

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

147268

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**OBEREA LINEARIS'İN BAKTERİYAL FLORASININ VE  
MİKROBİYAL MÜCADELE AJANLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Ali Adem BAHAR**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 03 Ocak 2006  
Tezin Savunma Tarihi : 25 Ocak 2006**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ**

**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mahmut EROĞLU**

**Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU**

147368

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT**

**Trabzon 2006**

## ÖNSÖZ

*Oberea linearis*'in bakteriyal florasının ve mikrobiyal mücadele ajanlarının araştırıldığı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a, arazi çalışmaları ve böceklerin sağlanması konusunda gösterdiği yardımlarından dolayı sayın Arş. Gör. Hüseyin YILMAZ'a laboratuvar çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları yardımlardan dolayı Arş. Gör. Hacer MURATOĞLU, Arş. Gör. İkbâl Agah İNCE, Arş. Gör. Dr. Kazım SEZEN, Yrd. Doç. Dr. İsmail DEMİR, Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Hatice KATI'ya ve beni yalnız bırakmayan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu tezin hazırlanması sırasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen fedakar aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarımın yürütülmesinde maddi destek sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu ve Devlet Planlama Teşkilatı'na teşekkür ediyorum.

Ali Adem BAHAR

Trabzon 2006

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ .....	IX
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Fındık Zararlıları ve Ekonomik Etkileri.....	2
1.3. <i>Oberea linearis</i> (L. 1761).....	5
1.3.1. <i>Oberea linearis</i> 'in Zarar Şekli .....	5
1.4. <i>Oberea linearis</i> ile Mücadele Yöntemleri (Kimyasal, Mekanik, Biyolojik) ....	6
1.5. Biyolojik Mücadele .....	7
1.5.1. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar .....	9
1.5.1.1. Predatörler .....	10
1.5.1.2. Parazitler .....	10
1.5.1.3. Mikroorganizmalar .....	11
1.5.1.3.1. Bakteriler .....	13
1.5.1.3.2. Virüsler .....	17
1.5.1.3.3. Mantarlar .....	17
1.5.1.3.4. Nematodlar .....	18
1.5.1.3.5. Protozoalar .....	18
1.6. Zararlı Böceklerdeki Patojen Mikroorganizmaların Belirlenmesi .....	19
1.6.1. Makroskobik İnceleme .....	19
1.6.2. Mikroskobik İnceleme .....	20
1.7. Bakterilerin Tür Tayininde Kullanılan Kriter ve Yöntemler .....	22
1.7.1. Nümerik Taksonomi .....	22

1.7.2.	Metabolik Enzim Profilleri ve Biyokimyasal Özelliklerine Göre Bakterilerin Tamsı ve Karakterizasyonu .....	25
1.7.3.	Moleküler Yöntemler .....	29
1.8.	Mikroorganizmaların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi .....	30
1.9.	Çalışmanın Amacı .....	31
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	32
2.1.	Böceklerin Toplanması .....	32
2.2.	<i>Oberea linearis</i> Larvaları için Laboratuarda Uygun Ortam Oluşturulması .....	32
2.3.	<i>Oberea linearis</i> 'in Bakteriyal Florasının Belirlenmesi .....	33
2.3.1.	Bakteri İzolasyonu .....	33
2.3.2.	Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması .....	34
2.3.3.	Bakteriyal İzolatların Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi .....	34
2.3.3.1.	Basit Boyama .....	34
2.3.3.2.	Gram Boyama .....	34
2.3.3.3.	Endospor Boyama .....	35
2.3.3.4.	Kapsül Boyama .....	35
2.3.3.5.	Hareket Testleri .....	36
2.3.4.	Bakteriyal İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	36
2.3.4.1.	Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi .....	36
2.3.4.2.	Büyüeybildikleri pH Aralıklarının Belirlenmesi .....	36
2.3.4.3.	NaCl Toleranslarının Belirlenmesi .....	37
2.3.5.	Bakteriyal İzolatların Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi .....	37
2.3.5.1.	Nişasta Hidroliz Testleri .....	37
2.3.5.2.	Jelatin Hidroliz Testleri .....	37
2.3.5.3.	İndol Oluşumu Testi .....	38
2.3.5.4.	Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer Testleri (MRVP).....	38
2.3.5.5.	Sitrat Testleri .....	39
2.3.5.6.	Hidrojen Sülfür (H <sub>2</sub> S) Üretim Testleri .....	39
2.3.5.7.	Üre Hidroliz Testleri .....	39
2.3.5.8.	Nitratı İndirgeme Testleri .....	40
2.3.5.9.	Katalaz Testleri .....	40
2.3.5.10.	Oksidaz Testleri .....	41
2.3.5.11.	Karbonhidrat Fermentasyon Testleri .....	41

2.3.6.	API 20E Panel Test Sistemi .....	41
2.3.7.	Phoenix 1000A Panel Test Sistemi .....	42
2.3.8.	İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi .....	42
2.3.8.1.	İzolatların Genomik DNA'larının izolasyonu .....	42
2.3.8.2.	16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Artırılması .....	42
2.3.8.3.	16S rRNA Geninin Baz Dizisinin Belirlenmesi ve Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması .....	43
2.4.	İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi .....	43
2.4.1.	İzolatların Biyoassay İçin Hazırlanması .....	43
2.4.2.	İzolatlardan Hazırlanan Numunelerin <i>Oberea linearis</i> Larvalarına Uygulanması .....	43
3.	BULGULAR .....	45
3.1.	<i>Oberea linearis</i> 'in Doğada Yayılışı ve Zarar Şekli .....	45
3.2.	Böcek Larvalarının Toplanması ve Laboratuvar Ortamına Adaptasyonu .....	46
3.3.	<i>Oberea linearis</i> Larvalarının Bakteriyal Florası .....	48
3.3.1.	Bakteriyal İzolatların Sistemik Özellikleri .....	48
3.3.1.1.	İzolatların Morfolojik Özellikleri .....	48
3.3.1.2.	İzolatların Fizyolojik Özellikleri .....	49
3.3.1.3.	Bakteriyal İzolatların Biyokimyasal ve Metabolik Özellikleri .....	50
3.3.1.3.1.	API20E Panel Test Sistemi ile Tespit Edilen Özellikler .....	52
3.3.1.3.2.	Phoenix 1000A Panel Test Sistemi Belirlenen Özellikler .....	53
3.3.1.4.	İzolatların Bazı Genetiksel Özellikleri .....	56
3.3.1.4.1.	16S rRNA Genlerinin Baz dizileri .....	56
3.3.	İzolatların <i>Oberea linearis</i> Larvaları Üzerine Olan İnsektisidal Etkileri .....	58
3.4.	Diğer Fındık Zararlılarından İzole Edilen Bakterilerin <i>Oberea linearis</i> Larvaları Üzerindeki İnsektisidal Etkileri .....	58
4.	TARTIŞMA .....	60
5.	SONUÇLAR .....	73
6.	ÖNERİLER .....	74
7.	KAYNAKLAR .....	75
8.	EKLER .....	85
	ÖZGEÇMİŞ .....	95

## ÖZET

*Oberea linearis* (Fındık Uçkurutan, Coleoptera: Cerambycidae) ülkemiz fındık tarlalarında çok büyük zararlara yol açan bir zararlıdır. Günümüze kadar bu zararlıya karşı etkin bir biyolojik mücadele uygulanmamıştır.

Bu çalışmada, *Oberea linearis*'in bakteriyal florasının belirlenmesi, bir patojen tespit edilerek bu patojenin *Oberea linearis*'e karşı başlatılabilecek bir biyolojik mücadelenin temelini teşkil etmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Giresun ve Trabzon illerindeki fındık bahçelerinden toplanan *Oberea linearis* larvaları incelenmiş, zararlıının bakteriyal florası belirlenmiş ve olası patojen diğer mikrobiyal mücadele ajanlarının varlığı araştırılmıştır.

Sonuç olarak, *Oberea linearis* larvalarından 13 bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin yedisi tür seviyesinde, altısı ise cins seviyesinde tanımlanmıştır. Bu çalışma kapsamında bakterilerin tür tayininde, rutin olarak kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin yanı sıra, bakteriler API20E ve Phoenix 1000A panel test sistemleri kullanılarak metabolik enzim profilleri ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiş, moleküler seviyede ise 16S rDNA dizin analizi yöntemi kullanılmıştır. İzole edilen bakterilerin *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas* sp., *Enterobacter cancerogenus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens* oldukları belirlenmiştir. İzolatların *Oberea linearis* üzerindeki insektisidal etkilerine bakıldığında ise *Serratia marcescens*'in larvalar üzerinde %65 öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Oberea linearis*, Bakteriyal Flora, Biyolojik Kontrol, Moleküler Bakteri İdentifikasyonu, Böcek patolojisi

## SUMMARY

### **Investigation of Bacterial Flora and Microbial Control Agents of *Oberea linearis* L. (Coleoptera: Cerambycidae)**

*Oberea linearis* (Coleoptera: Cerambycidae) is very serious pest of hazelnut in Turkey. Up to now, there is no effective biological control against this pest around the world.

The aim of this study is to determine microbial flora of the *Oberea linearis* and find out an opportunistic pathogen to use as possible biological control agent against this pest. For this purpose, *Oberea linearis* larvae were collected from Trabzon and Giresun hazelnut fields. The microbial flora of this pest and the microbial potential of bacterial isolates were determined.

As a result, 13 different bacteria were isolated from *Oberea linearis* larvae. Nine of these bacteria determined and characterized at species level and four of them characterized at genus level. In this study, we determined morphological, physiological and biochemical properties, metabolic enzyme profiles by API20E and Phoenix 1000A panel test systems. 16S rRNA gene sequence analysis was also performed to determine isolates at molecular level. The isolates were identified as *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas* sp., *Enterobacter cancerogenus*., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*.

65 % insecticidal activity was determined with *Serratia marcescens* against *Oberea linearis*.

**Keywords:** *Oberea linearis*, Bacterial flora, Biological control, molecular bacterial identification, insect pathology

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

- Şekil 1. *Oberea linearis*'in erginleri ve larvası. a; erkek ve dişi erginler, b; larva, c; ergin bireyin yaprak üzerindeki görünümü ..... 5
- Şekil 2. *Oberea linearis*'in oluşturduğu zarar şekli. a; *Oberea linearis*'in yumurta bıraktığı fidenin görünümü, b; erişkin larvanın dal içindeki görünümü. .... 6
- Şekil 3. *Bt.* parasporal kristallerinin aktif toksine dönüşmesi ..... 15
- Şekil 4. *Bt.* toksininin böcek bağırsak epitelyum hücresi membranına insersiyonu ..... 16
- Şekil 5. İçerisinde larva olduğu tahmin edilen fındık fidelerinin karakteristik özelliklerinin şematik gösterimi ..... 45
- Şekil 6. İçerisinde *Oberea linearis* bulunduran fındık fidelerinden bir örnek ..... 46
- Şekil 7. *Oberea linearis* larvasının yerleştiği kanal içerisinde vücut yönünü değiştirmesi . 47



## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Tespit edilmiş fındık zararlıları ve ait oldukları gruplar .....	2
Tablo 2. Çeşitli <i>B. thuringiensis</i> toksinleri ve etkili oldukları zararlılar .....	14
Tablo 3. API 20E test panel sisteminin içerdiği testler .....	27
Tablo 4. Phoenix 1000A cihazının test panellerinin sahip olduğu testler .....	28
Tablo 5. İzolatların morfolojik özellikleri.....	49
Tablo 6. İzolatların fizyolojik özellikleri .....	50
Tablo 7. İzolatların klasik yöntemlerle belirlenen biyokimyasal özellikleri.....	51
Tablo 8. İzolatların API20E Panel Test Sistemi ile belirlenen özellikleri .....	52
Tablo 9. Bakteriyal izolatların Phoenix 1000A cihazı ile belirlenen özellikleri .....	54
Tablo 10. Belirlenen 16S rDNA dizinlerinin gen bankasındaki genler ile karşılaştırılmaları.....	56
Tablo 11. <i>Oberea linearis</i> larvalarından ve farklı fındık zararlılarından izole edilmiş bakterilerin <i>Oberea linearis</i> larvalarına uygulanması.....	59
Tablo 12. 1 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	62
Tablo 13. 2 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	62
Tablo 14. 3 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	63
Tablo 15. 4 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	64
Tablo 16. 5 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	65
Tablo 17. 6 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	65
Tablo 18. 7 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	66
Tablo 19. 8 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	67
Tablo 20. 9 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	68
Tablo 21. 10 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	68
Tablo 22. 12 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	69
Tablo 23. 11 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	70
Tablo 24. 13 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması .....	71

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\Delta T_m$	: DNA'nın komplementer iki zincirinin birbirinden ayrılma sıcaklığı
ADH	: Arginin Dehidrolaz
AMY	: Amigdalın
ARA	: Arabinoz
bp	: Baz çifti
CIT	: Sitrat
CFU	: Koloni oluşturabilen birim
DDT	: Dikloro-Difenil-Trikloroetan
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
EDWIP	: Dünya Böcek Patojenleri Ekolojik Veritabanı
GEL	: Jelatin
GLU	: Glukoz
H <sub>2</sub> S	: Hidrojen Sülfür
ICP	: İnsektisidal Kristal Proteini
IND	: İndol
INO	: İnositol
LDC	: Lisin Dekarboksilaz
MAN	: Mannitol
MEL	: Melibiose
MK	: Metil kırmızıS1
NPV	: Nukleopolihedrovirüs
ODC	: Ornitin Dekarboksilaz
PBS	: Fosfat Buffer Salın
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi
RHA	: Rhamnose
RNA	: Ribonükleik Asit
SAC	: Sukroz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SOR	: Sorbitol

TDA : Triptofan Deaminaz

URE : Üre

VIDIL : Böcek Viral Hastalıkları Veritabanı

VP : Voges Proskauer

WHO : Dünya Sağlık Örgütü



# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Fındık (*Corylus* sp. L.) Betulaceae familyası içinde yer alan çalı formunda çok yıllık bir bitkidir. Meyveleri nuks tipindedir (Ayfer, 1983). Kış aylarında çiçeklenen ve döllenerek tek bitkidir. Dişi çiçeklerin çanak yaprakları "çotanak" adı verilen fındık kadehini oluşturur. Ülkemizdeki kültür fındıkları, 5-6 metre boylanabilir (URL-1, 2005, Sezen, 1998).

Fındık, bundan 5000 yıl önce Çin'de yetiştirilmekte ve tüketilmekteydi. Eski Yunan medeniyetinde fındık önemli bir gıda olarak kabul görmekteydi. Antik çağlarda da Giresun yöresinden Atina'ya fındık ticareti yapıldığını gösteren arkeolojik bulgulara rastlanmıştır. Yaklaşık 5 bin yıldır tanınan ve kullanılan fındık, üç ana gruba ayrılır. Bunlar tombul fındıklar, sivri fındıklar ve diğer kabuklu fındıklardır. Türkiye'de fındığın on üç değişik çeşidi yetiştirilmektedir. a) Tombul Fındıklar: Tombul, Palaz, Mincane, Gök, Kalıncara, Kan, Cavcava ve Delisava (Çakıldak), b) Sivri Fındıklar: Karasivri, Sarı Sivri, İncekara, Kuş. c) Diğer Kabuklu Fındıklar: Badem, Foşa, Kargalak, Ordu İkizi (URL-2, 2005).

Fındığın son iki yılda ülkemizin en fazla gelir elde edilen tarım ürünü haline gelmesi, milli ekonomimize her yıl ortalama 750.000.000 \$'lık bir döviz girdisi sağlanması, fındıktan elde edilen gelirin yaklaşık 2 milyon insanımızı doğrudan, 8 milyon insanımızı da dolaylı olarak ilgilendirmesi, sağlık açısından oldukça yararlı bir besin olması fındığın ülkemiz için vazgeçilemez bir tarım ürünü haline getirmektedir. Dünyadaki fındık ekili alanların %84'ünün ülkemizde bulunmasına karşın, dünya fındık üretiminin sadece %75'inin ülkemize ait olması bu kadar değerli bir tarım ürünümüzden yeterince faydalanamadığımızın açık bir göstergesidir (Kurt, 2004; URL-3, 2005; URL-1, 2005). Birim alandan alınan verimin az olmasının en önemli sebeplerinden biri fındıkta zarar oluşturan böceklerle etkili mücadelenin yapılamamasıdır.

*Oberea linearis* (Fındık Uçkurutan, Coleoptera, Cerambycidae) Karadeniz Bölgesinde ve ülke genelinde önemli yeri olan fındık üzerinde verim azalmasına ve kalitenin düşmesine neden olan önemli bir zararlı böcektir (URL-4, 2005).

## 1.2. Fındık Zararlıları ve Ekonomik Etkileri

Bugüne kadar ülkemizde tespit edilmiş olan 15 adet fındık zararlısı mevcuttur. Bu zararlılar Tablo 1’de gösterilmiştir. Bunların pek çoğunun mikrobiyal florası şu ana kadar çalışılmıştır.

*Fındık Kozalak Akarı (Eriophyes avellanae NL.)* sağlam sürgün ve meyve gözlerine girerek onların şişkinleşip kozalak şeklini almalarına sebep olur. En çok sürgün ucundan kozalak oluşur. Az oranda erkek organlar da zarar görürler. Genel olarak üç sürgünden biri meyve sürgünüdür. Sürgün ya da meyve verecek bu gözlerin zarar görmesiyle bitkide gelişme engellenir ve verim azalır. Doğrudan verimi etkilemesi nedeniyle, ekonomik olarak fındığın en önemli zararlılarından biridir (Işık, 1992; Erdem, 1970; Kurt, 1982).

Tablo 1. Tespit edilmiş fındık zararlıları ve ait oldukları gruplar

Fındık zararlıları		Mikrobiyal Flora (Referans)
Fındık kozalak akarı	( <i>Eriophyes avellanae</i> NL.) Acarina	-
Fındık kurdu	( <i>Balaninus nucum</i> L.) Coleoptera	(Sezen ve Demirbağ 1999)
Mayıs böceği	( <i>Melolontha melolontha</i> L.) Coleoptera	(Sezen vd., 2002)
Dalkıran	( <i>Xyleborus dispar</i> Fabr.) Coleoptera	(Muratoğlu vd., 2005)
Kızılağaç böceği	( <i>Agelastica alni</i> L.) Coleoptera	(Sezen vd., 2004)
Uçkurutan	( <i>Obera linearis</i> L.) Coleoptera	-
Fındık yaprak deleni	( <i>Anoplus roboris</i> Suf.) Coleoptera	(Demir vd., 2002)
Fındık gal sineği	( <i>Mikomyia coryli</i> Kieffer.) Diptera	-
Fındık kokarcası	( <i>Palamena prasina</i> L.) Hemiptera	-
Kahverengi koşniller	( <i>Parthenocanium corni</i> Bouche)	-
	( <i>Parthenocanium rufulum</i> Ck.) Homoptera	-
Fındık virgül kabuklu biti	( <i>Lepidosaphes ulmi</i> L.) Homoptera	-
Fındık yaprak biti	( <i>Mizocallis coryli</i> G.) Homoptera	-
Fındık filiz güvesi	( <i>Gypsonoma dealbana</i> Fröhl.) Lepidoptera	(Demir vd., 2000)
Kır tırtılı	( <i>Lymantria dispar</i> L.) Lepidoptera	
Amerikan beyaz kelebeği	( <i>Hyphantria cunea</i> Drury.) Lepidoptera	(Yaman vd., 2000)

*Fındık Kurdu (Balaninus nucum L.)* beslenme ve yumurta bırakma yolu ile meyvelerde zararlı olur. Bu zararlı fındığın meyve kabuğunu hortumunun ucunda bulunan dişleriyle kemirerek deler ve kabuk içinde yumuşak etli kısımla beslenir. Bir böcek beslenme yolu ile yaklaşık 80 meyveye, bir dişi böcekte yumurta bırakma yolu ile yaklaşık 40 meyveye zarar verir. Buradan bir çift erginin ortalama 200 meyveye zarar verdiği anlaşılır. Ortalama olarak 200 dane fındığın yaklaşık 0.5 kg olduğu kabul edildiğinde, zararın boyutları daha iyi anlaşılabilir. yirmibeş ocaktan meydana gelen

yaklaşık 0.5 dekarlık bir alandan 10 çift böcek bulunabileceği dikkate alınır, bu sayıdaki böceğin 2000 adet fındık danesine zarar verdiği, yani bununda yaklaşık 5kg fındık ettiği, bu durumda büyük bir ekonomik kayba yol açtığı görülmektedir (Işık, 1992; Erdem, 1970; Kurt, 1982).

