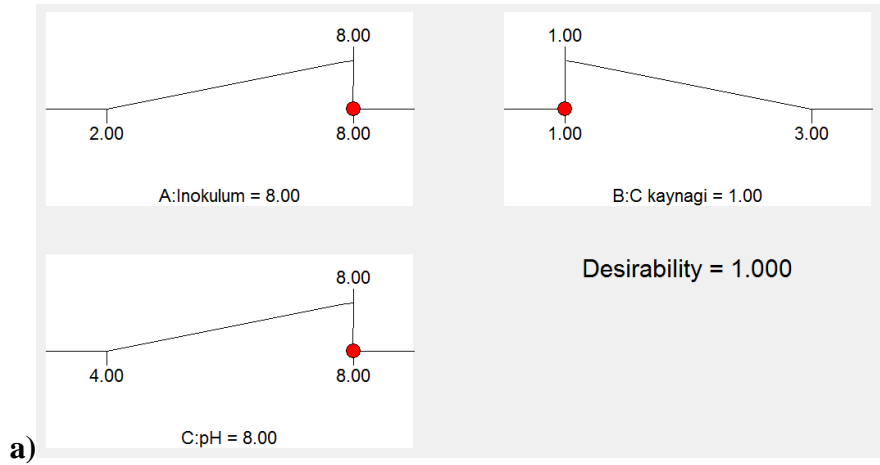


b)

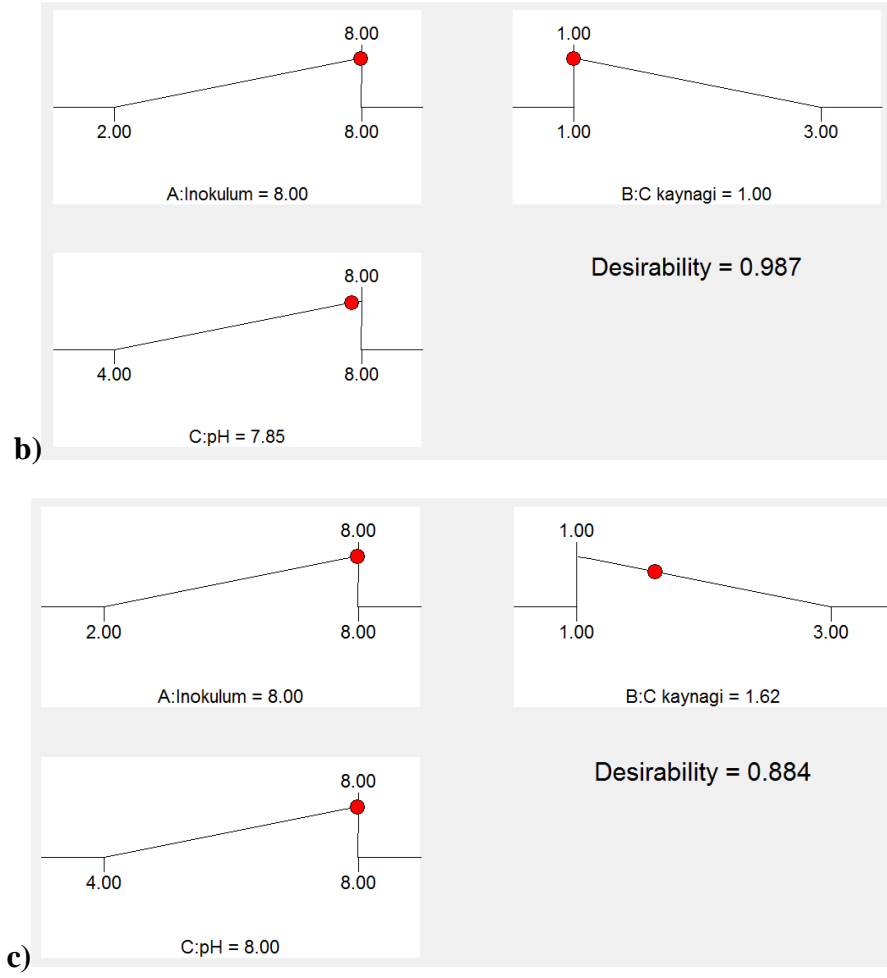


**Şekil 4.18** Respos için faktörler arası etkileşimler a)inokulum-C kaynağı; b) pH-inokulum miktarı; c)C kaynağı-pH

Denemeler sonucu program bize 35 adet çözüm yolu önermektedir (desirability). Bu 35 adet önerinin desirability oranları 1'den başlamakta ve azalarak 0.884'e kadar düşmektedir. Bunlardan bir kaç tanesi aşağıda Şekil 4.19'da görülmektedir.







Şekil 4.19 RSM çözüm önerileri a) Solution-1; b) Solution-17; c) Solution-35

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılan kaynaklardan “asetatlı seçilim yöntemi” ile endotoksin üreten potansiyel *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* türlerinin izolasyonu yapılmıştır. Çalışmada bakterilerin elde edileceği numuneler kaynaklarına göre ayrılarak 18 grup oluşturulmuştur ve her gruptan elde edilen toplam izolat sayısı 1574 olarak belirlenmiştir. Bu izolatlardan 1097 adeti asetatlı seçilim yöntemi ile izole edilmiştir. Çalışmanın bu aşaması, büyük bir *Bacillus* koleksiyonunun oluşumunu ifade etmektedir. Bilindiği üzere *Bacillus*lar, özellikle de *Bacillus thuringiensis* mikrobiyal biyoteknoloji ve endüstriyel biyoteknolojinin birçok alanında kullanılmakta, bu sebeple de uzun yıllardan beri çalışma konusu olarak halen güncelliğini korumaktadır. *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* türlerinin seçilimini sağlayan bir izolasyon yöntemi kullanılan bu çalışma sonucunda bu iki türün suşlarından oluşan büyük bir *Bacillus* koleksiyonu oluşturulmuştur. Oluşturulan koleksiyon, bundan sonra *Bacillus*lar ile yapılacak başka çalışmalar için de temel oluşturacaktır.

Çalışmamızda “Asetatlı Seçilim Yöntemi” ile izole edilmiş olan izolatların çoğu için faz kontrast mikroskobu görüntüsü alınarak izolatlar arasında endospor ve toksin proteini içerenler ayrılarak bunlar üzerinde biyolojik etkinlik testlerinin denenmesine ağırlık verilmiştir. Biyolojik etkinlik testleri sonucu yüksek mortalite oranlarına sahip olan izolat dikkate alınarak bu izolatla optimizasyon çalışmasına gidilmiştir.

Biyolojik etkinlik testlerinin denenmesinden önce laboratuvar ölçeğinde farklı besiyerlerinde endospor üretimi hem de bazı üretim koşullarının (pH, süre) belirlenmesi ile ilgili denemeler yapılmıştır. Sporlanmayı teşvik edici ortamlar olan T-3, NY, NYSM besiyerlerinde üretim denemeleri yapılmıştır, en fazla spor sayısına en kısa sürede ulaşılan ortam olan NYSM, üretim ortamı olarak seçilmiştir. Üretim süresi de yine üretimle aynı anda sürdürülen mikroskobik gözlemlere ve canlı-spor sayılarına dayandırılarak 4-5 gün olarak belirlenmiştir.

Biyolojik etkinlik testleri sonucunda % 85,33 mortalite değerine sahip olan *Bacillus sp.* 30-2 izolatı seğilmiş olup optimizasyon denemeleri bu izolat ile srdrlmştır.

Optimizasyon için farklı pH, C kaynağı miktarı (%) ve inokulum miktarında (%) retimler denenmiştir. Bu sayede en yüksek endospor miktarını veren en iyi koşullar saptanmaya ęalıřılmıřtır.

Tez ęalıřmasının devamı olarak;

Ęalıřmamızda incelenememiş olan tüm izolatların biyolojik etkinlik testleri tamamlandığında biyolojik etkinliği yüksek yeni suşların bulunma ihtimali bulunmaktadır.

Ęalıřmanın devamı olarak başka yüksek mortalite değerine sahip izolatlar üzerinde de optimizasyon denemeleri yapılabilir. Ayrıca optimizasyon ęalıřmalarında faktörler ve bunların değerlerinin aralıkları değiştirilerek ęok geniş kapsamda suşların endospor veriminin artırılması sağlanabilir.