*Mayıs Böceği (Melolontha melolontha L.)* Doğu Karadeniz bölgesinde yaygın olarak bulunur. Böceğin erginleri yaprak ve çiçeklerde, larvaları ise saçak ve kalın köklerde zararlı olurlar. Bir çok bahçede önemli derecede kurumalara neden olan böceğin zararı bazı yerlerde %50'lere ulaşır (Işık, 1992; Erdem, 1970; Kurt, 1982).

*Dalkıran (Xyleborus dispar Fabr.)* böceğinin ergin dişileri 0.8-7 cm kalınlıktaki ağaç gövde ve dallarında galeriler açarlar. Genellikle bir sürgün dibinden 2 mm çapında yuvarlak delik açarak dala giren böcek, kambiyum dokusunun 2 mm kadar altında yıllık halkalarını takip eden galeri açar. Galeri yerinin kapatılması mümkün olmadığından buradan devamlı bitki öz suyu dışarı sızmakta ve ağaç zayıflayarak kurumaktadır (URL-5, 2005).

*Kızılağaç Böceği (Agelastica alni L.)*'nin erginleri yapraklarda 3-5 mm çapında delikler açar. Larvalar ise yaprağın ince damarlarına dokunmaksızın yaprağın alt yüzünde beslenerek yaprağı dantel şekline getirirler. Salgın yıllarında fındık ve kıızılağaç'ta şiddetli zarar yaparlar. 5-10 yılda bir salgın yapmaktadır. Genellikle Karadeniz sahil şeridinde yaygındır (URL-6, 2006).

*Fındık Uçkurutan (Obera linearis L.)* larvaları fındık sürgünlerinin içinde galeriler açarak kurumalara neden olurlar. Fındık dışında ceviz, gürgen, kıızılağaç ve karaağaçta da zararlı olurlar (Işık, 1992; Erdem, 1970; Kurt, 1982).

*Yaprak Delen (Anoplus roboris Suf.)*'ler özellikle tomurcuklarla beslenirler. Yumurta koyduğu damarlar kurur ve kırılır. Larvalar da galeri açarak büyük zarara sebep olurlar (Işık, 1992; Erdem, 1970; Kurt, 1982).

*Gal Sineği (Mikomyia coryli Kieffer.)*'nin larvaları zararı oluşturmaktadır. Bunlar yaprakta damarlar boyunca, çotanakta, yeşil zuruf üzerinde yada sürgünlerin uç kısımlarında galler oluşturarak zararlı olurlar. Fazla sayıda gal yaprağın kuruyup düşmesine neden olur. Meyvelerde döküm olmaz. Ancak, meyve gallerin baskısı altında gelişemez ve biçimsiz bir durum alarak zarara uğrar. Yine sürgün uç tomurcuklarında oluşan galler sürgün gelişimini engeller (URL-7, 2005).

*Fındık kokarcası (Palomena prasina L.)*'nin ergin ve nimfleri fındık meyvelerinde emgi yapmak suretiyle zararlı olurlar. Normal iriliğe ulaşınca kadar geçen sürede zarar

gören meyveler sarı karamuk, normal iriliğe ulaştıktan iç dolduruncaya kadar geçen dönemde zarar gören meyveler ise kara karamuk olurlar. Meyvelerin yeni iç doldurduğu dönemde emilmesi ile bulaşık ve yer yer çöküntülü olan şekilsiz içler oluşur. Ergin ve nimfler olgunlaşmakta olan meyveler üzerinde beslenerek dış satım yönünden önemli olan lekeli iç tipi zararı oluştururlar (URL-8, 2005).

*Kahverengi Koşniller (Parthenobcanium corni Bouche)* yaprak ve sürgünlerde öz suyu emerek zarar verir. Zarar sonucu bitki zayıflar, verim düşer ve bitkilerde kurumalar görülür (Işık, 1992; Erdem, 1970; Kurt, 1982).

*Virgül Kabuklu Biti (Lepidosaphes ulmi L.)*'nin ergin ve larvaları bitkinin öz suyunu emerek zayıflamasına, verimin azalmasına ve yoğun bulaşmalarda fındık dal ve ocaklarının kurumalarına neden oburlar (Işık, 1992; Erdem, 1970; Kurt, 1982).

*Yaprak Bit (Mizocallis coryli G.)*'leri tomurcuk ve yapraklarda emme yaparlar. Gelişen yaprakların emilen kısımları yırtılarak delikler oluşur (Işık, 1992; Erdem, 1970; Kurt, 1982).

*Fındık Filiz Güvesi (Gypsonoma dealbana Fröhl.)* larvalarının yaprak, pus ve gözlerdeki zararından başka özellikle yeni sürgünlerin özüne girerek yaptığı kurumalar bazı yıllarda çok önemli boyutlara ulaşmıştır (Işık, 1992; Erdem, 1970; Kurt, 1982).

*Kır tırtılı (Lymantria dispar L.)* larvaları bitki yapraklarını yemek suretiyle zarar yaparlar. Fındık meyveleri henüz yumuşak kabuklu iken bunları da kemirerek zararlı olabilirler. Fındık üretilen her yerde yaygındır. 5-6 yılda bir bazı lokal fındık bahçelerinde salgın yaparlar. Fındığa ilave olarak yüzlerce meyve ve geniş yapraklı orman ağaçları ile süs bitkilerinde zarar yaparlar (URL-9, 2005).

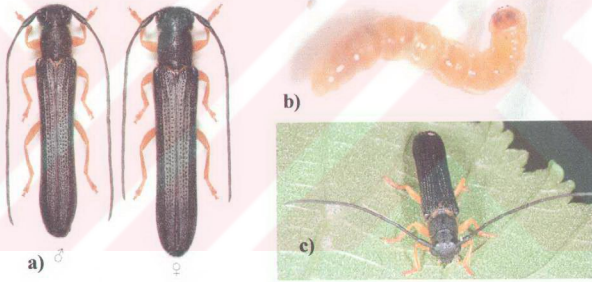
*Amerikan Beyaz Kelebeği (Hyphantria cunea Drury.)* larvaları yaprağı hafifçe kıvrarak ince ağ ipleriyle kapatırlar. Sonra diğer yaprakları ağlarla birleştirerek topluca beslenirler. Özellikle yaprağın alt ve üst epidermisini yerler ve yaprağın sadece damarları kalır. Ağaçlarda tüm yaprakları ve meyveleri yiyerek çok büyük ekonomik zarar oluştururlar (Işık, 1992; Erdem, 1970; Kurt, 1982).



### 1.3. *Oberea linearis* (L. 1761)

*Fındık Teke Böceği* ve *Uçkurutan* isimleri ile de anılan *Oberea linearis* (Coleoptera; Cerambycidae) erginleri 3-5 mm eninde 11-15 mm boyunda siyah renkli bir böcektir. Bacaklar sarı renklidir. Erkeklerde antenler kalın ve vücut boyundan uzundur, dişilerde ise anten vücut boyundan daha kısadır. Larva tüm instar aşamalarında mum sarısı renkte 20-25 mm uzunluktadır (Şekil 1). Yumurta 3x0.6 mm boyutlarındadır (URL-4, 2005).

Karadeniz bölgesinde erginler Mayıs ve Haziran aylarında çıkarlar. Çiftleşen dişiler yıllık sürgünlerin uçtan 10-15 cm aşağısına yumurtalarını koyar. Yumurtadan çıkan larvalar önce yarım daire şeklinde sürgün eksenine dik bir galeri açar. İlk yıl yukarıdan aşağıya 40-60 cm uzunluğunda bir galeri oluşturur. Bu galeri içinde kışlayan larva ertesi ilkbaharda yukarıya doğru kısa bir galeri açar. Sonbahar sonlarında bir yuva hazırlayarak ikinci kışı geçirir. Ertesi yıl Nisan ayında pupa oluşur. Erginler dalın kabuğunda yuvarlak bir delik açarak çıkarlar. Böylece gelişmesini 2 yılda tamamlamış olur (URL-4, 2005).

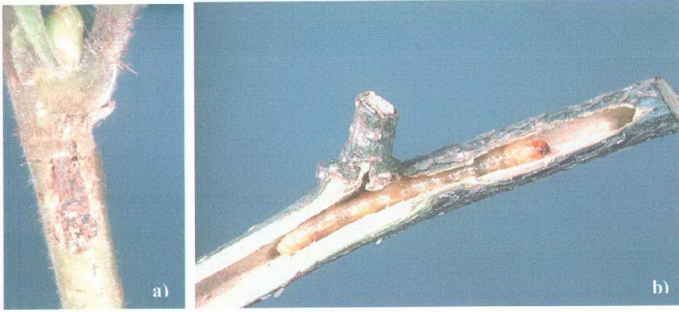


Şekil 1. *Oberea linearis*'in erginleri ve larvası. a; Erkek ve dişi erginler, b; larva, c: ergin bireyin yaprak üzerindeki görünümü.

#### 1.3.1. *Oberea linearis*'in Zarar Şekli

Bir-iki yıllık genç sürgünlerin özünde beslenen larvalar, fidelerde ve genç dallarda uzunluğuna galeriler açarak sürgünlerin kurumasına neden olurlar (Şekil 2). Karadeniz bölgesinde sahil kesimindeki fındık bahçelerinin büyük bir bölümünde yaygındır.





Şekil 2. *Oberea linearis*'in oluşturduğu zarar şekli. a; *Oberea linearis*'in yumurta bıraktığı fidenin görünümü, b; erişkin larvanın dal içindeki görünümü.

#### 1.4. *Oberea linearis* ile Mücadele Yöntemleri

Genç sürgünlerde kurumaların iyice belirdiği Temmuz ayının ortalarından yaprak dökümüne kadar olan süre içinde, kurumakta olan tüm uç sürgünler bir budama aletiyle kesilerek yakılır. Ocağın tüm sürgünleri kontrol edilir ve bir ocakta ortalama 5'ten fazla zararlı sürgün varsa orada ilaçlama yapılır. İlaçlama çıkan erginlerin yumurta bırakmasını önlemek amacıyla Mayıs ayı ortalarından itibaren yapılabilir. Ancak bölgelere göre değişim olabileceğinden ergin çıkışları izlenerek çıkış başlamasından sonra ilaçlamaya geçilmelidir.

Karadeniz bölgesinde *Oberea linearis*'e karşı kullanılan bazı kimyasal maddeler şunlardır; Carbaryl %5, Dioxacarb %50 ve Methiocarb %50 (URL-4, 2005).

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

Zararlılarla mücadele için uygulanan kimyasallar, hedef zararlı böceğin haricinde diğer canlıları da olumsuz yönde etkilemektedir. Kimyasalların yoğun bir şekilde kullanılması zaman içinde zararlı böceklerde insektisitlere karşı dayanıklılık

mekanizmasının gelişmesine neden olur. Gerçekleşen bu dayanıklılık mekanizması ilahtan kaçma gibi davranışsal dayanıklılıklar olabileceği gibi birbirine çok yakın akraba türler arasında dahi zararlıya direnç gösterebilecek ırkların oluşabilmesi şeklinde de gerçekleşebilir. Bazen de böceklerin vücut yapılarından kaynaklanan yapısal dayanıklılık söz konusudur. Örnek vermek gerekirse böyle bir durumda böcek, kalın kutikula tabakası sayesinde uygulanan insektisite karşı dirençlidir. Gerçekleşen dayanıklılık davranışları arasında en önemlisi fizyolojik dayanıklılıktır. Çünkü bu dayanıklılık kazanılmış ve kalımsal hale geldiği için böceklerin yeni nesillerine aktarılır. Bir diğerk dayanıklılık mekanizması ise bir böceğin bir insektisite karşı dayanıklılık kazandıktan sonra benzer insektisitlere karşıda kendini koruyabilmesidir. Buna da çapraz dayanıklılık adı verilir (Ecevit, 1988).

Uygulanan kimyasal insektisitlerin tüm canlıları olumsuz etkilemeleri ve zararlıların da kendilerini değişik dayanıklılık mekanizmaları geliştirerek korumalarına rağmen, zararlının predatörleri üzerinde meydana gelen olumsuz etkilere karşı, bu canlıların dayanıklılık mekanizmasının gelişmesi zararlılarda gerçekleştiği kadar hızlı olmamaktadır (Ecevit, 1988).

Kimyasal insektisitler yalnızca böcek türlerine değil doğada bulunan bitki örtüsüne de zarar verirler. Kimyasal insektisitlerin doğada toprak ve bitkilerde birikmelerinden dolayı yok olmaları çok uzun sürmektedir. Oluşan bu birikim toprakta ki normal mikrobiyal popülasyonu bozarak veriminin düşmesine neden olduğu gibi bitkiler aracılığı ile besin zincirine dahil olarak besin zincirinin en üst seviyesindeki canlılara kadar ulaşır. Belli bir alana uygulansalar dahi kolayca yok olmadıklarından dolayı rüzgar ve yağmur gibi doğal olaylarla çok daha geniş alanlara yayılabilmeleri insektisitlerin zararını daha da artırmaktadır (Ünal, 1998).

Son 25 yılı aşkın bir süredir, zararlı böceklerin kontrolünde bahsedilen bu zararları nedeniyle kimyasal insektisit kullanmanın yerine alternatif araçlar aranmaya başlanmıştır (Bernard ve Jack, 2003).

### **1.5. Biyolojik Mücadele**

Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararı en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Doğal düşman terimi, predatör ve parazitlerle birlikte hastalık oluşturan mikroorganizmaları kapsamaktadır

(Peter, 1984). Ancak, böceklerde hastalık oluşturan mikroorganizmaların kullanımı, genellikle mikrobiyal kontrol olarak adlandırılır.

Biyolojik mücadele, kimyasal mücadelenin tüm olumsuz yönlerini ortadan kaldırması bakımından son yıllarda tercih edilmesi gereken bir mücadele yöntemi haline almıştır (Yılmaz, 2004).

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

Böceklerin kontrolü için mikrobiyal ajanların kullanımı 1800'lü yıllarda fungusların kullanılmasıyla başlamıştır (Oğurlu, 2000). Bu ajanların böceklerin kontrolünde kullanımı, çok eskiye dayanmasına ve genelde olumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen, mikrobiyal kontrolün önemi 1900'lü yılların ortalarına kadar anlaşılammış ve fazla gelişmemiştir. Bu tarihten sonra sıklıkla kullanılan kimyasal insektisitlerin zararlı etkilerinin ortaya çıkmasıyla, araştırmalar, böcekler üzerinde patojenik etkiye sahip mikroorganizmaların tespiti ve zararlılara karşı kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır. Günümüzde, EDWIP (The Ecological Database of the World's Insect Pathogens) ve VIDIL (Viral Diseases of Insect in the Literature Database) verilerine göre 2285 farklı mikroorganizma türünün, 9407 böcek türüyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Toplam 2285 mikroorganizmanın 1504 türünü protozoalar, 411 türünü funguslar, 168 türünü virüsler, 146 türünü nematodlar, 51 türünü bakteriler ve 5 türünü diğer mikroorganizmalar oluşturmaktadır (Braxton vd., 2003). Bu veriler toplam sayının sadece bir kısmını oluşturmakta ve bu sayı her geçen yıl yüzlerce yeni patojen mikroorganizmanın keşfiyle artmaktadır.

Biyolojik mücadele, diğer mücadele yöntemlerine göre doğal dengenin kurulmasına yardımcı olması, uzun vadede kalıcı sonuçlar vermesi ve nihai hedefe

ulaştırabilmesi bakımından en çok tercih edilmesi gereken mücadele yöntemidir (Oğurlu, 2000).

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

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

1770'li yıllarda İngiltere'de tarım arazileri ve seralardaki çeşitli bitkiler üzerinde zarar yapan afitlerle mücadelede gelin böceklerinden faydalanılmıştır. 1840 yılında Fransa'da kavak ağaçlarında zarar yapan *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) tırtıllarıyla mücadele için koşucu böceklerden faydalandığı bilinmektedir. 1844 yılında ise bir kurbağa türü olan *Bufo marinus* (L.) (Anura: Bufonidae) zararlı böceklere karşı kullanılmak üzere Jamaika'dan Barbados'a nakledilmiştir.

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

### **1.5.1. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar**

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

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

#### **1.5.1.1. Predatörler**

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

#### **1.5.1.2. Parazitler**

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

Böcek parazitizmi oldukça sık rastlanılan bir durumdur ve birçok böcek kendisiyle bağlantılı bir veya çoğunlukla birkaç parazit türe sahiptir. Bütün parazit böcekler bağlandıkları konağın hayat döngüsü içindeki belli bir safhaya özelleşmiş durumdadır. Bu yüzden bazıları pupa ve yumurta safhası ile sınırlanmışken, bazıları da larval parazitlerdir.



### 1.5.1.3. Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar tarafından üretilen insektisitler hedef böcek türü için oldukça spesifik olmaları, bakteriler sayesinde ayrıştırılabilir olmaları ve zararlı böceklerde bu bileşiklere karşı direnç gelişiminin yavaş olması bakımından oldukça avantajlıdırlar. Fakat düşük tesirli olmaları ve yüksek üretim maliyetleri açısından bakıldığında farklı uygulamalar için olan kullanımları kısıtlanmış olur. Ancak rekombinant DNA teknolojisi bunun gibi birçok negatif özelliğin üstesinden gelebilmek için çeşitli olanaklar sağlar. Özellikle *Bacillus thuringiensis*'lerin insektisidal aktiviteleri ve Böcek Bacülovirüs sistemleri, etkili, güvenli ve spesifik olarak geliştirilmiş biyolojik mücadelede araçlarıdır.

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

Entomopatojenlerin yakın gelecekte, mikrobiyal kontrol ajanı olarak, sadece fiyat ve etkinlik bakımından değerlendirildiğinde bile kimyasal pestisitlere göre daha kullanışlı hale geleceği düşünülmektedir. Buna ek olarak, bu entomopatojenlerin mikrobiyal kontrol ajanı olarak kullanımı, ekosistemdeki biyolojik çeşitliliğin sürdürülmesi, zararlı türlerin doğal düşmanlarının korunması, besinler üzerinde kalıntı bırakmaması, hedeflenmemiş diğer organizmalar ve insanlar açısından güvenli olması gibi birçok avantajlara sahiptir (Lacey vd., 2001).

Mikroorganizmaların zararlı böceklerle mücadele amacıyla kullanılması oldukça eski tarihlere dayanır. İlk çalışmalar 1726 yılında Fransa'da Noctuidae larvalarından *Cordyceps* cinsi fungusların izole edilmesiyle başlamıştır (Oğurlu, 2000). 1879 yılında Rusya'da yeşil buğday böceği, *Anisoplia austriaca* Herbst. (Coleoptera: Scarabaeidae)'ya karşı *Metarhizium anisopliae* (Metch.) fungusunun denemeleri yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Steinhaus, 1949).

Ancak bu tarihten sonra 20. yüzyılın başlarına kadar mikroorganizmaların zararlı böceklerle mücadelede kullanılması üzerine çok az çalışma yapılmıştır. Bu konudaki çalışmalar 1920 yılından itibaren artmaya başlamış, 1950'den sonra da yoğunlaşmıştır (Oğurlu, 2000).