Yüksek etkinliğe sahip suşların potens testlerinin de yaptırılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alten, B. ve Çağlar, S.S.**, 1998, TC Sağlık Bakanlığı, Vektör Ekolojisi ve Mücadelesi, Sağlık Bakanlığı Sıtma Savaşı Daire Başkanlığı ve Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü, Ankara, 249s.
- Apaydın, Ö.**, 2004, Isolation and Characterization of *Bacillus thuringiensis* Strains from Different Grain Habitats, MSc Thesis, Izmir Institute of Technology, 93s.
- Araújo, A. P., Melo-Santos, M. A. V., Sidney Carlos, O., Rios, E. M. M. M. and Regis, L.**, 2007, Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae), *Biological Control*, 41 : 339–347p.
- Armengol, G., Hernandez, J., Velez, J. G. and Orduz, S.**, 2006, Long-Lasting Effects of a *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis* Experimental Tablet Formulation for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Control, *Journal of Economic Entomology*, 99(5):1590-1595p.
- Ashm, B., Sağlam, N. ve Beyath, Y.**, 2000, Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil, *Turk J Biol*, 26 : 41-48s.
- Atehortúa, P., Álvarez, H. and Orduz, S.**, 2007, Modeling of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* in an intermittent fed batch culture with total cell retention, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30(6):447-456p.
- Avilla, C., Vargas-Osuna, E., González-Cabrera, J., Ferré, J. and González-Zamor, J.E.**, 2005, Toxicity of several  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain, *Journal of Invertebrate Pathology*, 90:51–54p.
- Avisar, D., Eilenberg, H., Keller, M., Reznik, N., Segal M., Sneh B. and Zilberstein, A.**, 2009, The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin cry1c as a potential bioinsecticide in plants, *Plant Science*, 176:315–324p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Aydın, M.**, 2004, Bakteri identifikasyonunda kullanılan standart, biyokimyasal ve fizyolojik testler, *Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel Mikrobiyoloji*, 11:91-110 s.
- Bendary M. A. E.**, 2006, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production –Review-, *J. Basic Microbiol.* 46:2, 158–170 pp.
- Birişik, N.**, 2012,TC. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Teoriden Pratiğe Biyolojik Mücadele, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü ve Adana Biyolojik Mücadele Araştırma İstasyonu, Ankara, 226s.
- Boyetchko, S., Pedersen, E., Punja, Z. and Reddy, M.**, 1999, Methods in biotechnology volume 5: Biopesticides: Use and delivery F.R. Hall and J. J. Menn, eds., Humana Press, Totowa, 626p.
- Bozlağan, İ.**, 2006, Kayseri’den Alınan Toprak Örneklerinden Elde Edilen *Bacillus thuringiensis* Suşlarının İzolasyonu, Tanımlanması Ve Bazı Zararlı Böcek Türleri Üzerindeki Toksik Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 69s.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D. and Vale’ro, J. R.**, 2006, Recent advances in downstream processing and formulationsof *Bacillus thuringiensis* based biopesticides, Review, *Process Biochemistry*,41 (2006) 323–342 pp.
- Bryant, J. E.**, 1994, Commercial production and formulation of *Bacillus thuringiensis*, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 49 (1994) 31-35 pp.
- Bravo, A., Gill, S.S. and Sobero’N, M.**, 2007, Mode of action of *Bacillus thuringiensis* cry and cyt toxins and their potential for insect control, *Toxicon*, 49:423–435 pp.
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S. S. and Soberón, M.**, 2011, *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41 :423-431 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brunet, J.F., Vachon, V., Marsolais, M., Van Rie, J., Schwartz, J. L. and Laprade R.,** 2010, Midgut juice components affect pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry9Ca, *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(3):203-208 pp.
- Burges, H.D. and Bailey, L.,** 1968, Control of the greater and lesser wax moths (*Galleria mellonella* and *Achroia grisella*) with *Bacillus thuringiensis*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 11(2):184-195 pp.
- Demirci, B.,** 2006, Iğdır ve Civarındaki Sivrisinek (Diptera: Culicidae) Türlerinin Biyo-Ekolojileri Üzerine Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, 72s.
- Doğaroğlu, T.,** 2008, *Culiseta Longiareolata* (Macquart, 1838) Ve *Culex Pipiens* L. (Diptera: Culicidae) Larvalarına Karşı *Bacillus sphaericus* Ve *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*'in Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 69s.
- Doruk, T.,** 2005, Sivrisinek Mücadelesinde Sivrisinek Larvalarına Karşı Kullanılabilecek Mikroorganizmaların Tayini ve Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri teknoloji Enstitüsü.
- European Food Safety Authority,** 2012, Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (strains ABTS 351, PB 54, SA 11, SA 12, EG 2348), EFSA Journal ;10(2):2540p.
- Farrera á, R. R., Perez-Guevara, F. and Torre, M. de la.,** 1998, Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73, *Appl Microbiol Biotechnol*, 49: 758-765 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Foda, M.S., El-Beih, F. M., Moharam, M. E. and El-Gamal, N. N.A.,** 2010, High efficiency production of mosquitocidal toxin by a novel *Bacillus sphaericus* isolate from Egyptian soils on local agroindustrial byproducts, *Journal of American Science*, 6(11) pp.
- Frankenhuyzen, K.v.,** 2009, Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins, Minireview, *Journal of Invertebrate Pathology*, 101:1–16 pp.
- Fridlender, B., Keren-Zur, M., Hofstein, R., Bar, E., Sandler, N., Keynan, A. and Braun, S.,** 1989, The development of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* as biocontrol agents: from research to industrial production, *Mem. Ins. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol:84, Supl. III, 123-127 pp.
- Geest, L.P.S. and Wassink, H.J.M.,** 1972, Standardization of *Bacillus thuringiensis* preparations: A new bioassay method with *Pieris brassicae* as test insect, *Journal of Invertebrate Pathology*, 19(3):361-365 pp.
- Ghribi, D., Zouari, N., Trigui, W. and Jaoua, S.,** 2007, Use of sea water as salts source in starch- and soya bean-based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides, *Process Biochemistry*, 42 : 374–378 pp.
- Glarei, T. R. and O’Callaghan, M.,** 1998, Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Biocontrol & Biodiversity*, Grasslands Division, AgResearch PO Box 60, Lincoln, 58 pp.
- Gong, Y., Wang, C., Yang, Y., Wu, S. and Wu, Y.,** 2010, Characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* from China, *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(2):90-96 pp.
- Gringorten, J.L., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S. and Frankenhuyzen, K.,** 1992, suppression of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin activity by low alkaline pH, *Journal of Invertebrate Pathology*, 60(1):47-52 pp.
- Haggag, W. M.,** 2002, Sustainable Agriculture Management of Plant Diseases, *Journal of Biological Sciences*, 2(4): 280-4, pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Heckel, D. G.**, 2012, Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2):103-110 pp.
- İçgen, Y., İçgen, B. ve Özcengiz, G.**, 2002, Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH, *Research in Microbiology*, 153:599–604 s.
- Iriarte, J., Bel, Y., Ferrandis, M. D., Andrew, R., Murillo, J., Ferre, J. and Caballero, V. P.**, 1997, Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain, *Systematic and Applied Microbiology* 21 (1):97–106 pp.
- Jing-Wen, Z., Ya-Fei, C., Zuheng-Hong, X., Zi-Niu, Y. and Shou-Wen, C.**, 2007, Production of thuringiensis by fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 032 with an improved pH-control glucose feeding strategy, *Process Biochemistry*, 42 : 52-56 pp.
- Keshavarzi, M.**, 2008, Isolation, identification and differentiation of local *B. thuringiensis* strains, *J. Agric. Sci. Technol.* Vol. 10: 493-499 pp.
- Maagd, R. A., Bravo, A. and Crickmore, N.**, 2001, How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world, *TRENDS in Genetics*, Vol.17 No.4:193-199 pp.
- Mandenius, C.-F. and Brundin, A.**, 2008, Bioprocess Optimization Using Design-of-Experiments Methodology, *Biotechnol. Prog.*, 24, 1191-1203 pp.
- Massie, J., Roberts, G. and White, P. J.**, 1985, Selective isolation of *Bacillus sphaericus* from soil by use of acetate as the only major source of carbon, *Applied And Environmental Microbiology*, 49(6):1478-1481 pp.
- Meretoja, T. and Carlberg, G.**, 1977, The effect of *Bacillus thuringiensis* and of cell-free supernatants of some other bacteria on the mitotic activity of human lymphocytes, *FEMS Microbiology Letters*, 2(2):109-111 pp.



### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moazami, N.**, Biopesticide Production, *Biotechnology, Encyclopedia of Life Support Systems* (EOLSS), 52 pp.
- Monteiro, L., Mariano, R. L. R. and Souto-Maior, A. M.**, 2005, Antagonism of *Bacillus spp.* against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(1):1516-8913 pp.
- Morris, O. N.**, 1973, Dosage-mortality studies with commercial *Bacillus thuringiensis* sprayed in a modified Potter's tower against some forest insects, *Journal of Invertebrate Pathology*, 22(1):108-114 pp.
- Mostafa, A.M., Fields, P.G. and Holliday, N.J.**, 2005, Effect of temperature and relative humidity on the cellular defense response of *Ephestia kuehniella* larvae fed *Bacillus thuringiensis*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(2):79-84 pp.
- Nakkeeran, S., Fernando, W.G. and Siddiqui Z.A.**, 2005, Plant Growth Promoting Rhizobacteria Formulations And Its Scope In Commercialization For The Management of Pests And Diseases. PGPR: Biocontrol and Biofertilization, ed: Siddiqui, Z.A., Springer, 257-296 pp.
- Obeta, J.A.N.**, 1986, Field evaluation of *Bacillus sphaericus* strain 1593 as a mosquito biocide, *Journal of Invertebrate Pathology*, 48(2):133-138 pp.
- Özbek, H., Güçlü, Ş. ve Hayat, R.**, 2002, Türkiye 5. Biyolojik Mücadele Kongresi Bildirileri, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisleri, Erzurum, 463 s.
- Özcan, O.**, 2008, Medium Development For Production Of *Bacillus thuringiensis* based Biopesticides, MSc Thesis, Middle East Technical University, 91 s.
- Özkan, M., Dilek, F. B., Yetis, Ü. ve Özcengiz, G.**, 2003, Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production, *Research in Microbiology* 154:49–53 s .