Zararlı böceklerin diğer doğal düşmanları gibi, entomopatojenler de tek bir tür veya gruba spesifiktir ve bazıları zararlı böceklerin uzun zaman periyotları boyunca kontrolünü sağlayabilirler (Lacey vd., 2001). Entomopatojenlerin zararlı böceklerin kontrolleri için kullanım stratejileri temelde diğer biyolojik kontrol ajanlarının kullanımlarıyla aynıdır (Hamm, 1984; Harger, 1987). In vitro şartlarda üretilip uygulanabildiği gibi, uygun şartlarda saklanıp doğal ortamda tekrar aktif hale geçebilirler.

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

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

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

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

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

- Virülanslarının ve öldürme hızlarının artırılması,
- Değişen çevre koşullarına karşı (soğuk havalarda, kuraklık şartları gibi) dayanıklılıklarının artırılması,

- Ürettikleri toksinlerin etkinliklerinin artırılması,
- Uygulanan diğer mücadele yöntemleriyle uyumlarının daha iyi araştırılması,
- Diğer çevresel avantajlarının belirlenmesi gerekmektedir (Lacey vd., 2001).

#### 1.5.1.3.1. Bakteriler

Entomopatojenik bakteriler, böceklerde kitle halinde ölümlere neden olurlar (Çanakçıoğlu, 1989). Böceklerde patojen olan bakterileri spor oluşturanlar ve spor oluşturmayanlar olmak üzere iki kısma ayırmak mümkündür. Spor oluşturmayan böcek patojeni bakteriler, Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae ve Micrococcaceae familyalarına dahildir. Özellikle son 50 yılda yapılan çalışmalarda, bu familyalara ait birçok bakteri türü böceklerden izole edilmiş ve bazılarının izole edildikleri böcekler üzerinde hastalık etmeni olduğu belirlenmiştir. Bu bakterilerden en önemlisi ise *Bacillus thuringiensis*'tir. Cry adı verilen proteinler sayesinde birçok zararlı böceğe karşı etkin bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bu proteinlere ise genel anlamda mikrobiyal insektisit denmektedir. (Sezen ve Demirbağ, 1999; Yaman ve Demirbağ 2000a, 2000b; Kuzina vd., 2002; Osborn vd., 2002; Demir vd., 2002).

Mikrobiyal insektisit, bir organizmanın ürettiği, belirli bir böcek türünü öldüren bir toksin olabileceği gibi, belirli bir böceği ölümcül olarak enfekte etme kabiliyetine sahip olan bir organizma da olabilir. En çok çalışılan, en etkili ve en sık yararlanılan mikrobiyal insektisitler *Bacillus thuringiensis* türleri tarafından üretilen kristal (Cry) proteinleridir (Ananda, 1996). Bu bakteri, her biri belli bir böceği öldürebilen farklı bir toksini üreten birçok suş ve alttürü bulunmaktadır (Tablo 2). Örneğin *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, Lepidoptera grubu larvaları (güve, kelebek, lahana kurtları, ladin tomurcuk kurtları) için öldürücü etkiye sahiptir (Held, 1982). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* ise diptera'lar yani sivrisinek ve karasinekler üzerinde etkilidir (Liu, 1993). *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (subsp. *san diego*) ise patates böceği ve pamuk kurdu gibi Coleopteralara (kın kanatlılara) karşı etkilidir (Ananda, 1996).



Tablo 2. Çeşitli *B. thuringiensis* toksinleri ve etkili oldukları zararlılar (Gelernter, W., ve Schwab, 1993).

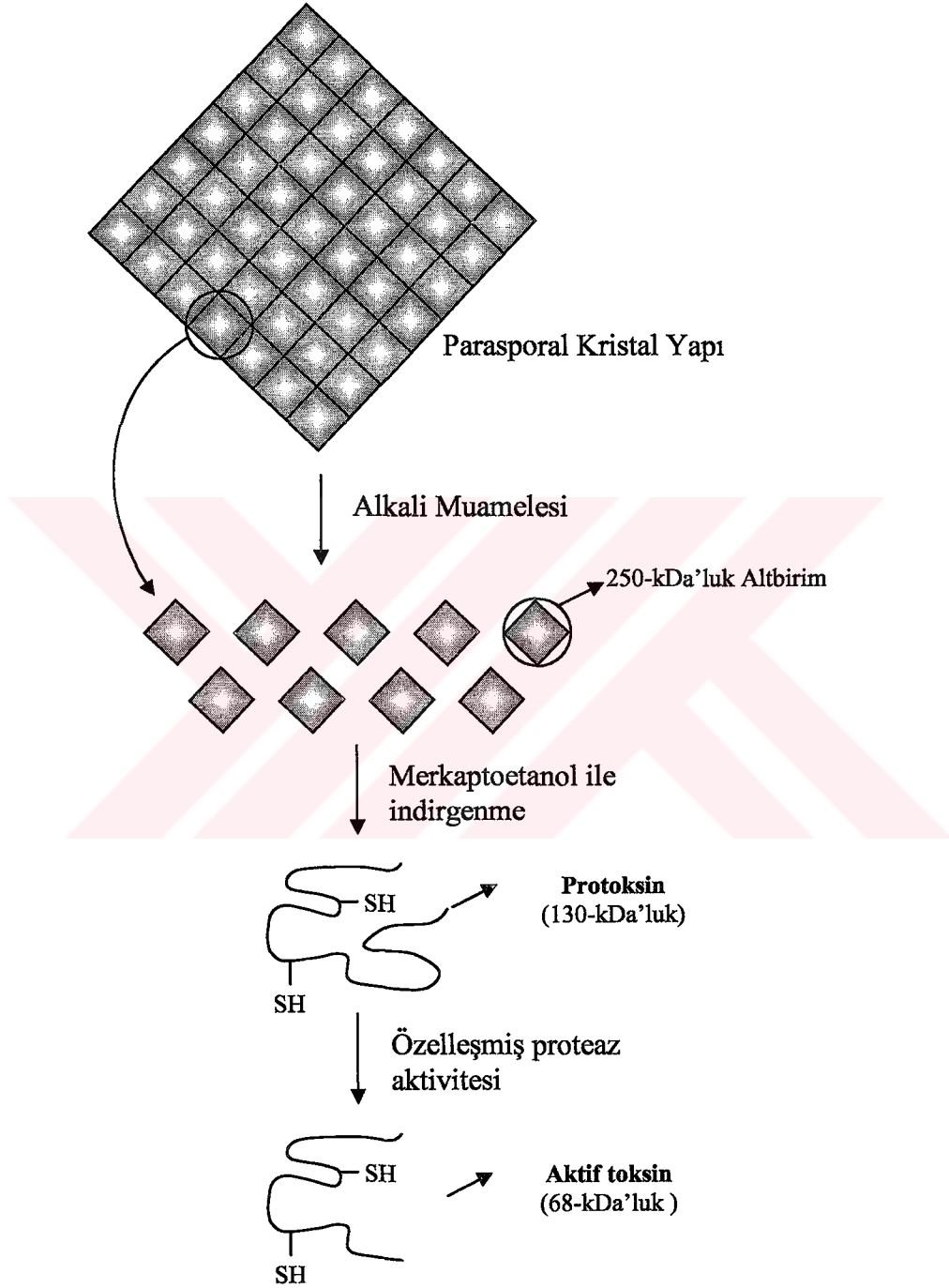
<i>B. thuringiensis</i> strain or subspecies	Protoksin Büyüklüğü (kDa)	Hedef Böcekler
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>berliner</i>	130-140	Lepidoptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> KTO,HD-1	130-140	Lepidoptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>entomocidus</i> 6.01	130-140	Lepidoptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> 7,29	130-140	Lepidoptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> IC 1	135	Lepidoptera, Diptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1	71	Lepidoptera, Diptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> (san diego)	66-73	Coleoptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> PG14	125-145	Diptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	68	Diptera

*Bacillus thuringiensis*'in insektisidal aktivitesini oluşturan parasporal kristal bakteriyal sporlanma esnasında sentezlenir. Bakteri bu kristal proteini sayesinde spor oluşmasını sağlar. Parasporal kristalin kuru ağırlığı, spor oluşturmuş olan kültürün yaklaşık %20-30'udur. Bu kısmın %95'i protein geri kalan %5 lik kısmı ise karbonhidrat'tır. Bu kristal, bir protein kümesidir ve genellikle hafif alkali muamelesi ile kendini oluşturan alt ünitelere ayrılabilir. Bu alt birimler ise disülfid bağlarını indirgeyen  $\beta$ -merkaptöetanol muamelesi ile in vitro şartlarda daha da küçük alt birimlerine kadar ayrıştırılabilirler. Yaklaşık olarak 150 farklı parasporal Cry proteini bilinmektedir (Schnepf, 1998).

Kristal proteinin insektisidal aktivitesine göre *Bt.* (*Bacillus thuringiensis*) suşlarından elde edilen insektisidal proteinler başlangıçta 4 büyük sınıfa ayrılmışlardır. Cry I, Cry II, Cry III ve Cry IV. Cry I proteinleri lepidopterlere karşı, Cry II proteinleri lepidopter ve dipteraların her ikisine karşı, Cry III koleopterlere karşı toksik iken, Cry IV ise dipteralara karşı toksiktir. Bu proteinler A, B, C gibi daha da küçük alt sınıflara ayrılmıştır. Bu alt sınıflar ise toksin genlerinin DNA sekans analizine göre oluşturulmuştur (Crickmore, 1998).

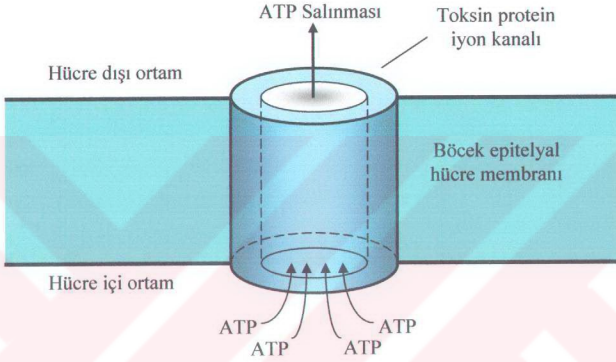
Parasporal kristal genellikle insektisidin toksik etki göstermesini sağlayan aktif formunu içermez. Kristal protein kendi altbirimlerine ayrıldığında, aktif toksinin öncü formu olan bir protoksin salınır. Lepidopterlere karşı kullanılan birçok Cry toksininin protoksini yaklaşık 130 kDa'luk bir moleküler bileşiktir. Parasporal kristal böcek tarafından beslenme yolu ile alındığında, alkali pH ve özelleşmiş ayrıştırıcı proteazların birlikte etkisi sonucunda alt birimlerine ayrılır. (Şekil 3). Daha sonra bu altbirimler

indirgenerek protoksinler oluşur. Protoksin özelleşmiş proteazlar aracılığı ile moleküler ağırlığı yaklaşık 68 kDa olan aktif toksin haline gelir (Bernard ve Jack, 2003 ).



Şekil 3. *Bt.* parasporal kristallerinin aktif toksine dönüşmesi

Toksin protein bu aktif formda iken kendini böcek bağırsağının epitelyum hücrelerinin membranına sokar ve bir iyon kanalı oluşturur (Şekil 4). Bu iyon kanalı aşırı miktarda hücresel ATP'nin dışarı akmasına sebep olur. İyon kanalı oluştuktan yaklaşık 15 dakika sonra hücresel metabolizma durur, böcek yemeyi bırakır ve su kaybına uğrayarak ölür. Protoksinin aktif toksin formuna dönüşmesi için alkali pH ve spesifik protezların etkilerinin aynı anda gerekmesi, insan ve çiftlik hayvanları gibi zararlıların haricindeki organizmaların etkilenmelerini engellemiş olur (Bernard ve Jack, 2003 ).



Şekil 4. *Bt.* toksininin böcek bağırsak epitelyum hücresi membranına insersiyonu

*Bt.* parasporal kristallerinin zararlı bir böceği öldürmesi için zararlının sindirim sistemine ulaşmaları gerekmektedir. Bakterinin ya da insektisidal toksinin böceğin yüzeyi ile temas etmesinin zararlı böcek üzerinde herhangi bir etkisi yoktur. *Bt.* toksinleri genellikle sprey yöntemi ile uygulanır ve bu nedenle toksini yiyecek olan zararlı böceğin insektisiti alma ihtimalini artırmak için böcek çekici maddeler (feromon vb.)'le birlikte karışım halinde kullanılabilirler (Ferre, 1991). Fakat bazı böcekler konak bitkilerinde delik açarak veya bitkinin köklerine saldırarak zarar verdiği için konakçı bitki üzerine sıkılan *Bt.* toksinlerinin yenme ihtimali azalır. Bu nedenle böylesi zararlıların kontrolü için başka yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaçla *Bt.* toksin genini taşıyan ve ekspres eden transgenik bir bitki oluşturma çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Lampel, 1994).

### 1.5.1.3.2. Virüsler

Birçok virüsün böceklerin hastalanmasına neden olarak böcek salgınlarını kontrol ettikleri bilinmektedir (Steinhaus, 1956). Çiğneyici ağız yapısına sahip böcekler, özellikle yaprak yiyenler, virüs enfeksiyonlarına karşı daha hassastır. Bu durumda yaprak yiyen Lepidoptera tırtıllarıyla, Hymenoptera'nın yalancı tırtılları, viral ajanlardan daha fazla zarar görürler (Weiser, 1969). Bu virüsler genellikle 2-3 yılda bir meydana çıkan salgınlarda çoğalarak birçok larvayı öldürürler ve böylece böcek afetlerini ortadan kaldırırlar (Lipa, 1975). Virüsler birçok böcek takımıyla ilişkilidir. Bununla birlikte büyük bir kısmı Lepidoptera (%83), Hymenoptera (%10) ve Diptera (%4) takımlarında bulunmaktadır.

Şimdiye kadar sınıflandırılan böcek virüslerinin büyük bir kısmı Baculoviridae, Reoviridae, Poxviridae, Picornaviridae, Densoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae ve Iridoviridae familyalarına aittir. Bu böcek virüslerinden, Baculoviridae familyası sadece artropodlar için özeldir (Demirbağ ve Beldüz, 1997). Çoğu baculovirüsler sadece bir veya yakından ilişkili birkaç böcek türünü enfekte edebilir (Arif ve Kurstak, 1991). İnsanlar ve diğer hedeflenmemiş organizmalar için güvenli bir mikrobiyal ajan olması, bu virüslerin biyolojik mücadelede kullanılma potansiyelini arttırmaktadır (Granados ve Federici, 1986; Gröner, 1986).

### 1.5.1.3.3. Mantarlar

Kolay olarak tanınmaları ve doğal olarak yayılmaları nedeniyle en yaygın böcek patojenleri olarak kabul edilirler (Poinar, 1978). 700'ü aşkın fungus türünün böcekleri enfekte ettiği rapor edilmesine karşın, bunlardan ancak 10 tanesi zararlı böceklerin kontrolü için kullanılmak amacıyla geliştirilme aşamasındadır (Hajek ve Leper, 1994). Böcek patojeni olan funguslar genellikle Deuteromycota ve Entomophthorales gruplarına dahildir (Hajek, 1997). Entomopatojenik funguslar çok geniş bir konak spektrumuna sahiptirler. Bir çok böcek ordosuna ait türleri enfekte edebilirler. Bir entomopatojenik fungus birden fazla böcek türünü enfekte edebilir.

Entomopatojenik funguslar, değişik habitatlarda yaşayan birçok böcek türünü enfekte edebildikleri için farklı çevresel faktörlere uyum sağlamışlardır. Bu nedendir ki; entomopatojenik fungusların biyolojileri büyük çeşitlilik göstermektedir. Bazı gruplar

zorunlu hücre içi paraziti iken, bazıları ortamda canlı konağın olmadığı durumlarda çürükçül olarak hayatta kalabilen fırsatçı patojenlerdir (Hajek, 1997).

#### 1.5.1.3.4. Nematodlar

Böceklerde parazit olarak yaşayan ve bazı durumlarda ölümlerine yol açan birçok nematod türü bulunmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda 30'u aşkın nematod familyasına ait türlerin, böcekler ve diğer omurgasız hayvanlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Poinar, 1979, 1990; Kaya ve Stock, 1997). Son yıllarda yapılan çalışmalar, zararlı böceklerin biyolojik kontrolünde kullanılma potansiyeli taşımaları bakımından 7 familya üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlar Mermithidae, Tetrakonematidae, Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae, Sphaerulariidae, Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarıdır (Kaya ve Stock, 1997). Nematodların biyolojik mücadelede kullanılma potansiyelleri sadece böceklerle sınırlı değildir. Rhabditidae familyasına ait *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Schneider) türü, birçok tarımsal ürünün fidelerinde zarar yapan sümüklü böcek (*Deraceras* sp.) türlerinin kontrolünü sağlar (Wilson vd., 1993, 1995; Wilson ve Gaugler, 2000).

#### 1.5.1.3.5. Protozoalar

Protozoa enfeksiyonları böcek popülasyonlarını dengede tutması bakımından büyük bir öneme sahiptirler (Maddox, 1987; Brooks, 1988). Entomopatojenik protozoalar genellikle konağa özeldirler. Böceklerde oluşturdukları hastalıklar yavaş ilerler. Virülansları düşüktür ve çoğu kez böceklerde kronik enfeksiyonlar oluştururlar. Virülanslarının düşük olması nedeniyle protozoaların enfekte ettiği böceklerin ölümü bazen haftalar sürebilir (Hoffman ve Frodsham, 1993). Çoğu entomopatojenik protozoanın hayat döngüsü komplekstir. Sadece canlı konak içersinde gelişebilirler ve çoğu türün gelişimini tamamlayabilmesi için bir ara konağa ihtiyacı vardır.

Protozoalar çoğu kez beslenme yoluyla konak böceğe girerler. Bunun dışında predatör veya parazitlerle de taşınabilirler. Besinlerle böcek vücuduna giren protozoalar böcek bağırsak epiteline tutunarak enfeksiyonu başlatırlar. Hemosele geçip, çoğalarak

çeşitli doku ve organları enfekte edebilirler. Oluşturdukları sporlarla böcek popülasyonlarında yayılabildikleri gibi, dölden döle yumurta yoluyla da geçebilirler.

Protozoalar tarafından enfekte edilen böceklerin hareketleri yavaşlar ve tembelleşirler. Bu nedenle gelişimleri de yavaşlar. Beslenme ve üreme faaliyetlerinde azalma görülür. Ölümün gerçekleşebilmesi için enfeksiyon seviyesinin çok yüksek olması gerekir. Gücsüz düşen böceklerin değişen ortam koşullarına karşı olan dirençliliği azalır ve diğer organizmaların saldırılarına açık hale gelirler (Hoffman ve Frodsham, 1993).

Şimdiye kadar belirlenen yaklaşık 15000 protozoa türünün, 1200'e yakın kısmının arthropodlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Protozoa sınıfı içerisinde yer alan Ciliphora, Sarcocystis, Apicomplexa ve Microspora gruplarına ait türler böcekleri enfekte edebilirler (Maddox, 1987).

Arazi uygulamalarında bazı problemlerle karşılaşılması, in vivo üretimlerinin gerekmesi, enfeksiyonlarının yavaş ilerlemesi ve vasatın altında ölüm oranı gözlenmesi mikrobiyal mücadelede kullanılmaları açısından dezavantajlar oluşturmaktadır (Lacey vd., 2001).

## **1.6. Zararlı Böceklerdeki Patojen Mikroorganizmaların Belirlenmesi**

### **1.6.1. Makroskobik İnceleme**

Mikroorganizmalar tarafından enfekte edilen böceklerde, patojenin özelliğine bağlı olarak bazı karakteristik hastalık belirtileri görülür. Bu belirtileri çoğu kez makroskobik olarak gözlemlenmek mümkündür. Bu belirtiler; renk değişimleri, fiziksel değişiklikler ve davranış anormallikleri olarak görülebilmektedirler.