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Öztürk, F.**, 2007, Ankara'daki Topraklardan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması, Moleküler Düzeyde Tiplendirilmesi Ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 150 s.
- Park, H. W., Hayes, S. R. and Mangum, C. M.**, 2008, Distribution of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* from sediment samples in Florida, *Journal of Asia-Pacific Entomology*,11: 217–220 pp.
- Park, H. W., Mangum, C. M., Zhong, H. and Hayes, S. R.**, 2007, İsolation of *Bacillus sphaericus* with improved efficacy against *Culex quinquefasciatus*, *College of Engineering Sciences, Technology & Agriculture*, 8 p.
- Patel, K.D., Purani, S. and Ingle, S.S.**, 2013, Distribution and diversity analysis of *Bacillus thuringiensis* cry genes in different soil types and geographical regions of India, *Journal of Invertebrate Pathology*, 112(2):116-121 pp.
- Pedersen, J. C., Hansen, B. M., Damgaard, P. H. and Eilenberg, J.**, 1995, Dispersal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in an experimental cabbage field, *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2): 118-125 pp.
- Pendleton, I.R.**, 1969, Comparative toxicities of crystal serotypes of *Bacillus thuringiensis* for larvae of *Philosamia cynthia* var. *ricini*, *Journal of Invertebrate Pathology*,13(3):423-428 pp.
- Perron, J.M. and Benz, G.**, 1968, Effects of yeast and yeast fractions on the action of the so-called heat-stable exotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Drosophila melanogaster*, *Journal of Invertebrate Pathology*,10 (2) : 379-386 pp.
- Pinnock, D.E.**, 1994, The use of *Bacillus thuringiensis* for control of pests of livestock, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 49(1):59-63 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Poopathi, S. and Abidha, S.,** 2010, Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance, *Journal of Physiology and Pathophysiology*, Vol. 1(3):22-38 pp.
- Prabakaran, G., Balaraman, K., Hoti, S.L. and Manonmani, A.M.,** 2007, A cost-effective medium for the large-scale production of *Bacillus sphaericus* H5a5b (VCRC B42) for mosquito control, *Biological Control*, 41(3):379-383 pp.
- Prabakaran, G. and Balaraman, K.,** 2006, Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, *Biological Control*, 36:288–292 pp.
- Prabakaran, G. and Hoti, S.L.,** 2008, Application of different downstream processing methods and their comparison for the large-scale preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* after fermentation for mosquito control, *Biologicals*, 36:412-415 pp.
- Prabakaran, G. and Hoti, S.L.,** 2012, Immobilization in alginate as a new technique for the separation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spore crystal complex, *Biological Control* 61 : 128–133 pp.
- Regis, L., Oliveira, C. M. F. M., Silva-Filha, H., Silva, S. B., Maciel, A. and Furtado, A. F.,** 2000, Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil, *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine and Hygiene*, 94:488-492 pp.
- Rowe, G. E. and Margaritis, A.,** 2004, Bioprocess design and economic analysis for the commercial production of environmentally friendly bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD-1 kurstaki, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 86, no. 4.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T. and Christou, P.,** 2011, *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications, *Plant Biotechnology Journal*, 9:283–300 pp.
- Sanyal, I., Singh, A. K., Kaushik, M. and Amla, D.V.,** 2005, Agrobacterium-mediated transformation of chickpea (*cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis* cryIac gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*, *Plant Science*, 168(4):1135-1146 pp.
- Sarrafzadeh, M.H., Belloy, L., Esteban, G., Navarro, J.M. and Ghommidh, C.,** 2005, Dielectric monitoring of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*, *Biotechnology Letters*, 27(7):511-517 pp.
- Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O. P.,** 2004, Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Can. J. Microbiol.* 50:1–17 pp.
- Singh, J., Vohra, R.M. and Sahoo, D.K.,** 2004, Enhanced production of alkaline proteases by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture, *Process Biochemistry*, 39:1093–1101 pp.
- Sreekumar<sup>1</sup>, G. and Krishnan, S.,** 2010, Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology, *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(45), pp. 8078-8084 pp.
- Surendran, A. and Vennison, S. J.,** 2011, Occurrence and distribution of mosquitocidal *Bacillus sphaericus* in soil, *Academic Journal of Entomology*, 4 (1): 17-22 pp.
- Şahin, F., Arat, S., Turan, M., Eşitken, A., Sağdıç, O., Kesmen, Z. ve Ünal, Ö., E., (Editör: Kiper, M.),** 2013, *Biyoteknoloji Sektörel İnovasyon Sistemi*, Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı, Ankara, Kısım-3.
- TC. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü,** “İnsektisit, Rodentisit, Akarisit, Mollusisit İthal ve Üretim İzni İçin Başvuru Formu”, <http://www.saglik.gov.tr/TR/dosya/1-48948/h/basvuruyeni.pdf> (Erişim tarihi: 9.06.2014)

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- TC. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Tüketici ve Çalışan Güvenliği Başkan Yardımcılığı Çevre Sağlığı Daire Başkanlığı**, 2013, Biyosidal Ürünlerin Biyolojik Etkinlik, Kimyasal Analiz, Stabilité, İrritasyon ve Potens Testlerinin Yapılmasına Dair Usul ve Esaslar, Ankara, 20s.
- Thiery, I. and Frachon, E.**, 1997, Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria, Academic Press Limited, Paris, Fransa, 55-78 pp.
- Thomas, W. E. and Ellar, D. J.**, 1983, *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* Crystal6-Endotoxin:Effects on insect and mammalian cells invitro and invivo, *J.CellSci.* 60:181-197 pp.
- Tokcaer, Z., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü., Özcengiz, G. ve Alaeddinoğlu N. G.**, 2006, Response surface optimization of antidipteran delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp.*israelensis* HD 500, *Process Biochemistry*, 41:350–355 s.
- Travers, R. S., Martin, P. A. W. and Reichelderfer, C. F.**, 1987, Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus spp.*, *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6):1263-1266 pp.
- Tuncer, C. ve Ecevit, O.**, 1994, *Bacillus thuringiensis* ürünleri ve böceklerde dayanıklılığın önemi, *Türk. entomol. Dergisi*, 18 (2):119-128 s.
- United States Environmental Protection Agency**, <http://www.epa.gov/>, (Erişim tarihi: 12 Eylül 2008).
- Usta, C.**, 2013, Microorganisms in Biological Pest Control, A Review (Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors), Current Progress in Biological Research, 32s.
- Vachon, V., Laprade, R. and Schwartz, J. L.**, 2012, Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review, *Journal of Invertebrate Pathology* , 111:1-12 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Vallejo, F., Gonzalez, A., Posada, A., Restrepo, A. and Orduz, S.,** 1999, Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* by batch and fed-batch culture, *Biotechnology Techniques*, 13: 279–281 pp.
- Vora, D. and Shethna, Y. I.,** 1999, Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in oil seed meal extract media containing cystine, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15: 747-749 pp.
- Yadav, K., Dhiman, S., Baruah, I. and Singh, L.,** 2011, Development cost effective medium for production of *Bacillus sphaericus* strain isolated from Assam, India, *Microbiology Journal*, 1 (2):65-70 pp.
- Yeza, A. , Tyagi, R. D., Valéro, J. R. and Surampalli, R. Y.,** 2005, Production of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in batch and fed batch cultures using wastewater sludge as a raw material, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80:502–510 pp.
- Yılmaz, M. ve Beyatlı, Y.,** 2003, *Bacillus* cinsi bakterilerde antimikrobiyal aktivite ve antibiyotik üretimi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 01:07-35-49 s.
- Zouari, N. and Jaoua, S.,** 1999, Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with  $\delta$ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain grown on gruel-based media, *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3-5):364-371 pp.