Renk değişimleri, enfeksiyonlu böceklerin belirlenmesiyle ilgili olarak en kolay gözlemlenebilecek hastalık belirtileridir. Canlı ve ölü böceklerde gözlemlenebilirler. Canlı böceklerde, entomopatojenlerin neden olduğu renk değişimi, bu böceklerin integümentlerinin şeffafdan yarı şeffafa dönüşmesiyle ilgilidir (beyaz sinekler, hymenopter larvaları ve birçok sucül böcekte olduğu gibi). Örneğin; Iridescent virüslerle enfekte olan çoğu Lepidoptera larvalarının renkleri beyazdan, mavimsi iridescent renge dönüşür. Ölü böceklerdeki renk değişimleri ise beyazdan, griye, maviye, sarıya, yeşile, kahverengine ve siyaha dönüşme gibi büyük bir çeşitlilik gösterebilir. Bazı nematod ve fungus türlerinin



enfeksiyonları sonucu, konak böceğin bağışıklık sisteminin bir cevabı olarak kutikula üzerinde melaninleşmiş bölgeler (siyah lekeler) görülebilir (Lacey ve Brooks, 1997).

Entomopatojenlerin etkisiyle enfekte olmuş böceklerde bazı fiziksel değişimler görülebilir. Örneğin; bazı fungus türleri böcek vücudunun yüzeyinde aşırı ve renkli bir gelişim gösterebilirler. Enfeksiyon sonucu ölmüş böceklerin kavruları çoğu kez mumyalaşır, yumuşar, sıvı hale geçer, katılaştır veya kurur. Virüs enfeksiyonları sonucu birçok anatomik bozukluk ortaya çıkabilir (Lacey ve Brooks, 1997).

Ayrıca entomopatojenlerle enfekte olan böceklerde bazı davranış bozuklukları gözlemlenebilir. Bu bozukluklar arasında çok obur olan böceklerin beslenmeyi bırakması, agresiflik, alışılmadık yayılış ve çiftleşme davranışları sayılabilir. Örneğin; virüsler tarafından enfekte edilen bazı böcekler konak bitkinin en yüksek noktasına tırmanır ve bacaklarından asılarak ölürler (Lacey ve Brooks, 1997).

Arazi çalışmalarında canlı, hastalıklı veya ölü böcekler toplanırken bu semptomlar gözönünde bulundurulmalı ve not edilmelidir. Çoğu durumda bu makroskopik incelemeler hastalığın doğru teşhisini yapmak için gerekli bilgiyi vermektedir (Lipa, 1975).

### 1.6.2. Mikroskopik İnceleme

Makroskopik incelemenin sonuçlandırılmasından sonra mikroskopik incelemeye başlanır. Böceklerde bulunan patojenlerin belirtileri ve mikroskopik incelemeleri patojenin grubuna göre farklılık gösterir.

*Bakteriler:* Bakterilerin karakteristik özelliklerini sıralamak zordur. Çünkü bir çok bakteri türü sağlıklı böceklerin vücudunda enfeksiyon oluşturmaksızın yaşayabilir. Bakteriler böceklerin hemolenfinde bulunurlar. Böceğin kutikulasında herhangi bir hasar meydana getirmezler. Bu nedenle diğer entomopatojenlerin meydana getirdikleri makroskopik değişimlere bakterilerde pek sık rastlanmaz. Spor oluşturan bakterilerin enfeksiyonları daima böcek için öldürücüdür. Spor oluşturan çubuk şekilli bakteriler ışık mikroskobu altında gözlemlenebilir. Bir bakterinin neden olduğu bir hastalıktan şüphelenildiğinde, böcek hemolenfinden numuneler hazırlanarak genel besiyerleri üzerine ekim yapılmalıdır.

*Virüsler:* Virüslerin neden olduğu enfeksiyonlarda, bozulma ve hücre dağılması hipodermiste kolaylıkla görülebilir. Yağ dokularında kristale benzer inklüzyon yapıların varlığı viral bir hastalığın olduğunu gösterir.

Çeşitli viral hastalık tipleri, farklı inklüzyon yapıların varlığı ile karakterize edilir. Nükleer Polyhedrovirüsler (NPV), Granülozis virüsler (GV), Entomopoxvirüsler (EPV) ve Sitoplazmik Polyhedrovirüsler (CPV) bir protein matrix içerisine gömülüdürler. Bu gömülü virüslerin büyüklükleri 0.5 ile 15 µm arasındadır ve ışık mikroskobu altında görülebilirler. Bir protein matriks içerisine gömülü olmayan virüslerin virionlarının büyüklükleri 0.01 ile 0.3 µm arasındadır. Bu virionlar ışık mikroskobu altında görülmezler. Gömülü virüsler ışık mikroskobu altında incelenirken, böcek dokularında bulunan ve organik olmayan kristallerin varlığı unutulmamalıdır. Bu kristaller şekil ve hacim olarak gömülü virüslere benzerler ve yanlış teşhislere yol açabilirler. Bu durumda en iyi metod hücre sitoplâzmasını ve çekirdeğini incelemektir. Enfekte edilmiş hücre çekirdekleri önemli bir şekilde genişler. Viral hastalıkların en sık gözleendiği yağ dokusundaki hücre bölünmesinde artış meydana gelir (Lipa, 1975).

Viral bir hastalıktan şüphelenildiğinde uygulanılması gereken diğer bir yöntemde boyamadır. Giemsa boyama yöntemi, kolay uygulanabilirliği bakımından tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntem Baculovirüs enfeksiyonları için negatif bir yöntemdir. Yani ışık mikroskobu altında Baculovirüslerin polihedraları giemsa ile boyanmazken, Entomopoxvirüsler açık mavi renge boyanır (Lacey ve Brooks, 1997).

*Mantarlar:* Böcekleri tüm gelişim evrelerinde enfekte edebilirler. Oluşturdukları hiflerle konak böceğin kutikulasını sararlar. Nemli ortam şartlarında spor oluşumu da böcek dış yüzeyinde gözlenebilir. Bu sporlar çeşitli renklerde olabilir. Bu nedenle mantar enfeksiyonları çoğu kez makroskobik incelemelerle tespit edilebilir. Böcek dış yüzeyinde çimlenen sporlar, enzimler veya mekanik baskılarla vücut içersine girebilirler. Böcek hemoselinde kolayca çoğalabilirler. Bu nedenle kısa ve uzun hifler halinde hemoselde gözlenebilirler. Maya benzeri hücreler (blastospor) halinde tüm böcek vücuduna yayılabilirler (Humber, 1997).

*Nematodlar:* Nematodlar bazen böcek kutikulasında gözlenebilir. Fakat nematodların belirlenmesi için çoğu kez böceğin diseksiyonu gerekir. Eğer böcek ölü ise, gliserin yada laktofenol içersinde diseksiyon yapmak daha uygundur. Malpigi tüpleri, hemosel, bağırsak gibi kısımlar incelenerek nematod varlığı tespit edilir. Böceklerde bulunan nematodların boyutları 1 mm ile birkaç santimetre arasında değişir. Cins ve tür düzeyinde tanımlama için ergin nematodların belirlenmesi, ölçümlerinin yapılması ve çeşitli kısımlarının fotoğraflanması gerekir (Kaya ve Stock, 1997).



*Protozoalar:* Protozoa enfeksiyonlarının belirlenmesi için böceğin diseksiyonu gerekir. Yağ dokusu, malpigi tüpleri, orta bağırsak epiteli, hemolenf ve gonadlar faz kontrast mikroskobu altında incelenmeli ve vejetatif formlar ve sporlar araştırılmalıdır. Olgun sporlar hemolenfte çok kolayca görülebilir. Bazı durumlarda protozoa sporlarını, fungus sporlarından ayırmak için Giemsa boyaması gerekebilir. Çoğu entomopatojenik protozoa türünün detaylı bir şekilde araştırılması için enfekte edilmiş böcek dokularının transmisyon elektron mikroskobu (TEM) altında incelenmesi gerekir (Undeen ve Vavra, 1997).

## **1.7. Bakterilerin Tür Tayininde Kullanılan Kriter ve Yöntemler**

### **1.7.1. Nümerik Taksonomi**

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

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

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

Bazı bakteriler, ortam şartları yaşam için uygun olmayan hale geldiğinde, endospor olarak adlandırılan yeni bir hücre içi yapı meydana getirirler. Bir bakterinin endospor oluşturup oluşturmadığının bilinmesi ve varsa endosporun pozisyonu taksonomik açıdan önemlidir. Bu özelliklerin belirlenmesi amacıyla endospor boyama yapılır.

Bazı bakteriler hücrelerin dış yüzeyinde ekstraselüler polisakkaritlerden oluşan ve kapsül adı verilen bir yapıya sahiptir. Bu yapının varlığı veya yokluğu sistematikte

kullanılan karakterlerden biridir. Bunu belirlemek için kapsül boyama yapılır (Cappuccino ve Sherman, 1992).

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

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

Sıcaklık, hücresel enzimler üzerinde etkili olarak, kimyasal reaksiyonların hızını etkilemektedir. Genellikle, bütün hücre tiplerinde enzimatik aktivitelerin meydana geldiği optimum sıcaklık 20-40°C civarındadır. Fakat bazı bakteriler (örneğin, termofilik bakteriler) ısıya dayanıklı enzimler üretirler. Dolayısıyla çok daha yüksek sıcaklıklarda hücresel aktivitelerini devam ettirebilirler. Yine bazı bakterilerin düşük sıcaklıklarda (örneğin 4°C'de) büyüebildikleri bilinmektedir (Palleroni, 1986). Bu nedenle sıcaklık toleransı bakteri sistematğinde kullanılan bir kriterdir.

Hücresel enzim aktivitelerini etkileyen bir diğer fiziksel etki de pH'dır. Hücrelerin genellikle yaşayabildiği optimum pH, nötral pH olan 7'dir. pH'da meydana gelen artış ve düşüşlerin her ikisi de, hücrelerdeki kimyasal reaksiyon hızlarının düşmesine yol açar. Bunun nedeni hücresel enzimlerin bozulmasıdır (Palleroni, 1986). Fakat bazı bakteri türleri pH değişimlerine karşı toleranslıdır. Yüksek ve düşük pH derecelerinde yaşayabilirler. Bu özellik sistematik açıdan önemlidir.

Çoğu bakterinin hayatlarını devam ettirmeleri için gerekli olan gaz atmosferik oksijendir. Mikroorganizmalar atmosferik oksijen ihtiyaçlarına göre aeroblar, mikroaerofiller, tamamen aeroblar, aerotolerant anaeroblar ve fakültatif anaeroblar olarak gruplandırılmaktadır (Cappuccino ve Sherman, 1992).

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

a) Ekstraselüler enzimler: Büyük molekül ağırlığına sahip olan maddeler hücre zarından geçemezler. Bu nedenle bu maddeler (polisakkaritler, lipidler, proteinler) daha düşük molekül ağırlığına sahip olan maddelere dönüştürülmelidir. Ancak bu durumda hücre zarından geçebilirler. Hücre dışındaki substratlara etki eden enzimler genel olarak,

ekstraselüler enzimler olarak adlandırılır. Hücre dışında görev yapan bu enzimler nişasta, lipid, jelatin gibi maddelerin hidrolizinden sorumludur. Bu enzimlerin varlığı veya yokluğu, mikroorganizmalar arasındaki genetiksel benzerlikleri veya farklılıkları göstermesi açısından sistematik olarak önemlidir.

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

Jelatin, zorunlu aminoasitlerden biri olan triptofanı içermeyen ve bu özelliği nedeniyle eksik protein olarak adlandırılan bir makromoleküldür. Eksik bir protein olması dolayısıyla, hücre için besleyici değeri tartışılır olmasına rağmen, bakteri türlerinin karakterizasyonunda önemlidir (Cappuccino ve Sherman, 1992). Bakteriler bu proteini, jelatinaz enzimi yardımıyla aminoasitlerine kadar parçalar. Jelatinaz enziminin varlığı, jelatin hidroliz testi ile ortaya çıkarılmaktadır.

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

Çoğu mikroorganizmalar, kendileri için gerekli olan enerjiyi, karbonhidratlar gibi subsratların biyooksidasyonunu gerçekleştiren enzimler yardımıyla elde ederler. Bazı mikroorganizmalar, glukoz gibi şekerleri anaerobik olarak fermente ederken, diğerleri ise aerobik veya fakültatif anaerobik olarak fermente etmektedirler. Bazı mikroorganizmalar da, glukozu fermente edebilecekleri enzim sistemlerinden yoksun olabilirler. Mikroorganizmalar karbonhidratların fermentasyonu sonucunda, organik asitlerin yanı sıra hidrojen ve karbondioksit gibi gazlar meydana getirirler. Karbonhidrat fermentasyonu testleri ile, meydana gelen bu ürünler kullanılarak bir mikroorganizmanın herhangi bir karbonhidratı fermente edip etmedikleri anlaşılır (Sneath, 1986).

Triptofan, bazı bakterilerin enzimatik reaksiyonları için, oksidasyona uğraması gereken bir aminoasittir. Triptofanın sonuçta indol üretilen şekilde hidrolize edilebilme kabiliyeti tüm organizmalar için karakteristik olan bir özellik değildir ancak biyokimyasal bir işaret olarak iş görmektedir. İndol testi yapılarak, mikroorganizmaların triptofanı oksidasyona uğratıp uğratmadıkları ortaya çıkarılmaktadır (Sneath, 1986).

Voges-Proskover testi yardımıyla, bazı bakterilerin glikoz metabolizması sonucunda oluşan organik asitlerden, asetilmetil karbinol gibi nötral veya asidik olmayan son ürünleri üretebilme kabiliyetleri ortaya çıkarılır (Sneath, 1986).

Bazı bakteriler, fermente edebilecekleri glukoz veya laktoz ortamda mevcut olmadığında, enerji elde etmek için karbon kaynağı olarak sitratı kullanabilmektedirler. Mikroorganizmaların sitratı kullanıp kullanmadıkları, sitrat kullanım testleriyle ortaya çıkarılır (Sneath, 1986).

Mikroorganizmaların hidrojen sülfür ( $H_2S$ ) üretilip üretilmediği, bakteri sistematğinde kullanılan kriterlerden biridir. Kükürt atomları, inorganik bileşiklerin oksidasyonu sırasında hidrojen akseptörü olarak iş görmektedir.

Bazı aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin nitratı indirgemesi, moleküler oksijen olmadığı durumlarda meydana gelir. Bakterilerin nitratı, nitrit veya amonyağa indirgeyip indirgemediği, nitrat indirgeme testi ile ortaya çıkarılmaktadır (Sneath, 1986).

Katalaz veya Peroksidaz adı verilen enzimleri üretebilen bakteriler, bu enzimler yardımıyla, hücre için zararlı etki yapan hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) ortadan kaldırırlar. Bakterilerin katalaz enzimini üretilip üretilmediği, katalaz testi ile ortaya çıkarılır (Sneath, 1986).

Oksidaz enzimi, aerobik solunum sırasında elektron taşınımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bakterilerin oksidaz enzimine sahip olup olmadıkları, oksidaz testi ile belirlenir (Sneath, 1986).

### **1.7.2. Metabolik Enzim Profilleri ve Biyokimyasal Özelliklerine Göre Bakterilerin Tanısı ve Karakterizasyonu**

Karbonhidratlar yapı ve depo molekülü olup, enerji kaynağıdır. Mikroorganizmaların, çeşitli karbon kaynaklarını enerji kaynağı olarak kullanma ihtiyacında gösterdiği farklılıklar, tanı ve karakterizasyonda kullanılabilir. Bakteriler biyokimyasal, fizyolojik ve hayatsal faaliyetlerini sürdürmek için biyoenerjiye ihtiyaç duymakta ve dışardan aldıkları karbon kaynaklarını metabolik enzimlerle parçalayarak biyolojik enerjiye dönüştürmektedirler. Mikroorganizmaların farklı karbon kaynaklarını (basit şekerler, alkoller, aminoasitler, deterjanlar, aminoasit benzeri moleküller) kullanımında gösterdikleri farklılıklar metabolik profil olarak adlandırılmaktadır ve profildeki bu farklılık sahip oldukları metabolik enzim çeşitliliğine

bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Black ve Sweetmore, 1994; Gamo ve Shoji, 1999). Mikroorganizmaların taşıdığı bu enzim farklılığı ise onların familya düzeyinden başlayıp alt tür seviyesine kadar devam etmektedir (Konopka vd., 1998).

Mikroorganizmaların arasındaki metabolik farklılıkları saptamak için farklı moleküler teknikler geliştirilmiştir.

İlk defa 1989 yılında, farklı karbon kaynaklarının kullanımına bağlı olarak mikroorganizmaların tanısı, sınıflandırılması ve karakterizasyonunda çalışmak üzere bir test paneli (çok gözlü mikro kap) sistemi geliştirilmiştir. 1990'lı yılların ikinci yarısından itibaren özellikle klinik laboratuvarlarda yapılan rutin testlerde kullanılmak için hizmete sunulmuştur.

Hazırlanan mikroorganizma süspansiyonlarının test panelleri üzerindeki farklı karbon kaynakları ile kodlanmış çukurcuklara verilmesi sonucunda, onların karbon substratlarını kullanımına bağlı olarak ortamda organik asit içerikli metabolitler üretilmekte ve ortam asidik özellik kazanmaktadır. Oluşan organik asit ise pH indikatörü boya ile reaksiyona girmekte ve sonuç renklenme şeklinde gözlenmektedir.

Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar da test panelleri tekniğinin, mikrobiyal tanı, sınıflandırma ve karakterizasyonda kullanılabilecek etkili, hızlı, güvenilir, hassas ve düşük maliyetli bir yöntem olduğu onaylanmaktadır (Şahin, 2003).

*API20E panel test sistemi* bir panel içerisine yan yana yerleştirilmiş kuyucuklardan oluşmaktadır. Her bir kuyucuk farklı bir biyokimyasal özelliği belirlemek amacı ile çeşitli substrat veya indikatörleri içermektedir (Tablo 3). Testlerden bazıları inkübasyondan sonra direk olarak testin sonucunun çeşitli renklerle belirlenmesini sağlarken, diğer bir kısmı ise ayraç damlatıldığında renk değişikliği yada kabarcık oluşumu gibi gözle görülebilen değerlendirmeler yapılabilmesini sağlar. Ekimi yapılacak olan izolatlar bu test paneline aktarılmadan önce genel sıvı bir besiyerinde Mc Farland standardına göre 1, yavaş büyüyen izolatlarda ise bu standart 2 olacak şekilde süspansiyonları hazırlanır (Ek 1).

*Phoenix 1000A Panel Test Sistemi* izolatların karakterizasyonlarında API20E test sistemlerinin sahip olduğu testlerden daha fazla sayıda teste sahip olan bu sistem 16 florojen, 8 karbon kaynağı, 14 karbonhidrat, 5 kromojen ve 2 de klasik test olmak üzere aynı panel içerisinde toplam 45 değişik özellik belirleyebilen bir test sistemidir (Tablo 4). Ekimi yapılacak olan izolatlar bu test paneline aktarılmadan önce genel sıvı bir besiyerinde Mc Farland standartlarına göre 0,5 olacak şekilde süspansiyonları hazırlanır (Ek 1).

Tablo 3. API 20E test panel sisteminin içerdği testler

Testler	Substrat	Belirlenen Reaksiyon	Negatif Sonuçlar	Pozitif Sonuçlar
ONPG	ONPG	Beta-galaktosidaz	Renksiz	Sarı
ADH	Arginin	Arginin dihidrolaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
LDC	Lisin	Lisin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
ODC	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
CIT	Sitrat	Sitrat kullanımı	Açık yeşil / Sarı	Mavi-Yeşil / Mavi
H <sub>2</sub> S	Na thiosulfate	H <sub>2</sub> S üretimi	Renksiz / Gri	Siyah tortu
URE	Üre	Üre hidrolizi	Sarı	Kırmızı / Turuncu
TDA	Triptofan	Deaminaz	Sarı	Kahverengi / Kırmızı
IND	Triptofan	İndol üretimi	Sarı	Kırmızı (2 dk.)
VP	Na piruvat	Aseton üretimi	Renksiz	Pembe / Kırmızı (10 dk)
GEL	Kömür jelatin	Jelatinaz	Siyah tabaka dağılmamış	Siyah tabaka dağılmış
GLU	Glukoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi-Yeşil	Sarı
MAN	Mannitol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
INO	İnositol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
SOR	Sorbitol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
RHA	Ramnoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
SAC	Sucrose	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
MEL	Melibiose	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
AMY	Amigdalin	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
ARA	Arabinoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı

Ferm. / oks.: Fermantasyon ve oksidasyon olaylarını göstermektedir.



Tablo 4. Phoenix 1000A cihazının test panellerinin sahip olduğu testler

Kuyucuk	Kuyucukların içerdikleri testler
01	Arginine- Arginine 7-Amido-4-Methylcoumarin
02	Glycine-Proline 7-Amido-4-Methylcoumarin
03	Glycine 7-Amido-4-Methylcoumarin Hydrobomide
04	N-Glutaryl-Glycine-Arginine
05	L-Arginine 7-Amido-4-Methylcoumarin
06	L-Glutamic Acid 7-Amido-4-Methylcoumarin
07	L-Leucine 7-Amido-4-Methylcoumarin
08	L-Phenylalanine 7-Amido-4-Methylcoumarin
09	L-Proline 7-Amido-4-Methylcoumarin Hydrobomide
10	Pyroglutamic Acid 7-Amido-4-Methylcoumarin
11	L-Tryptophane 7-Amido-4-Methylcoumarin
12	Lysine-Alanine 7-Amido-4-Methylcoumarin
13	Acetate
14	Adonitol
15	Citrate
16	Colistin
17	D-Mannitol
18	Ketoglutaric Acid (A)
19	Malonate
20	Polymyxin B
21	Tiglic Acid
22	Methylumbelliferyl N-Acetyl-B-D-Glucoseaminide
23	L-Gamma-Glutamyl-p-Nitroanilide Hydrochloride
24	L-Proline-p-Nitroanilide Trifluoroacetic acid salt
25	p-Nitrophenyl-B-D-Glucoside
26	Bis (p-Nitrophenyl) Phosphate
27	B-D-Allose
28	Gentiobiose
29	Dextrose
30	D-Fructose
31	D-Galactose
32	D-Gluconic Acid
33	D-Melibiose
34	D-Sorbitol
35	D-Sucrose
36	Galacturonic Acid
37	L-Arabinose
38	L-Rhamnose
39	Methyl-B-Glucoside
40	Maltulose
41	N-Acethyl-Galactosamine
42	N-Acethyl-Glucoseamine
43	Ornithine
44	Urea
45	Esculin

### 1.7.3. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler, mikroorganizmaları meydana getiren makromoleküllerin içeriklerine, çeşitlerine ve oranlarına bağlı olarak elde edilen farklılıklardan hareket edilerek oluşturulmuştur. Bu yöntemler, karbonhidratları, lipitleri, proteinleri ve genetik materyali (DNA ve RNA) çalışma materyali olarak kabul etmekte ve bunlardan birinin veya kombinasyonlarının kullanımı ile mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonlarının yapılmasını sağlamaktadır (Manceau ve Horvais 1997). Bu yöntemlerin birçoğu tek başına, alternatifsiz olarak kullanılabilir ve kısa zamanda çok sayıda örnek tür ve alttür seviyesinde tanımlama yapabilmektedir. Elde edilen sonuçlar oldukça hassas ve güvenilirdir. Sistemlerin pahalı oluşu ve çalışmaların yetişmiş elemanlarca yapılmasının gerekliliği moleküler yöntemlerin dezavantajını oluşturmaktadır.

*16S rDNA Dizin Analizi*, mikrobiyal identifikasyon yöntemlerinin en önemlilerinden biri haline gelmiştir. Bu yöntemde her türün ribozomlarının 16S'lik küçük alt birimini kodlayan DNA sırasının oldukça özelleşmiş olmasından faydalanılır. Bakteri genomundaki 16S rRNA geninde devamlı aynı olan yani değişmeyen ve değişken olan bölgeler bulunmaktadır. Bakteri türlerinin teşhisinde bu değişken bölgeler kullanılmaktadır. Gray ve arkadaşları (1984), 16S rRNA geninde 8 adet değişmeyen ve 9 adet değişken bölgenin olduğunu ortaya çıkarmış ve bazı araştırmacılar bu özellikleri kullanarak kültür edilmemiş bakterilerin bile 16S rDNA'larını polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yardımıyla özel primerler kullanarak artırmışlardır (Relman vd., 1992). PCR veya diğer bazı izolasyon yöntemleri ile elde edilen 16S rDNA'nın baz dizin analizi, restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizimi (RFLP) ve hibridizasyon özellikleri kullanılarak türler arasında karşılaştırma yapılmaktadır.

*DNA-DNA Hibridizasyonu* nükleik asit dizileri arasındaki benzerliğin ortaya çıkarılması prokaryotların sistematığının yapılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Böylece genomlar arasındaki benzerlikler gerçekçi bir şekilde ortaya çıkarılmaktadır. Nükleik asit sıralarının ortaya çıkarılması esasına dayanan karşılaştırma çalışmalarında daha çok in vitro nükleik asit hibridizasyonunu esas alan çalışmalar yapılmaktadır (Stackebrandt ve Goodfellow, 1991),

Yeni bakteri türlerinin ortaya çıkarılmasında en çok kabul edilen parametre genomlar arasındaki DNA benzerliğidir.  $\Delta T_m$  (DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılma sıcaklığı) değerindeki benzerliğin oranı olarak ifade edilen bu değer mikroorganizmalar



arasındaki uzaklığı göstermektedir. Bu değerler primer yapı seviyesinde genomik dizi benzerliğinin dolaylı bir yansımasıdır (Goodfellow ve O'Donnell, 1993). Bu yüzden de DNA'nın ayrılıp yeniden birleşmesini konu edinen yaklaşımlar birbirleriyle çok yakın olan prokaryotların akrabalığının gösterilmesinde çok kullanışlı yöntemlerdir (Wayne vd., 1987). Yapılan birçok çalışmada, DNA benzerliği ile kemotaksonomik, genomik, serolojik ve fenotipik benzerlikler arasında ilişki olduğu bulunmuştur ve bundan dolayı, DNA'nın iki zincirinin yeniden birleşmesi, türlerin ayrılmasında standart bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Stackebrandt ve Goebel, 1994). Yapılan birçok çalışma sonucunda tam olarak tanımlanmış birçok türün suşları arasında optimum hibridizasyon şartları uygulandığında % 70'den fazla bir benzerliğin olduğu görülmektedir (Schleifer ve Stackebrandt, 1983). Yapılan bütün bu çalışmalar bakteriyal sistematik komitesinin tür tanımında DNA-DNA bağlanma derecesine verdiği öneme ışık tutmaktadır. Bu komitenin kararı, bir bakteri türünün suşları arasındaki  $\Delta T_m$  derecesinin  $5^\circ\text{C}$  altındaki bir değerdeki DNA-DNA benzerliğinin %70 veya daha fazla olması gereğini ortaya koymaktadır (Wayne vd., 1987).

### **1.8. Mikroorganizmaların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi**

Böceklerden izole edilen mikroorganizmaların, izole edildikleri böcek üzerinde patojenik bir etkiye sahip olup olmadıkları virulans testleriyle belirlenir. Bu testler için böceğin biyolojisi göz önünde tutularak yaşayabilecekleri uygun ortamlar hazırlanır ve sağlıklı böcekler kullanılır. In vitro şartlarda üretilen mikroorganizmaların saf kültürleri hazırlanır ve uygulanır. In vitro olarak üretilmeyen virüsler, protozoalar ve diğer mikroorganizmaların enfeksiyon numunesi, ölü ve hastalıklı böceklerden elde edilir. Böceklerin enfeksiyonu için bir çok metod bilinmektedir. Bu metodlar; besin içinde enfeksiyon, kutikula içine enfeksiyon, ağız ve çevresi içine enfeksiyon, mikroorganizmaları oral ve anal açıklıklar üzerine yerleştirmek, mikrobeseleme ve mikroenfeksiyon şeklinde sıralanabilir (Lipa, 1975).

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

sonuçlarından, mikroorganizmaların neden olduğu ölümleri ayırmak için, ölü böceklerin diseksiyonu yapılmalı ve gerçek ölüm nedeni araştırılmalıdır (Lipa, 1975; Lacey, 1997).

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

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

### 1.9. Çalışmanın Amacı

Yaklaşık 1 milyar dolara yaklaşan ihracat girdisi sağlayan fındık bahçelerinde büyük zararlara yol açan böceklerden biri olan Fındık Uçkurutan Böceği, (*Oberea linearis* L.)'nin bakteriyal florasını belirlemek ve böylece bu zararlıya karşı etkin şekilde kullanılacak bir mikrobiyal kontrol ajanının varlığını araştırmaktır. Bu çalışma sonucunda bu zararlıya yönelik bir biyolojik kontrol ajanının tespiti, halen uygulanmakta olan çok zahmetli ve masraflı olan kimyasal ve mekanik mücadele çalışmalarına alternatif oluşturabilecek ve Türkiye'de kaliteli fındık veriminin artmasını sağlayacağından ülkeye ekonomik açıdan katkılar sağlayacaktır. Aynı zamanda bu çalışma, bu fındık zararlısına karşı ileride gerçekleştirilebilecek olan herhangi bir biyolojik mücadelenin temelini oluşturma özelliğine sahip olabilecektir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Böceklerin Toplanması

Bu çalışma için gerekli olan *Oberea linearis* larvaları, 2003, 2004 ve 2005 yıllarında Ağustos aylarının 1. ve 2. haftalarında, Giresun ili Batlama deresi civarı, Gülburnu ve Değirmenağzı ilçelerinden ve Trabzon ilinin bazı sahil kesimlerinden toplanmıştır. Zararlı iki yıllık hayat döngüsünün sadece 2 gününü ergin olarak geçirir ve bu iki gün içerisinde yumurta bırakır. Bu nedenle yapılan çalışmalar böceğin larvaları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Toplanan larvalar, toplandıkları yer ve tarih not edildikten sonra, içerisinde buldukları ucu kuru olan fidelerden çıkarılmadan laboratuara getirildiler. Larva bulunduğu tahmin edilen taze sürgünler yaklaşık 40-45cm boyunda, boyu 40cm'ye ulaşmayan sürgünler ise dip kısımlarından kesilerek toplandı. Fideler toplanırken olası larvalara zarar vermemek için mümkün olduğunca uzun olarak kesildiler. Larvaların makroskobik incelemeleri laboratuarda yapılarak ölü, hastalıklı ve yavaş hareket edenler ayrıldı.

Toplanan *Oberea linearis* (Fındık uçkurutan böceği) larvalarının bakteriyal florası belirlenmeye çalışıldı. Çalışmalar sonucunda 13 bakteri izole edildi. Elde edilen izolatların bu zararlı üzerindeki insekdisidal etkisi araştırıldı.

Elde edilen izolatların tür tayinlerinin tespiti için morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testler yapıldı.

### 2.2. *Oberea linearis* Larvaları için Laboratuarda Uygun Ortam Oluşturulması

Laboratuara getirilen larvalar ilk olarak petri kaplarına yerleştirilerek gözlendi. Larvalar için ideal ortamın yine fidelere benzeyen ortamlar olabileceği düşünüldü ve bununla ilgili aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirildi.

Larvalar için sürgüne benzeyen bir ortam geliştirmek amacıyla sağlıklı taze fındık sürgünleri uçlarından 20-30cm boylarında kesilerek toplandı. Bekletilmeden fidelerin dış kabukları soyuldu. Kabukları soyulmuş fideler yaklaşık 3cm büyüklüğünde yonga parçalarına ayrıldı. Daha sonra bu yongalar 55°C'de 24 saat kurutuldu. Kuruyan yongalar yonga öğütme makinesinde öğütüldü ve 1 mm gözeneklere sahip elekten geçirildi.

Nemlenmemesi için 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda saklandı. Taze fındık sürgünlerinden elde edilen ve larvaların içerisinde hareket edebilecekleri müsait bir ortam oluşturan bu fide tozu, hafifçe sıkıştırılarak plastik tüplerin (uzunluk: 6cm, çap:1cm) içerisine yerleştirildi. Tüplere bu fide tozu doldurulmadan önce, larvaların dışkılarını dışarı atmaları ve hazırlanan bu toz ortamın havalandırılmasını sağlaması için delikler açıldı. Her tüpe çapı 1mm olan birbirinden yaklaşık 1cm uzaklıkta toplam 20 civarında delik açıldı. Daha sonra hazırlanan fide tozu tüplere dolduruldu. Uygun ortam şartları oluşturmak için nem ihtiyacını karşılamak amacıyla her tüp için gereken su miktarının 600µl olduğu tespit edildi. Bu noktada fide tozu parçacıklarının boyutlarının değişmesi ile ortamın nem ihtiyacının karşılanması için gereken su miktarının değişeceği tespit edildi ve daha sonra gerçekleştirilecek olan biyoassay çalışmalarında nemlendirici olarak izolatlarımızı ihtiva eden sıvı karışımlar verileceği için tüm tüpler için kullanılacak olan fide tozunun homojen olarak karıştırılması gerektiği sonucuna varıldı.

Hazırlanan bu ortamın larva için ideal bir ortam olup olmadığını tespit etmek amacıyla, doğal ortamlarından toplanan larvalar fidelerden çok dikkatli bir şekilde larvayı ezmeden çıkarılarak bu suni ortama aktarıldı. Larvalar hazırlanan bu ortama alınmadan önce bir kristal mikropipet ucu yardımı ile hamurun ortasına tüpün çeperlerine paralel gelecek şekilde 3mm çapında ve yaklaşık 1,5cm uzunluğunda kanallar açıldı. Daha sonra larvalar başları aşağı yönde olacak şekilde bu kanallara yerleştirildiler.

Hazırlanan bu ortamın larvalar için yaşanabilecek bir ortam olup olmadığının denemesi için Kontrol grubu olarak 15 adet larva denendi. Hazırlanan bu suni ortamın sahip olduğu nemi kaybetmesi nedeni ile her bir tüpe günde 150µl steril saf su eklendi.

Larvalardan bazıları gözlem amacı ile petri kaplarının içerisinde besinsiz olarak dış ortama maruz bırakıldılar.

### **2.3. *Oberea linearis*'in Bakteriyal Florasının Belirlenmesi**

#### **2.3.1. Bakteri İzolasyonu**

Laboratuara getirilen sağlıklı *Oberea linearis* larvalarından 10 adet, steril petri kapları içerisine konularak %70'lik etil alkol ile 5 dakika yüzey sterilizasyonuna maruz bırakıldılar. Sonra içerisinde steril saf su bulunan petrilere alınarak 2-3 kez yıkanıp alkolden arındırıldı. Daha sonra tüpün üzerine 1 ml nütrient broth besiyeri ilave edildi.

Steril bir homojenizatör ile larvaların iyice ezilmesi sağlandı. Elde edilen bu karışım bir tülbent vasıtasıyla süzülerek süzüntü başka bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Bu süzüntüden 10µl, 50µl ve 100µl alınarak üç ayrı nütrient agar besiyerine ekim yapıldı. Bu ekimler 30°C'lik etüvde 2-3 gün süre ile inkübasyona tabi tutuldular. Kalan süzüntü atılmayıp 30°C'de 5-6 saat inkübe edildi. Bu inkübasyonun amacı çok düşük miktarlarda olabilecek olan mikroorganizmaların sayısını artırarak sonraki ekimde ortaya çıkabilmelerini kolaylaştırmaktır. Bu inkübe edilen süzüntüden 10 ve 50µl alınarak tekrar nütrient agar besiyerlerine ekim yapıldı.

### **2.3.2. Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması**

İnkübasyonun ardından nutrient agar besiyeri üzerinde üreyen bakteriyal koloniler binoküler mikroskop altında incelendi ve farklı koloni renk ve morfolojilerine sahip olanlar steril edilmiş platin özeyele dikkatlice seçilerek çizgi ekimleri yapıldı ve saf kültürler elde edildi. Elde edilen saf koloniler, numaralandırılarak, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere %20'lik steril gliserol içerisinde – 80 °C'de stoklandı.

### **2.3.3. Bakteriyal İzolatların Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi**

#### **2.3.3.1. Basit Boyama**

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

#### **2.3.3.2. Gram Boyama**

Gram boyama, bakterilerin hücre duvarının içeriği hakkında bilgi veren bir boyama türüdür. Gram negatif olarak boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka,

gram pozitif olarak boyanan bakterilere göre çok daha incedir. Gram boyama için herbir izolat nutrient broth besiyerine ekildi ve 30°C'ye ayarlı su banyosunda 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. Bakteriyal smear hazırlandı ve alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smear, 1 dakika kristal viole ile muamele edilerek dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Kuruması beklenmeden 1 dakika lugolle muamele edildi. Aseton-alkolle renk giderilinceye kadar yıkandıktan sonra, renk kaybını durdurmak için hemen dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. 30-60 saniye safraninle muamele edildi ve tekrar dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Açık havada kurutulduktan sonra mikroskop altında incelemeye alındı. Mor renkle boyanan bakterilerin gram pozitif, pembe renk ile boyanan bakterilerin ise gram negatif olduğuna karar verildi (Cappuccino ve Sherman, 1992).

### **2.3.3.3. Endospor Boyama**

İzolatların endospor oluşturup oluşturmadığını ve varsa endosporun hücre içersindeki pozisyonunu belirlemek amacıyla, herbir izolat nutrient broth besiyerine ekildi ve 48-72 saat 30°C'ye ayarlı su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından bakteriyal smear hazırlandı ve alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smearlar küçük bir filtre kağıdıyla kapatılarak, malaşit yeşili ile 5 dakika boyunca su buharı üzerinde boyandı. dH<sub>2</sub>O ile yıkandı ve 30-60 saniye boyunca safraninle muamele edildi. Tekrar dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak açık havada kurutuldu. Mikroskop altında incelenerek kırmızı renkli hücreler içersinde yeşile boyanmış sporların varlığı araştırıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992).

### **2.3.3.4. Kapsül Boyama**

İzolatların kapsül yapısına sahip olup olmadıklarının belirlenmesi için herbir izolat nutrient broth besiyerine ekilerek, 30°C'ye ayarlı su banyosunda 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Bakteriyal smear hazırlandı ve açık havada kurutuldu. Kristal viole boyası ile 5-7 dakika boyandı. %20'lik CuSO<sub>4</sub> ile yıkandı ve açık havada kurutularak mikroskop altında incelendi. Kapsül boyama negatif bir boyama yöntemidir. Buna göre, mavi renkli bir sahada, mor-eflatun renkli boyanmış hücrelerin etrafında boyanmamış şeffaf bir bölgenin olması, kapsülün varlığını gösterir (Cappuccino ve Sherman, 1992).



### **2.3.3.5. Hareket Testleri**

İzolatların hareketli olup olmadığının araştırılması için “lam-lamel arası preparasyon” tekniği kullanıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992). Bu teknikle izolatların hareketli olup olmadığının ortaya çıkarılması için hazırlanan 24 saatlik kültürlerden bir öze dolusu alındı ve temiz bir lam üzerine konulup lamelle kapatıldı. Hazırlanan bu preparat mikroskopta incelendi ve izolatların hareketli olup olmadığına karar verildi.

### **2.3.4. Bakteriyal İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **2.3.4.1. Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi**

İzolatların maksimum ve minimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla bakteriler nutrient agar besiyeri slantları üzerine ekildiler. 30-50°C arasındaki sıcaklıklar için 5 gün, 20-30°C arasındaki sıcaklıklar için 14 gün ve 20°C'nin altındaki sıcaklıklar için 21 gün etüvde inkübe edilerek maksimum ve minimum büyüme sıcaklıkları ortaya çıkarıldı (Sneath, 1986).

İzolatların optimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla nutrient broth besiyeri içinde yapılan 16-24 saatlik kültürlerden, OD<sub>600</sub> = 0,1 olacak şekilde yeniden nutrient broth besiyerine ekim yapıldı. Hazırlanan kültürler 25, 28, 30, 32, 35, 37 ve 40°C'de 18 saat sallayıcıda büyütüldüler. Yapılan bu kültürlerden saat başı örnekler alınarak spektrofotometrede OD<sub>600</sub>'de absorbans değerleri ölçülerek bakterilerin optimum olarak büyüdüğü sıcaklıklar ortaya çıkarıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992).