# Elif IŞIKÇI



**Kişisel Bilgilerim :** UYRUĞU : TC  
 DOĞUM YERİ VE TARİHİ : Altındağ (ANKARA) – 18.11.1989  
 MEDENİ DURUMU : Bekar  
 EHLİYET : B sınıfı

**Eğitim Durumum:** 2012-... EGE ÜNİVERSİTESİ BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM  
 DALI YÜKSEK LİSANS ÖĞRENCİSİ

Yüksek lisans tez konusu, “Sivrisinek Mücadelesi İçin Yeni *Bacillus* Formülasyonlarının Geliştirilmesi” olup uygulamaları endüstriyel mikrobiyoloji konusuna dayanmaktadır (Danışman: Prof. Dr. Rengin ELTEM).

2008-2012 EGE ÜNİVERSİTESİ MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ  
 BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ LİSANS MEZUNU

(Mezuniyet Derecesi 3.09 / 4)

Lisans bitirme tez konusu (uygulamalı tez) “fungal mikroorganizmalardan kolesterol düşürücü etken maddelerin üretimi” olup, uygulamaları biyoproses çalışmalarına dayanmaktadır.

2003 – 2007 GÖNEN ANADOLU LİSESİ

(Mezuniyet derecesi 97.26 / 100)

**Niteliklerim:** YABANCI DİLLER : - İNGİLİZCE ( iyi seviyede )

- ALMANCA ( başlangıç seviyede )

BİLGİSAYAR BİLGİSİ : Microsoft Office Programları ( word, powerpoint, excell),

Visual basic, Matlab, İnternet

**Deneyimlerim:**

**İş :**

- TC. İstanbul Arel Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Biyomedikal Bölümü Araştırma Görevlisi (Mart 2014-..)

**Stajlar:**

- DANONE TİKVEŞLİ Gönen fabrikasında 20 iş günü zorunlu staj (2011).
- Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Genetik Bölümünde 18 iş günü gen transferi, hücre kültürü ve klonlama konularında gönüllü staj (2011).
- E.Ü. Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü "Laboratuvar Deneyim Sertifika Programı" kapsamında "Endüstriyel Mikrobiyoloji" ve "Doğal Ürün Kimyası Laboratuvarında" yürümekte olan "Denizel Aktinomisetlerden Yeni Biyoaktif Metabolitlerin Keşfine yönelik bir TÜBİTAK projesinde 40 iş günü gönüllü staj (2010).
- Gönen Devlet Hastanesi tıbbi tahlil laboratuvarında 24 iş günü gönüllü staj (2009).

**Seminerler / Aktiviteler:**

- ISO 17025: Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği İçin Genel Şartlar Standardı sertifikalı eğitim programına katılmıştır (15 Aralık 2012).
- ISO 18000: ISG Yönetim Sistemi (OHSAS) sertifikalı eğitim programına katılmıştır (27-28 Eylül 2012).
- ISO 14001:2004 Çevre Yönetim Sistemi sertifikalı eğitim programına katılmıştır (27-28 Eylül 2012).
- ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi sertifikalı eğitim programına katılmıştır (27-28 Eylül 2012).
- Kök hücre sempozyomu düzenleme komitesinde yer alınmıştır (27-29 Nisan 2012).
- Biyomühendislik Zirvesi düzenleme komitesinde görev alınmıştır (20-21 Nisan 2012).



- DANONE fabrikasında yaptığım stajım esnasında GMP ve HACCP eğitimleri alınmıştır (2011).
- ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi sertifikalı eğitim programına katılmıştır (2011).
- EÜ Biyomühendislik laboratuvarında yürütülen TÜBİTAK projesindeki staj tecrübesi sonucunda “ Araştırma Deneyim Sertifikası” alınmıştır (2011).
- MİNİ MBA ( 26-27 Aralık 2009 ).
- EBİLTEM ( Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Topluluğu üyesi 2008-..).

#### **Katılınan Sempozyumlar:**

- Yıldız Teknik Üni. IV. Biyomühendislik Günleri (Katılımcı) – 29.05.2014
- İstanbul AREL Üniversitesi Elektrik-Elektronik, Bilgisayar, Biyomedikal Mühendislikleri Bilimsel Toplantısı (görevli) – 26-27.05.2014
- 1. Ege Nanoteknoloji Günleri (katılımcı) – 18-19.04.2013
- Kök Hücre Sempozyumu (görevli) – 27-29.04.2012
- Türkiye Biyomühendislik Zirvesi (görevli) – 20-21.04.2012
- Doku Mühendisliği Sempozyumu (katılımcı) – 11.04.2011
- 2. Kök Hücre Sempozyumu (katılımcı) – 23.03.2010
- Yapay Doku ve Organ Sempozyumu (katılımcı) – 27.10.2009
- “Ege’den Anadolu’ya” Halk Oyunu gösterisi (görevli) – 23.05.2009
- Kök Hücre Sempozyumu (katılımcı) – 16.03.2009

#### **İlgi Alanlarım/hobilerim:**

- Sinema, müzik, yüzme, gezi
- Halk Dansları ( 2008 – 2010 Ege Üniversitesi Halk Dansları Topluluğu üyesi)

#### **Referanslarım:**

- Prof. Dr. Rengin ELTEM (EÜ)  
E-Posta : [rengin.eltem@ege.edu.tr](mailto:rengin.eltem@ege.edu.tr)
- Prof. Dr. Murat ELİBOL (EÜ)  
Tel : 0 (232) 388 4000 / 2582 , E-Posta : [murat.elibol@ege.edu.tr](mailto:murat.elibol@ege.edu.tr)
- Prof. Dr. Nuri AZBAR (EÜ)

Tel : 232-3880378 (138) , 232, E-Posta : nuri.azbar@ege.edu.tr

- Doç. Dr. E. Esin KOCABAŞ (EÜ)

Tel : 232.388 4000 - 2582 , 232 , E-Posta : esin.kocabas@ege.edu.tr

- Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ (EÜ)

Tel : + 90 232 3434400, E-Posta : ozlem.yesil.celiktas@ege.edu.tr

- Yrd. Doç. Dr. Sait SARGIN (EÜ)

E-Posta : sayit.sargin@ege.edu.tr

**İletişim Bilgilerim:** EV ADRESİ : Beylikdüzü / İstanbul

TEL : İş: 90 212 867 25 00 / 1098

Cep: 0536 584 00 83 / 0506 939 03 19

E-MAIL : [elif.isikci@gmail.com](mailto:elif.isikci@gmail.com) / [elif-bm1@hotmail.com](mailto:elif-bm1@hotmail.com)