#### **2.3.4.2. Büyüyebildikleri pH Aralıklarının Belirlenmesi**

İzolatların büyüyebildiği pH aralığının belirlenmesi için izolatlar değişik pH değerlerine (5, 5.5, 6, 7, 8, 9, 9.5 ve 10) sahip nutrient broth besiyerlerine inoküle edildiler ve 30°C'ye ayarlı etüvde üç gün inkübe edildiler. İnkübasyon neticesinde üreme olup olmadığına spektrofotometrede (OD<sub>600</sub>'de) ölçümler yapılarak karar verildi. (40)

### **2.3.4.3. NaCl Toleranslarının Belirlenmesi**

İzolatların NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla %1, 2, 5, 7 ve 12, 20 oranında NaCl eklenmiş nutrient broth besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerlerinden 4'er ml deney tüplerine alınarak herbir izolattan ekim yapıldı. 14 gün boyunca 30°C'ye ayarlı etüvde inkübe edildiler. Üreme olan ve olmayan tüpler belirlenerek, izolatların hangi oranlarda tuzu tolere edebildiklerine karar verildi (Sneath, 1986)

### **2.3.5. Bakteriyal İzolatların Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi**

#### **2.3.5.1. Nişasta Hidroliz Testleri**

İzolatların nişastayı hidroliz edip etmediklerinin belirlenmesi için "nişasta agar besiyerleri" hazırlandı. Bu besiyerini içeren petrilere herbir izolattan çizgi ekim yapıldı. 3 ve 7 gün boyunca 30°C'ye ayarlı etüvde inkübe edildiler. İnkübasyondan sonra petrilerin üzerine lugol ilave edildi ve koyu kahverengi rengin oluşumu nişastanın hidroliz olduğunu, mavi rengin oluşumu ise nişastanın hidroliz olmadığını gösterdi (Benson, 1985).

#### **2.3.5.2. Jelatin Hidroliz Testleri**

Jelatinin besleyici etkisinin olup olmadığı, zorunlu bir amino asit olan triptofanı içermediği için hala tartışılan bir konudur. Ancak, bakteri sistematiği açısından büyük önem taşımaktadır. Jelatin, insan ve hayvanlardaki bağ dokusunun ana maddelerinden biri olan kollojenin hidrolizi sayesinde elde edilen bir proteindir. Jelatin, 25°C'nin altındaki sıcaklıklarda jel özelliğini koruyarak katı kalırken, 25°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda sıvı hale dönüşür.

Jelatinin izolatlar tarafından hidroliz edilip edilmediğinin ortaya çıkarılması amacıyla hazırlanan nutrient jelatin besiyeri, steril deney tüplerine döküldü. İzolatların herbiri, bu deney tüplerine ekildikten sonra 30°C'de, 72-96 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda inkübe edilen tüpler etüvden alınarak, 20°C'ye ayarlı yeni bir etüve aktarıldılar. Burada 4 saat inkübe edildikten sonra besiyerinin sıvı oluşuna göre testin pozitif, katı oluşuna göre negatif olduğuna karar verildi (Cappucino ve Sherman, 1992).

### 2.3.5.3. İndol Oluşumu Testi

Triptofan aminoasidi bazı bakteriler tarafından karbon, azot ve enerji kaynağı olarak kullanılırken, bazı bakteriler tarafından da maddelerin enzimatik yollarla oksidasyonlarını arttırmak amacıyla kullanılır. Bakteriler triptofan aminoasidi içeren besiyerlerinde büyüdüklerinde, triptofanaz enzimi üretilir, triptofanı parçalayarak indol, pirüvik asit ve amonyum oluşumunu sağlarlar. Bakterilerin triptofanı kullanıp kullanmadıkları, ortamda indolün varlığı veya yokluğu ile anlaşılır.

Bu test için “triptofan broth besiyeri” hazırlandı. Steril tüplere 4'er ml döküldü ve herbir izolattan tüplere ekim yapıldı. 30°C'de, 48 saat inkübe edildi. Daha sonra tüplere ayıraç olarak 1 ml kovack kimyasalı ilave edildi. Tüpün üst kısmında kırmızı bir halkanın oluşup oluşmamasına göre testin sonucunun pozitif veya negatif olduğuna karar verildi.

### 2.3.5.4. Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer Testleri (MRVP)

Bu test fermentasyon esnasında glukozdan yüksek miktarda asit üreten bakterileri, nötral aseton üretenlerden ayırmak için yapılır. MRVP besiyeri, glukoz katkılı nutrient broth olup, Metil Kırmızısı (MR) ve Voges-Proskauer (VP) testleri için kullanılır. Eğer bir bakteri glukozdan yüksek miktarda organik asit üretirse, metil kırmızısı ortama ilave edildiğinde kırmızı olarak kalır. Bu pH'nın 4,4'ün altında olduğunu gösterir. Fermentasyon sonucunda nötral maddeler üretilirse, metil kırmızısı sarıya dönüşür. Bu pH'nın 6.0'nın üzerinde olduğunu gösterir. Aseton üretimi ise  $\alpha$ -naftol (VP-I kimyasalı) ve potasyum hidroksit (VP-II kimyasalı) ilavesi ile tespit edilir. Eğer ortamda aseton mevcut ise ortama kimyasallar ilave edildiğinde tüpün üst kısmı kırmızıya dönüşür. Aseton üretilmemişse besiyerinin rengi açık kahverengine dönüşür.

Bu test için “MRVP broth besiyeri” hazırlandı ve steril edilmiş, kapaklı deney tüplerine 4'er ml döküldü. Herbir izolattan iki ayrı tüp olacak şekilde, besiyeri içeren tüplere ekim yapıldı. 30°C'de, 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından herbir izolatanın bir tüpüne, 250  $\mu$ l metil kırmızısı ilave edildi. Kırmızı renk oluşumunun MR testi için pozitif, sarı renk oluşumunun negatif sonuç olduğuna karar verildi.

Her bir izolatanın diğer türlerine ise, 600  $\mu$ l VP-I kimyasalından ve 200  $\mu$ l VP-II kimyasalından ilave edildi. Tüplerin kapakları açık bırakılarak 15-20 dakika bekletildi.

Pembe-kırmızı arası renk oluşumunun VP testi için pozitif, açık kahverengi renk oluşumunun negatif sonuç olduğuna karar verildi.

#### **2.3.5.5. Sitrat Testleri**

Bazı bakteriler ortamda fermente edebilecekleri maddeler (glukoz, laktoz gibi) bulunmadığı durumlarda sitratı karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler. İzolatların sitratı fermente edip etmediklerinin belirlenmesi için, “Simmon’s sitrat besiyerinden” slantlar hazırlandı. Herbir izolattan slantlara ekim yapıldı ve 30°C’de, 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından besiyerinin renginin yeşilden maviye dönüşüp dönüşmemesine göre testin sonucuna karar verildi.

#### **2.3.5.6. Hidrojen Sülfür (H<sub>2</sub>S) Üretim Testleri**

İzolatların hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) üretilip üretilmediğinin belirlenmesi amacıyla Kligler Iron Agar (KIA) besiyeri kullanıldı. Herbir izolat, KIA besiyerinden hazırlanan slantlara ekildi ve 30°C’de 48-72 saat inkübe edildi. Eğer izolatlar sülfat kaynağı olarak besiyeri içerisinde bulunan sodyum tiosülfattan H<sub>2</sub>S üretirlerse, oluşan H<sub>2</sub>S, yine besiyeri içerisinde indikatör olarak bulunan demir sülfat ile reaksiyona girerek siyah bir çökelek oluşturur. İnkübasyonun ardından slantların alt kısmında siyah rengin oluşup oluşmamasına göre testin sonucuna karar verildi (Benson, 1985).

#### **2.3.5.7. Üre Hidroliz Testleri**

Bazı bakteriler üreaz enzimi üreterek, üreyi alkalik bir son ürün olan amonyak ve CO<sub>2</sub>’e dönüştürürler. İzolatlarda üreaz enziminin varlığının belirlenmesi amacıyla “üre hidroliz besiyerleri” hazırlandı. Herbir izolattan besiyerine ekim yapılarak, 30°C’de 48-72 saat inkübe edildi. Eğer izolatlar üreaz enzimi üretiyorlarsa, ürenin amonyağa parçalanması sonucu alkali bir ortam oluşur. Bu da, besiyeri içerisinde indikatör olarak bulunan fenol kırmızısının, besiyerinin rengini koyu pembeye dönüştürmesine yol açar. İnkübasyonun sonucunda besiyerinin koyu pembeye dönüşüp dönüşmediğine bakılarak testin sonucuna karar verildi (Cappucino ve Sherman, 1992).

### 2.3.5.8. Nitratı İndirgeme Testleri

Nitratın indirgenmesi, bazı aerobik ve fakültatif anaerobik bakteriler tarafından moleküler oksijenin yokluğunda meydana gelen anaerobik bir olaydır. Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrat redüktaz enzimi sayesinde nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) indirgenir. İzolatların nitratı nitrite indirgeyip indirgemediklerinin ortaya çıkarılması amacıyla “nitrat broth besiyeri” hazırlandı ve steril tüplere 4'er ml döküldü. Herbir izolattan tüplere ekim yapıldı ve  $30^\circ\text{C}$ 'de 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda izolatların nitratı indirgeyip indirgemedikleri ortama iki farklı çözeltinin ilavesiyle belirlendi. Ortama Çözelti-I (sulfanilik asit) ve Çözelti-II (dimetil- $\alpha$ -naftilamin)'den 250'şer  $\mu\text{l}$  eklenmesi sonucu, koyu kırmızı renk oluşumu gözlenip gözlenilmemesine göre testin sonucuna karar verildi (Benson, 1985).

Ayrıca, testin negatif sonuç vermesi yani herhangi bir renk değişiminin gözlenilmemesi durumunda iki muhtemel sonuç vardır. Ya nitrat izolatlar tarafından nitrite indirgenememiştir ya da nitritten sonra amonyum veya moleküler azota kadar parçalanmıştır. Bu durumun belirlenmesi için ortama (çözelti-I ve çözelti-II ilavesi sonucu renksiz olan besiyerine), çinko tozu ilave edildi. Çinko tozu ilavesinden sonra pembe renk oluşumu negatif sonuç olarak değerlendirildi. Çünkü bu durum, nitratın nitrite izolatlar tarafından değil, çinko tarafından indirgenmiş olduğunu gösterir. Eğer çinko tozu ilavesi sonucu hala renk değişimi gözlenmiyorsa, nitratın nitritten sonra amonyum ve azota indirgenmiş olduğu anlaşılır (Benson, 1985).

### 2.3.5.9. Katalaz Testleri

Bakteriler, aerobik solunum sırasında hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve bazı durumlarda ise tamamen toksik olan süperoksitler üretmektedir. Mikroorganizmalar, oluşan bu ürünlerin olumsuz etkisinden, bu maddeleri katalaz ve peroksidaz enzimlerinin yardımıyla yıkarak kurtulmaya çalışırlar. İzolatların katalaz enzimi oluşturup oluşturmadıklarının ortaya çıkarılması amacıyla “triptik soy agar besiyeri” hazırlandı. İzolatlar bu besiyerini içeren petrilere ekildikten sonra, 24-48 saat  $30^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildiler. İnkübasyonun ardından petrilere %10'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz kabarcıklarına göre testin pozitif olduğuna karar verildi (Cappucino ve Sherman, 1992).

### **2.3.5.10. Oksidaz Testleri**

İzolatların oksidaz enzimi üretilip üretilmediğinin belirlenmesi amacıyla triptik soy agar besiyerleri hazırlandı. Herbir izolattan bu besiyeriye içeren petrilere çizgi ekim yapıldı. 30°C’de 24-48 saat inkübe edildikten sonra petrilere oksidaz testi ayıracağı (oksidaz reagent) ilave edildi. Oluşan siyah renge göre testin pozitif olduğuna karar verildi (Benson, 1985).

### **2.3.5.11. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri**

Bakterilerin bir çoğu, hayatlarını devam ettirebilmeleri için gerekli olan enerjiyi, çeşitli karbonhidratları da içine alan substratların biyooksidasyonunu meydana getiren enzimatik reaksiyonlardan sağlamaktadır. İzolatların bazı karbonhidratları fermente edip etmediklerinin belirlenmesi amacıyla “karbonhidrat fermentasyon besiyerleri” hazırlandı. Bu besiyerine araştırılmak istenilen karbon kaynağı (glukoz ve laktoz) ve pH indikatörü olarak “bromkresol purple” boyası eklendi. Hazırlanan bu son besiyerine herbir izolattan ekim yapıldı ve 30°C’de 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından besiyerinde meydana gelen koyu pembe den sarıya renk değişimi izolatların eklenen karbonhidratı fermente ettiği, herhangi bir renk değişimi olmaması izolatların eklenen karbonhidratı fermente etmediğini gösterdi (Sneath, 1986).

### **2.3.6. API 20E Panel Test Sistemi**

Bu test uygulanırken nütrient agar üzerinde büyütülmüş gece kültürleri bir öze ile alınarak %0.85 NaCl içerisinde iyice karışması sağlanır. Burada aktarılabilecek olan kültür miktarı McFarland standardı kullanılarak belirlenir (Bak Ek 1.). Hazırlanan bu kültür daha sonra tüm kuyucuklara doldurulur, bu aşamada bazı kuyucuklar tam doldurulurken bazı kuyucukların ise mineral yağ ile üzeri kapatılır. Bu aşamada kuyucuk içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmelidir. Daha sonra bu API panelleri 18-24 saat inkübasyona tabii tutulurlar. Elde edilen sonuçlar Tablo 2’de tanımlandığı gibi renklerine bakarak sonucun pozitif mi yoksa negatif mi olduğuna karar verildi.



### 2.3.7. Phoenix 1000A Panel Test Sistemi

İzolatların bu test sisteminde değerlendirilmelerinin yapılabilmesi bir gece önceden bakterilerin genel bir besiyeri olan Kan agar besiyeri üzerine çizgi ekimleri yapıp elde edilen tek koloniler 3ml besiyeri içerisinde 3 ml sıvı besiyeri içerisinde Mc Farland standardı 0,5 olacak şekilde hazırlanır. Hazırlanan bu bakteri karışımı test panelinin sahip olduğu başlangıç gözeneğine ilave edilip panel dik tutularak bakteri karışımının tüm test kuyucuklarına aynı anda ulaşması sağlandı. Ekimi yapılmış test panelleri cihaza yerleştirildikten sonra 2,5 saat ila 18 saat arasında inkübasyona tabi tutulduktan sonra sonuçlar cihaz tarafından otomatik olarak kaydedilir. Bu panel sisteminin API20E'den farkı panele sonradan ayrıca damlatılmaması ve değerlendirmenin göz ile değerlendirilmeyip cihazın kendisi tarafından yapılmasıdır.

### 2.3.8. İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi

#### 2.3.8.1. İzolatların Genomik DNA'larının izolasyonu

Genomik DNA'nın izolasyonu, Sambrook (1989) ve arkadaşlarına göre gerçekleştirildi. Elde edilen DNA pelleti, 50-100µl steril TE tamponunda çözülerek +4°C'de kullanılmak üzere saklandı.

#### 2.3.8.2. 16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Artırılması

16S rRNA genleri, herbir izolattan saflaştırılan genomik DNA'dan UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') ileri ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGA CGGGCGGTGTGTA-3') geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonlarının şartları Beffa (1996)'ya göre oluşturuldu. 12 ng kalıp DNA, 5 ul 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM d ATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril saf su ile 50µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200µl'lik tüplerde, "Biometra Personal Cycler"da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denatürasyon basamağı 95°C'de 2 dakika olarak

gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü 94°C'de 1 dakika (denatürasyon için), 56°C'de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72°C'de 2 dakika (polimerizasyon için) şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5µl'si % 1,1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5µg/ml) ile boyandıktan sonra "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntüledi.

### **2.3.8.3. 16S rRNA Geninin Baz Dizisinin Belirlenmesi ve Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması**

Yukarıda açıklanan primerler kullanılarak genomik DNA'dan çoğaltılan 16S rRNA genleri klonlama vektörü olan pGEM-T vektörüne klondandı ve doğruluğu teyit edilen klonların baz dizin analizi Macrogen firması (Korea) tarafından gerçekleştirildi. Elde edilen yaklaşık 1400 bp uzunluğundaki 16S rRNA dizileri Gen Bankasında var olan dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı.

## **2.4. İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi**

### **2.4.1. İzolatların Biyoassay İçin Hazırlanması**

Elde edilen izolatlardan 24 saatlik gece kültürleri hazırlandı. Bu gece kültürlerinin yoğunlukları OD<sub>600</sub>'de ölçülerek kaydedildi. 3000×g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra izolatların pelletleri alındı. Her bir çökelti ml'sinde 1,8 x 10<sup>9</sup> bakteri olacak şekilde PBS (Phosphate Buffered Saline) ile sulandırıldı. PBS çözeltisi 100 ml saf suya bir tablet PBS konularak hazırlandı (Ben-Dov vd., 1995).

### **2.4.2. İzolatlardan Hazırlanan Numunelerin *Oberea linearis* Larvalarına Uygulanması**

*Oberea linearis*'ten izole edilen izolatların uygulanması, daha önce anlatılan özel tüpler kullanılarak gerçekleştirildi. PBS ile uygulama amacıyla hazır hale getirilen solusyonlar fide tozlarına nem sağlamak için kullanıldı. Uygulama yapılırken 10'ar adet larva kullanılarak iki tekrar gerçekleştirildi. Normal sağlıklı bireylerden elde edilen izolatlar içinse sadece 3'er larva ile uygulama yapıldı.

*Oberea linearis* larvalarından elde edilen izolatların yanısıra laboratuvarımızda bulunan yüksek öldürücü etkiye sahip olan bazı bakteriyal izolatlarında bu zararlının larvaları üzerinde insektisidal aktivitesinin olup olmadığı araştırıldı. Kullanılan bu izolatlarda yine çeşitli fındık zararlılarından izole edilen *Serretia* ve *Bacillus* cinslerine ait oldukları tespit edilen bakterilerdir (Sezen vd., 2001b; Sezen ve Demirbağ, 1999).



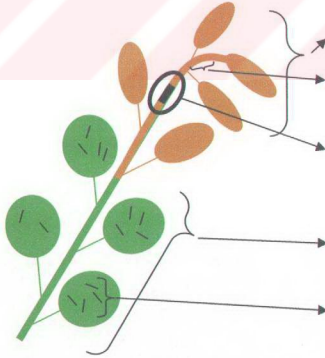
### 3. BULGULAR

#### 3.1. *Oberea linearis*'in Doğada Yayılışı ve Zarar Şekli

Bu çalışmada gerçekleştirilen arazi çalışması esnasında larvaların bulunduğu fidelerle ilgili bazı belirtiler gözlenmiştir.

Larvaların bazen daha üst ve daha alt dallarda da rastlanılmasına rağmen fındık ocaklarının 1-2 m boyundaki sürgünlerde yoğunlaştıkları tespit edildi. Larvaların yumurta bırakmak seçtiği dalların 1 yıllık taze sürgünler olduğu gözlemlendi. Erginlerin yumurtalarını taze sürgün uçlarına bırakmasından dolayı larvaların bu taze sürgünlerin uç kısımlarında yoğunlaştıkları gözlemlendi.

*Oberea linearis* larvası içeren fidelerin uç kısımları yaklaşık 30-45 cm'ye kadar değişen uzunluklarda kurumuş oldukları gözlemlendi (Şekil 5, 6). Çoğunlukla fidelerin uç kısmının yarım ay şeklinde kıvrıldığı, yumurtadan çıkan larvanın fidenin özüne girdiği bölgede kurumuş olan fidenin rengine oranla daha koyu olan yaklaşık 8 mm x 3-4 mm boyutlarında bir bölge olduğu belirlendi. Uç kısmı *Oberea linearis* tarafından kurutulmuş fidenin belirli bir noktasından sonra sahip olduğu yaprakların yeşil ve canlı oldukları tespit edildi. Alt kısımdaki yapraklar üzerinde birikmiş larva dışıklarının olduğu gözlemlendi.



- Fidelerin uç kısımlarının (yaklaşık 30-45cm'e kadar) kurumuş olması.
- Dalın uç kısmının yarım ay şeklinde kıvrılması (genellikle)
- Larvanın yumurtadan çıkıp fidenin özüne girdiği bölgede, rengi solan dala göre daha koyu siyah bir bölgenin olması.
- Larvanın ilerleyebildiği yerden sonraki yaprakların yeşil renkli olması
- Alt kısımdaki yapraklar üzerinde larva dışıklarının birikmesi

Şekil 5. İçerisinde larva olduğu tahmin edilen fındık fidelerinin karakteristik özelliklerinin sematik gösterimi



Şekil 6. İçerisinde *Oberia linearis* bulunduran fındık fidelerinden bir örnek

İki sene boyunca incelenen larvaların larva aşamaları arasında herhangi bir renk değişikliği gözlenmedi. İncelenen larvalar arasındaki renk farklılığının ise beslenmeden kaynaklandığı, laboratuvar şartlarında taze ve kurutulmuş fındık fidelerinden öğütülerek elde edilen tozla beslenen larvaların renklerinin farklı olmasından kaynaklandığı belirlendi.

Kış döneminde fındık fidelerinin içerisinde açtığı galerilerde geçiren larvaların sayısının bahar dönemine girerken gerçekleşen don olaylarından etkilendiği düşünülmektedir.

Fidelerden çıkan erginlerin tekrar yumurta koymak için seçtikleri fidelerin oldukça verimli olabilecek kaliteli dallar olduğu gözlemlendi. Seçilen fındık fidelerinin oldukça geniş yapraklı ve boylarının diğerlerine oranla daha uzun oldukları, fındık ocaklarının en üst dallarından en alt dallarına kadar bütün genç dalları ve fideleri enfekte edebildiği ancak, fazla tercih ettiği dalların ocakların doğusunda kalan kaliteli tek yıllık fındık fideleri olduğu gözlemlenmiştir. Erginlerin yumurta bırakırken daha çok yaprak sapının hemen altını tercih ettikleri belirlenmiştir.

### 3.2. Böcek Larvalarının Toplanması ve Laboratuvar Ortamına Adaptasyonu

Sürgün içlerinde yukarı veya aşağı yönde oldukça hızlı bir şekilde hareket edebilen *Oberia linearis* larvalarının dış ortama alındığında hareket edemedikleri ve verilen çeşitli besinleri kullanmadıkları gözlemlendi.

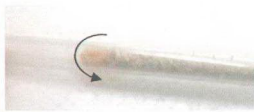
Larvaların en küçük bir darbeye dahi vücutlarını saran ince dokunun zedelenmesi sonucunda vücut sıvılarının önemli bir kısmını kaybedip öldükleri tespit edildi. Larvaların hareket etmek için özelleşmiş organları bulunmadığı ve yılanı benzer şekilde hareket ettikleri için, kendi başlarına, gerçekleştirilen bioassay çalışmalarında kullanılan fide tozu ve sudan oluşan hamur karışımına giremeyeceği düşünüldü.

Fide tozundan hazırlanmış hamurun içerisine açılan kanallara giren larvaların hamurun içinde yılanı benzer şekilde hareket etmeye başladıkları ve yarım saat içinde de 1,5cm uzunluğundaki bu kanalı tamamen geçtikleri gözlemlendi. Hazırlanan bu ortamlarla yapılan gözlemlerde ise larvaların dışıklarını plastik tüplerde açılan deliklerden dışarı attıkları gözlemlendi.

İnceleme sonucunda 20 günlük bir süre içerisinde tüm larvaların oldukça sağlıklı göründükleri ve hepsinin yaşadıkları tespit edildi. Bu çalışma esnasında ilk günlerde dış ortama verilen dışkı miktarının daha sonradan azaldığı gözlemlendi. Bu larvalardan bir kısmı hazırlanan bu ortamda bırakılarak 1 seneden daha uzun süre bu ortamda yaşayabildikleri gözlemlendi. Hazırlanan bu hamur ortamın denenmesi için kullanılan larvalar erken larval aşamadaki bireylerden seçildi.

Larvaların bu kontrol grubu çalışması esnasında oldukça hızlı bir gelişim evresine sahip oldukları ve fidelerden çıkarılan larvaların yaklaşık 15 gün içinde en büyük larvaların sahip olduğu boy uzunluğuna ulaştıkları gözlemlendi. Bu sonuca bağlı olarak larvaların yumurtadan çıktıkları Ağustos ayı içerisinde son instar aşamasına yani larval olgunluk aşamasına ulaştıkları tespit edildi.

Yine laboratuarda yapılan bu çalışmalar esnasında fidelerden çıkarılan larvaların bir kısmının başının dalın ucuna doğru diğerlerinin ise ters tarafa doğru olduğu ve bu durumun genç veya olgun larvalar arasında fark etmediği gözlemlendi. Bu doğrultuda yapılan bir incelemede fidelerden çıkarılan 22 larvadan 4 ünün yukarı yönelmiş olduğu gözlemlendi ve larvaların dalın içinde yön değiştirebildikleri belirlendi. (Şekil 7).



Şekil 7. *Oberia linearis* larvasının yerleştiği kanal içerisinde vücut yönünü değiştirmesi (okunucu larvanın baş kısmını gösteriyor).



Bir petri kabına bırakılarak incelemeye alınan larvaların vücut enlerinde gün geçtikçe bir azalma, yani su kaybı ile meydana gelen bir zayıflama olduğu belirlendi. Bu zayıflayan larvaların hemen yanına ulaşabilecekleri şekilde bir damla su damlatıldığında bir süre sonra yine eski vücut boyutlarına ulaştıkları gözlemlendi.

### **3.3. *Oberea linearis* Larvalarının Bakteriyal Florası**

Larvalardan elde edilen süzüntülerden nütrient agar üzerine yapılan ekimler sonucu petrielerde oluşan kolonilerin morfolojilerine bakarak birbirinden farklı özelliklerde olan kolonilerden örnekler seçilip daha sonra çizgi ekimle saflaştırılıp özel stokları yapıldı. Sonuç olarak sağlıklı larvalardan toplam 7 farklı izolat, doğadan ölü olarak toplanan larvalardan veya stres oluşturularak ölen larvalardan 6 tane olmak üzere toplam 13 izolat tespit edilmiş oldu.

#### **3.3.1. Bakteriyal İzolatların Sistematik Özellikleri**

##### **3.3.1.1. İzolatların Morfolojik Özellikleri**

Binoküler mikroskop incelemeleri sonucunda; 1 numaralı izolatın kolonilerinin üst kısmının dalgalı, krem rengi düzgün-yuvarlak olduğu, 2 numaralı izolatın beyaz renkli düzgün-yuvarlak, üst kısmı konkav olduğu, 3 numaralı izolatın koyu krem rengi dalgalı dağınık, 4 numaralı izolatın kolonilerinin koyu sarı renkli dalgalı dağınık, 5 numaralı izolatın kolonilerinin açık sarı renkli düzgün yuvarlak, 6 numaralı izolatın kolonilerinin sarı düzgün yuvarlak, 7 numaralı izolatın kolonilerinin açık sarı düzgün yuvarlak mukoid, 8 numaralı izolatın kolonilerinin krem rengi dağınık düzgün yuvarlak, 9 numaralı izolatın kolonilerinin krem rengi düzgün yuvarlak, 10 numaralı izolatın kolonilerinin krem rengi küçük düzgün yuvarlak, 11 numaralı izolatın kolonilerinin krem rengi büyük düzgün yuvarlak, 12 numaralı izolatın kolonilerinin açık sarı dalgalı yuvarlak ve 13 numaralı izolatın kolonilerinin kırmızı dalgalı yuvarlak koloni morfolojilerine sahip olduğu belirlendi (Tablo 5).

Tablo 5. İzolatların morfolojik özellikleri

İzolatlar	Morfolojik Özellikler						
	Koloni rengi	Koloni şekli	Gram boyama	Hareket	Hücre Şekli	Kaynak	NB'deki Görünüm
1	Krem	Düz.-Yuv.	-	+	Kokkobasil	CL	B + Ç
2	Beyaz	Düz.-Yuv.	-	+	Basil	CL	B
3	Koyu Krem	Dal.- Dağ.	-	+	Basil	CL	B
4	Koyu Sarı	Dal.- Dağ.-Man.	-	-	Basil	CL	B
5	Açık Sarı	Düz.-Yuv.	+	+	Basil	CL	B
6	Sarı	Düz.-Yuv.	-	+	Basil	CL	B
7	Sarı	Düz.-Yuv.-M.	-	+	Basil	CL	B
8	Krem	Düz.-Yuv.-Dağ.	-	+	Basil	ÖL	B
9	Krem	Düz.-Yuv.	-	+	Basil	ÖL	B
10	Krem	Dal.-Yuv.-Küç.	-	+	Basil	ÖL	B
11	Krem	Düz.-Yuv.-Büy.	-	+	Basil	ÖL	B
12	Açık sarı	Dal.-Yuv.	-	+	Basil	ÖL	B
13	Kırmızı	Dal.-Yuv.	-	+	Basil	ÖL	B

Düz.: Düzgün; Yuv.: Yuvarlak; Dal.: Dalgali; Dağ.: Dağınık, Man.: Mantar gibi, CL: Canlı larva, ÖL: Ölü larva, B: Bulanık; Ç:Çökme., M.: Mukoid görünümlü, Büy.: Büyük kolonili, Küç.: Küçük kolonili

Yapılan basit boyama sonucunda 1 numaralı izolatın kokkobasil diğer izolatların ise basil morfolojiye sahip bakteriler oldukları tespit edildi (Tablo 4). İzolatların gram boyamaları sonucunda ise sadece 5 numaralı izolatın mor renge boyandığı için gram olumlu, diğer izolatların pembe renge boyandıkları için gram olumsuz oldukları belirlendi (Tablo 4). Yapılan hareket incelemeleri sonucunda 2 ve 4 numaralı izolatlar hariç bütün izolatların az veya çok hareketli, olduğu tespit edildi (Tablo 5).

### 3.3.1.2. İzolatların Fizyolojik Özellikleri

İzolatların fizyolojik özellikleri Tablo 5'de verilmiştir. İzolatların büyümeleri üzerine etkili olan sıcaklık, pH ve NaCl'e karşı tolerans gibi fiziksel özelliklerinin araştırılması amacıyla testler yapıldı.

İzolatların NaCl'ye olan toleranslarının belirlenmesi amacıyla yapılan testler sonucunda tüm izolatların %1 ve 2 oranında NaCl içeren besiyerlerinde büyüdüğü görüldü. %5 NaCl içeren besiyerinde 4 numaralı izolatın büyümediği, diğer izolatların büyüdüğü; % 7 NaCl içeren besiyerinde 2, 5, 6, 11 ve 13 numaralı izolatların büyüdüğü diğerlerinin ise büyümediği % 8,5'lik NaCl içeren besiyerinde ise sadece 6, 11, 13 numaralı izolatların büyüebildiği belirlendi. %12 ve % 20 NaCl içeren besiyerinde ise hiçbir izolatın büyümediği tespit edildi (Tablo 6).

Tablo 6. İzolatların fizyolojik özellikleri

İzolatlar	pH Testi								NaCl Testi (%)						Sıcaklık Testi (°C)				
	5	5,5	6	7	8	9	9,5	10	1	2	5	7	8,5	12	20	20	30	37	40
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

### 3.3.1.3. Bakteriyal İzolatların Biyokimyasal ve Metabolik Özellikleri

İzolatların biyokimyasal özellikleri Tablo 7'de verilmiştir. Bazı enzimlerin varlığı veya yokluğu izolatların bazı organik maddeleri fermente edip edemediklerini belirlediği için bakteri sistematigi açısından büyük önem taşımaktadır. İzolatların bu enzimleri üretip üretmediklerinin belirlenmesi amacıyla bir dizi test yapıldı.

İndol oluşum testi sonucu hiçbir izolatın indol oluşturamadığı görüldü.

Katalaz testi sonucunda 3 ve 8 numaralı izolatların katalaz enzimi üretemezken diğerlerinin katalaz enzimini üretebildiği tespit edildi.

Yapılan oksidaz testi sonucunda 2, 3, 4, 7, 9, 10 ve 12 numaralı izolatların oksidaz aktivitesine sahip oldukları diğer izolatların ise oksidaz aktivitesi gösteremedikleri belirlendi.

Nişasta hidroliz testleri sonucunda 4, 5 ve 7 numaralı izolatlar nişastayı hidroliz ederken, diğer izolatların nişastayı hidroliz edemedikleri belirlendi. Jelatin hidroliz testi sonucunda 3, 4, 7, 8, 11, 12 ve 13 numaralı izolatların jelatini hidroliz ettiği, diğer izolatların ise jelatini hidroliz etmediği görüldü. Üre hidroliz testleri sonucunda izolatlardan hiçbirinin üreyi hidroliz edemediği belirlendi.

Tablo 7. İzolatların klasik yöntemlerle belirlenen biyokimyasal özellikleri

İzolatlar	Biyokimyasal Özellikler										
	Katalaz Testi	Oksidaz Testi	İndol Testi	Metil K. Testi	VP Testi	Sitrat Testi	Jelatin Testi	Amilaz Testi	Üre Testi	Nitrat Testi	H <sub>2</sub> S Üretimi
1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	+	+	-	-	-/+	+	-
3	-	+	-	+z	-	+	+	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	+z	+	+z	-	+	-
5	+	-	-	+	-	+z	-	+	-	-	-
6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
7	+	+	-	-	-	+	+	+	-	++	-
8	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
9	+	+	-	+z	-	+	-	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
11	+	-	-	-/+	+	+	-	-	-	+	-
12	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
13	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-

Z+: Zayıf pozitif; ++: Nitratın amonyum ve moleküler azota indirgeme

İzolatların glukoz metabolizması sonucu ürettikleri son ürünlerin niteliğinin belirlenmesi amacıyla Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri yapıldı. Bu testler sonucunda 1, 3, 7 ve 11 numaralı izolatların glukoz metabolizması sonucu yüksek miktarda organik asit oluşturabildiği (MR +) belirlendi. Aynı zamanda 2, 6, ve 13 numaralı izolatların glukoz metabolizması sonucu nötral son ürünler de oluşturabildiği (VP +) gözlemlendi.

İzolatların sitratı kullanım ve nitratı indirgeme kabiliyetleri bakteri sistematigi açısından önemlidir. Bu amaçla yapılan testlerde 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ve 13 numaralı izolatların sitratı kullanabildikleri, 1 ve 8, numaralı izolatların sitratı kullanamadığı belirlendi. Nitrat indirgeme testleri sonucunda 2, 4, 6, 11 ve 13 numaralı izolatların nitratı indirgediği, 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, ve 12 numaralı izolatların ise indirgeyemediği görüldü. Ayrıca 9 numaralı izolatın nitratı nitritten sonra amonyum ve moleküler azota kadar indirgeyebildiği tespit edildi.

İzolatların sülfür metabolizması sonucu H<sub>2</sub>S gazı üreten üretilmediklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testler sonucunda hiçbir izolatın H<sub>2</sub>S gazı üretmediği belirlendi.

13 numaralı izolatın Metil red VP ve Nitrat besiyerilerinden sadece nitrat besiyerinde kendi özel rengini gösterebildi. %5 ve %7 lik NaCl solüsyonlarında renk vermediği tespit edildi.

### 3.3.1.3.1. API20E Panel Test Sistemi ile Tespit Edilen Özellikler

API20E test panellerine yapılan ekimler 1 gece 30°C'de inkübe edildikten sonra bazı test kuyucukları direk incelenerek bazıları ise ayıraç ilave edilerek izolatların bazı metabolik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. Büyümesi yavaş olan izolatlar Mc Farland standardına göre yoğunluğu 2 olacak şekilde 2 gece inkübe edilerek sonuçlar kaydedildi (Tablo 8).

Tablo 8. İzolatların API20E Panel Test Sistemi ile belirlenen özellikleri

Testler	Substrat	Aktivite	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ONPG	ONPG	Beta-galaktosidaz	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
ADH	Arginin	Arginin dihidrolaz	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
LDC	Lisin	Lisin dekarboksilaz	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
ODC	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CIT	Sitrat	Sitrat kullanımı	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	Na thiosulfate	H <sub>2</sub> S üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	Üre	Üre hidrolizi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	Triptofan	Deaminaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	Triptofan	İndol üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	Na piruvat	Aseton üretimi	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+
GEL	Kömür jelatin	Jelatinaz	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
GLU	Glukoz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
MAN	Mannitol	Fermantasyon / oksidasyon	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
INO	İnositol	Fermantasyon / oksidasyon	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	Sorbitol	Fermantasyon / oksidasyon	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
RHA	Ramnoz	Fermantasyon / oksidasyon	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
SAC	Sucrose	Fermantasyon / oksidasyon	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
MEL	Melibiose	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
AMY	Amigdalın	Fermantasyon / oksidasyon	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
ARA	Arabinoz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-

### 3.3.1.3.2. Phoenix 1000A Panel Test Sistemi Belirlenen Özellikler

Bakteriyal izolatlar bir gece Kan agar üzerinde büyütüldükten sonra Mc Farland standardı 0,5 olacak şekilde test panellerine ekim yapıldı. İnkübasyon sonrasında elde edilen sonuçlar değerlendirilmeye tabii tutuldu (Tablo 9).





Tablo 9. Bakteriyal izolatlardan Phoenix 1000A cihazı ile belirlenen özellikleri

Testler	Bakteriyal İzolatlar												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Arginine-Arginine 7-Amido-4-Methylcoumarin	-	±	-	+	-	±	+	-	-	+	±	+	+
Glycine-Proline 7-Amido-4-Methylcoumarin	-	-	-	+	±	-	+	±	-	+	-	+	±
Glycine 7-Amido-4-Methylcoumarin Hydrobomide	-	-	±	-	-	±	±	+	±	-	±	-	±
N-Glutaryl-Glycine-Arginine	-	-	-	±	-	-	+	-	-	±	-	±	-
L-Arginine 7-Amido-4-Methylcoumarin	-	-	-	+	±	-	±	±	-	-	-	-	-
L-Glutamic Acid 7-Amido-4-Methylcoumarin	-	+	±	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+
L-Leucine 7-Amido-4-Methylcoumarin	+	±	±	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±
L-Phenylalanine 7-Amido-4-Methylcoumarin	±	-	±	+	+	±	+	+	±	-	-	-	±
L-Proline 7-Amido-4-Methylcoumarin Hydrobomide	-	-	±	-	±	±	±	+	-	-	-	-	+
Pyroglutamic Acid 7-Amido-4-Methylcoumarin	-	±	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	±
L-Tryptophane 7-Amido-4-Methylcoumarin	-	-	±	+	+	-	±	±	-	-	-	-	-
Lysine-Alanine 7-Amido-4-Methylcoumarin	-	±	-	+	±	±	+	-	-	±	±	+	±
Acetate	-	-	-	±	-	±	±	+	-	-	-	-	-
Adonitol	-	±	-	±	±	±	±	-	-	-	±	-	±
Citrate	±	±	-	±	±	±	±	±	-	±	±	±	±
Colistin	±	-	-	±	+	±	±	-	-	-	-	-	±
D-Mannitol	±	+	±	±	±	±	-	-	-	-	+	-	+
Ketoglutaric Acid (A)	+	±	-	±	±	±	±	+	-	±	±	±	±
Malonate	±	±	-	±	±	±	±	-	-	-	±	-	±
Polymyxin B	±	-	-	±	+	-	±	-	-	-	-	-	±
Tiglic Acid	±	-	-	±	-	±	-	-	-	-	-	-	-
Methylumbelliferyl N-Acetyl-B-D-Glucosaminide	-	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	±
L-Gamma-Glutamyl-p-Nitroanilide Hydrochloride	-	-	-	-	-	±	±	±	+	±	±	±	±
L-Proline-p-Nitroanilide Trifluoroacetic acid salt	-	-	±	-	-	±	-	+	+	-	-	-	-
p-Nitrophenyl-B-D-Glucoside	-	+	-	-	-	±	±	-	-	-	±	-	±
Bis (p-Nitrophenyl) Phosphate	+	±	-	±	-	+	±	-	-	-	±	-	±
B-D-Allose	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-

“Tablo 9.’un devamı”

Testler	Bakteriyal İzolatlar												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
B-Gentiobiose	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-
Dextrose	±	+	-	-	-	+	-	-	±	-	+	-	+
D-Fructose	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
D-Galactose	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-
D-Gluconic Acid	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-	±
D-Melibiose	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-	-
D-Sorbitol	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-	±
D-Sucrose	±	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Galacturonic Acid	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-	-
L-Arabinose	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-	-
L-Rhamnose	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-
Methyl-B-Glucoside	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Maltulose	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-	-
N-Acethyl-Galactosamine	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-
R_N-Acethyl-Glucoseamine	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±
Urea	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	±

± : Cihazın test sonucunu zayıf yada pozitif olarak belirleyemediği testler.

### 3.3.1.4. İzolatların Bazı Genetiksel Özellikleri

#### 3.3.1.4.1. 16S rRNA Genlerinin Baz dizileri

Bakteri sistematigi çalışmalarında 16S rRNA genlerinin baz dizilerinin ortaya çıkarılması önemli genetiksel özelliklerin başında gelir. Bu amaçla ilk olarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda birbirleriyle aynı tür olabilecek olan izolatlar dışındaki tüm bakteri izolatlarından elde edilen genomik DNA'dan PCR yardımı ile 16S rRNA geni (yaklaşık olarak 1400 bp) çoğaltıldı. Çoğaltılan 16S rRNA genleri pGEM-T vektörüne klonlandı ve doğru klonların agaroz jelde incelenerek teyit edilmesinden sonra baz dizisini belirleyen bir şirket (Macrogen, Korea) aracılığıyla baz dizileri otomatik dizi analizörleri ile belirlendi.

Elde edilen izolatların 16S rRNA gen dizileri, Gen Bankasında var olan diğer bakteriyal 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılarak bu gen dizilerine en fazla benzer olan diğer bakteriyal 16S rRNA genleri arasındaki benzerlik oranları belirlendi (Tablo 10.). Morfolojik, boyama, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine bakıldığında birbirlerine çok benzeyen ama koloni büyüklükleri veya başka sebeplerden dolayı farklı bir alttür olabileceği tahmin edilen izolatlardan bazılarında yine 16 S rRNA gen dizini karşılaştırmasına tabi tutuldular.

Tablo 10. Belirlenen 16S rDNA dizilerinin gen bankasındaki genler ile karşılaştırmaları

İzolat	Gen bankasının 16 S rRNA dizin analizine göre önerdiği tür ve cinsler	Örtüşen Baz Sayıları	Benzerlik Oranı (% olarak)
1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1391/1400	(99%)
	Glacial ice bacterium	1368/1374	(99%)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1361/1367	(99%)
	<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i>	1386/1401	(98%)
	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	1352/1388	(97%)
2	<i>Klebsiella terrigena</i>	1379/1383	(99%)
	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	1375/1393	(99%)
	<i>Klebsiella trevisanii</i>	1374/1393	(98%)
	<i>Gamma proteobacterium</i>	1384/1404	(98%)
	<i>Pantoea agglomerans</i>	1384/1405	(98%)
	<i>Citrobacter freundii</i>	1382/1406	(98%)
	<i>Klebsiella planticola</i>	1374/1393	(98%)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1366/1383	(98%)

“Tablo 10.’un devamı”

3	<i>Pseudomonas</i> sp.	1395/1400	(99%)
	<i>Pseudomonas orientalis</i>	1385/1393	(99%)
	<i>Pseudomonas veronii</i>	1385/1397	(99%)
	<i>Pseudomonas marginalis</i>	1386/1400	(99%)
	<i>Pseudomonas antarctica</i>	1377/1388	(99%)
	<i>Pseudomonas trivialis</i>	1386/1400	(99%)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1385/1399	(98%)
	<i>Pseudomonas meridiana</i>	1376/1388	(99%)
	<i>Pseudomonas poae</i>	1385/1400	(98%)
4	<i>Flavobacterium</i> sp.	1329/1371	(96%)
	<i>Flavobacterium columnare</i>	1327/1383	(95%)
5	<i>Microbacterium</i> sp.	1375/1380	(99%)
	<i>Microbacterium foliorum</i>	1356/1363	(99%)
	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	1354/1363	(99%)
	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	1365/1383	(98%)
	<i>Microbacterium oxydans</i>	1361/1377	(98%)
	<i>A. liquefaciens</i>	1344/1363	(98%)
	<i>Microbacterium luteolum</i>	1332/1354	(98%)
	<i>Aureobacterium keratanolyticum</i>	1331/1353	(98%)
6	<i>Pantoea agglomerans</i>	1372/1383	(99%)
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	1383/1393	(99%)
	Bacterium SV72A	1385/1392	(99%)
	<i>Pantoea ananatis</i> strain BD 442	1386/1403	(98%)
	<i>Erwinia herbicola</i>	1351/1361	(99%)
7	<i>Xanthomonas campestris</i>	1403/1410	(99%)
	<i>Xanthomonas cynarae</i>	1403/1410	(99%)
	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	1401/1410	(99%)
	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	1401/1410	(99%)
	<i>Xanthomonas oryzae</i>	1401/1410	(99%)
	<i>Xanthomonas gardneri</i>	1402/1411	(99%)
	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	1399/1410	(99%)
	<i>Pseudomonas cissicola</i>	1394/1404	(99%)
8	<i>Pseudomonas syringae</i>	1394/1401	(99%)
	<i>Pseudomonas tremae</i>	1392/1401	(99%)
	<i>Pseudomonas congelans</i>	1391/1401	(99%)
	<i>Pseudomonas meliae</i>	1373/1381	(99%)
	<i>Pseudomonas cannabina</i>	1387/1401	(99%)
	<i>Pseudomonas ficuserectae</i>	1373/1387	(98%)
	<i>Pseudomonas borealis</i>	1384/1401	(98%)
	<i>Pseudomonas mandelii</i>	1378/1394	(98%)
9	<i>Pseudomonas putida</i> strain ATCC	916/921	(99%)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	915/921	(99%)
	<i>Pseudomonas gingeri</i>	907/921	(98%)
	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	903/918	(98%)
	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	903/919	(98%)

“Tablo 10.’un devamı”

10	<i>Gamma proteobacterium</i>	1394/1405	(99%)
	<i>Stenotrophomonas</i> sp. EC-S105	1399/1411	(99%)
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1387/1397	(99%)
	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	1379/1397	(98%)
	<i>Pseudomonas geniculata</i>	1378/1397	(98%)
11	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1370/1382	(99%)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1381/1394	(99%)
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1390/1404	(99%)
	<i>Klebsiella oxytoca partial</i>	1370/1382	(99%)
	<i>Pantoea agglomerans</i>	1384/1402	(98%)
	<i>Morganella morganii</i>	1381/1400	(98%)
	<i>Gamma proteobacterium</i> SSCT62	1376/1394	(98%)
	<i>Enterobacter ludwigii</i>	1366/1382	(98%)
12	<i>Stenotrophomonas</i> sp. LQX-11	1403/1409	(99%)
	<i>Gamma proteobacterium</i>	1397/1405	(99%)
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1400/1408	(99%)
	<i>S. maltophilia</i> LMG 958-T	1382/1388	(99%)
	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> ATCC	1382/1396	(98%)
13	<i>Pantoea agglomerans</i> BJ-Tobacco	1377/1396	(98%)
	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	1384/1406	(98%)
	<i>Enterobacter agglomerans</i> A58	1366/1386	(98%)
	<i>Erwinia herbicola</i>	1348/1365	(98%)

### 3.3. İzolatların *Oberea linearis* Larvaları Üzerine Olan İnsektisidal Etkileri

Elde edilen izolatların uygulanması amacıyla farklı coğrafik bölgelerden toplanan larvalar kullanıldı. Toplanan larvalar hazırlanan plastik tüplere aktarıldı ve her bir izolatın insektisidal etkisi 10-13 gün boyunca araştırıldı. Testin sonuçlarını larvalar tüpün içindeyken görmek mümkün olmadığı için testin hangi gününde ölümlerin gerçekleştiğine dikkat etmeden 12 gün sonunda sonuçlar kaydedildi (Tablo 10).

### 3.4. Diğer Fındık Zararlılarından İzole Edilen Bakterilerin *Oberea linearis* Larvaları Üzerindeki İnsektisidal Etkileri

Fındık zararlısı olması nedeni ile bu zararlının larvalarının daha önce yine fındık zararlılarından izole edilmiş olan bakterilerden etkilenebileceği düşünülerek bu çalışma gerçekleştirildi (Tablo 11). İlk olarak gerçekleştirilen bioassay çalışmalarında kontrol olarak Coleoptera’larda yüksek öldürücü etkiye sahip olan bazı *Serretia marcescens* ve

*Bacillus thuringiensis* suşları kullanıldı. Fakat bu bakterilerin *Oberea linearis* larvaları üzerinde herhangi bir insektisidal etkileri gözlenemedi.

Tablo 11. *Oberea linearis* larvalarından ve farklı fındık zararlılarından izole edilmiş bakterilerin *Oberea linearis* larvalarına uygulanması

Uygulanan İzolat	Başlangıçtaki larva sayısı	Testin sonundaki canlı larva sayısı	Gerçekleşen ölüm sayısı	Ölüm Oranı (patojenite)
1	6	6	0	% 0
2	6	6	0	% 0
3	6	6	0	% 0
4	6	6	0	% 0
5	6	6	0	% 0
6	6	6	0	% 0
7	6	6	0	% 0
8	20	20	0	% 0
9	20	20	0	% 0
10	20	19	1	% 5
11	20	17	3	% 15
12	20	19	1	% 5
13	20	7	13	% 65
S. m.	20	12	8	% 40
Xd 1	20	2	18	% 80
Mm 2	20	3	17	% 75
Bt. S. K.	20	1	19	% 90
Kontrol	20	20	0	% 0

Bt. S.K.: *Bacillus thuringiensis* spor-kristal karışımı, S.m.: *Serretia marcescens*, Mm2: *Melolontha meolontha*'dan elde edilen bir *Serretia* izolatı; Xd1: *Xyleborus dispar*'dan elde edilen *Bacillus thuringiensis* izolatı.

Bir sonraki insektisidal aktivite deneyinde ise *Oberea linearis* larvalarından genç olanlar tercih edildi ve oldukça sağlıklı ve tutarlı sonuçlar elde edildi.

İnsektisidal aktivitenin araştırıldığı bu bioassay çalışmasının sonucunda ölü olarak bulunmuş *Oberea linearis* larvasından elde edilen 13 numaralı izolatın bu zararlının larvaları üzerinde yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu tespit edildi.



#### 4. TARTIŞMA

Ülkemizdeki fındık ekili alanlar, çevre dengesi açısından önemleri, insanların geçim kaynağını oluşturmaları ve son yıllarda fındığın ülkemizin tarım alanında en önemli gelir kaynağı olması bakımından büyük öneme sahiptirler. Bu nedenle fındık ağaçlarının fonksiyonlarını yerine getirebilmesi ve devam ettirebilmeleri için korunmaları gerekmektedir. Canlı ve cansız birçok etken fındık ağaçlarının varlığını tehdit etmektedir. Hiç kuşkusuz zararlı böcekler bunların en önemlilerinden biridir (URL-4, 2005).

Fındık uçkurutanın ergin erkek ve dişi bireyleri morfolojik olarak vücut ve anten uzunluklarının farklı olması ile ayırt edilirler. Dişiler erkeklerden daha uzun vücut boyuna sahiptirler (URL-3, 2005).

Bu zararıya karşı bir mikrobiyal mücadele ajanının geliştirilmesi ve *Oberea linearis*'in bakteriyal florasının belirlenmesinin amaçlandığı bu çalışma kapsamında bakteriyal floranın belirlenmesi için fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testler uygulanmıştır.

Yapılan literatür araştırması sonucunda daha önce *Oberea linearis*'in mikrobiyal florası veya biyolojik kontrol ajanının geliştirilmesi ile ilgili herhangi bir çalışma tespit edilememiştir. Bu çalışma bugüne kadar *Oberea linearis*'in mikrobiyal florası üzerine yapılan ilk çalışmadır.

Tür tayinlerinde büyüme özellikleri ve morfolojik özelliklerine bakılarak elde edilen izolat sayısı tam olarak 13'tür. Bu 13 izolatın 7'si tür seviyesinde diğerleri ise cins seviyesinde belirlenmiştir.

Bu tam çalışmalarında bakterilerin tür tayininde rutin olarak kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin dışında, son yıllarda bakterilerin tür tayinlerinin doğru bir şekilde yapılabilmesi için geliştirilmiş üç yeni metod olan 16S rDNA dizin analizi, API20E ve Phoenix identifikasyon sistemleri kullanılmıştır. Bakterilerin tür tayinleri için Bergey's Manual of Systematic Bacteriology kaynak kitabı kullanılmış ve yapılan tanımlar API20E ve Phoenix analiz sonuçlarıyla desteklenmiştir (Halda-Alija, 2004; Lian, 2004).

Bu sistemlerin rutin olarak gerçekleştirilen klasik testlere karşı bazı avantajları vardır. Bu avantajlardan en önemlileri izolatların aynı ortam şartları altında

değerlendirilmeleri ve bu tür test panellerinin içerdiği testlerin hepsinin klasik yöntemlerle yapılması için gereken masraf ve zamanın çok büyük ölçüde geri kazanılmış olmasıdır.

Bu sistemler sayesinde izolatlarımızın sahip olduğu metabolik aktiviteler ve biyokimyasal özellikleri hakkında çok geniş miktarda bilgi edinildi. Rutin çalışmalarla elde edilen veriler tür tayini için yetmediği durumlarda bu test sistemlerinden elde edilen veriler sayesinde tür tayini yapılabildi.

16S rRNA genleri oldukça iyi korunmuş universal sıralara sahiptir (Woese 1990). Bu genler bakteriler arasındaki akrabalıkları belirlemede ve bakterilerin tür veya cins seviyesinde identifikasyonlarının yapılmasında son günlerde oldukça önemli bir araç haline gelmiştir (Sacchi vd, 2002).

16S rRNA alt ünitelerinin genlerine göre gerçekleştirilen moleküler identifikasyon tekniklerinin gelişimi ile karmaşık yapıya sahip mikrobiyal komuniteleri anlamak daha da kolay olmuştur. 16S rRNA genlerinin analizi bütün bakterileri tanımlamada kullanılabilir bir yöntemdir. Bu yöntem klasik mikrobiyal metotların aksine çok önemli iki avantaj sağlar. Bu avantajlardan ilki oldukça hızlı bir metod olması ikincisi ise identifikasyon doğruluğunun oldukça gelişmiş olmasıdır (Springer vd., 1996).

Yapılan çalışmalarda 1 numaralı izolatın hareketsiz, aerobik, spor oluşturmayan, gram (-), katalaz enzimi üreten, basil şeklinde bakteriler olduğu için *Neisseriaceae* familyasına dahil edildi. Oksidaz enzimi üretmedikleri ve anaerobik üreyemedikleri içinde bu familya içindeki diğer cinslerden ayrılarak *Acinetobacter* cinsine dahil olduklarına karar verildi. Elimizdeki izolatın glukozdan asit oluşması ile bu cinsin üyelerinde olan *Acinetobacter calcoaceticus*'un fenotipik gruplarından A1'e benzediği düşünülmektedir. Yapılan rutin çalışmaların yanında, 16S rDNA dizin analizi, API20E ve Phoenix 1000A sistemlerinin analiz sonuçlarının da bu tanıyı desteklemesi, 1 numaralı izolatın *Acinetobacter calcoaceticus* olduğunu göstermektedir (Tablo 12).

Yapılan literatür çalışması sonucunda *Acinetobacter calcoaceticus*'un daha önce yine böceklerden izole edildiği tespit edildi. Ancak mikrobiyal mücadelede kullanımı ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanılmadı (Sramova vd. 1992).

Tablo 12. 1 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , %99	<i>Acinetobacter</i> spp., %100	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , %99
<i>Acinetobacter baumannii</i> , %99		
<i>Glacial ice bacterium</i> , %99		
<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i> , %98		
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> , %97		

2 numaralı izolatın fakültatif anaerobik, gram (-), oksidaz üretmeyen basil formda bakteriler olduğu için *Enterobacteriaceae* familyasına ait olduğu tespit edildi. Oluşturduğu kolonilerin oldukça düzgün ve renginin beyaz olması, MK (+) ve VP (+) oldukları için *Enterobacter* cinsine dahil olduklarına karar verildi. Bu cinsin içerdiği üyeler arasında bir karşılaştırma yapıldığında ise; lisin dekarboksilaz üretebildikleri için *E. agglomerans* olmadığı, sorbitolu fermente edebildiği için *E. gergoviae* olmadığı, üreaz üretmediği içinde *E. aerogenes* olduğuna karar verildi. *Klebsiella pneumonia* ve *Enterobacter aerogenes* birbirleriyle çok sık karıştırılan iki türdür (Sneath, 1986). Bu iki türü sahip oldukları hareket özelliklerine bakarak ayırt edebilmek mümkündür.

Tablo 13. 2 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Enterobacter aerogenes</i> , %99	<i>Enterobacter aerogenes</i> , %78	<i>Klebsiella oxytoca</i> , %99
<i>Gamma proteobacterium</i> , %98		
<i>Pantoea agglomerans</i> , %98		
<i>Klebsiella pneumonia</i> , %98		
<i>Citrobacter freundii</i> , %98		
<i>Klebsiella trevisanii</i> , %98		
<i>Klebsiella planticola</i> , %98		
<i>Klebsiella oxytoca</i> , %98		

Tablo 13 deki veriler karşılaştırıldığında ve hareketli olması göz önünde bulundurulduğunda 2 numaralı izolatın *Enterobacter aerogenes* olduğu saptanmıştır.

*Enterobacter aerogenes*'in daha önce mikrobiyal mücadelede kullanılmasıyla ilgili bazı çalışmalar mevcuttur. Böceklere karşı dayanıklı transgenik bitki oluşturulması ile ilgili yapılan bir çalışmada *Bacillus thuringiensis*'ten izole edilen toksinlerle *Proteus*

*vulgaris* ve *Enterobacter aerogenes* muamele edilmiş ve sonra bu bakterilere yapışan toksinlerin halen aktif oldukları belirlenmiştir (Koskella ve Stotzky, 1997; Groot ve Dicke, 2002).

3 numaralı izolatin aerobik, gram (-), spor oluşturmeyen bakteriler olduğu için *Pseudomonaceae* familyasından olduğu belirlenmiştir. Hareketli, basil formda, oksidaz ve katalaz üretebildiği, nitrata indirgeyebildiği, arginin dehidrolaz üretebildiği, ornitin ve lizin dekarboksilaz üretemediği, 40°C'de üreyemediği için *P. mendocina* hariç bütün türler değerlendirme dışı bırakıldı. Ancak jelatini parçalayabildiği için bu türde olamayacağı kanaatine varıldı.

Yapılan çalışmalar sonucunda morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri göz önünde tutularak bu izolatin *Pseudomonas* cinsine dahil olduğu kanaatine varıldı. 16S rDNA dizin analizi, API20E ve Phoenix 1000A sistemlerinin analiz sonuçlarına bakıldığında API20E'nin verdiği sonucun *Pseudomonas* cinsine ait bir tür olmadığı görülmektedir. Bunun sebebi ise 3 numaralı izolatin API20E ortamında yavaş büyümesi nedeniyle metabolizmasını tam yansıtamamasının bir sonucu olarak yorumlanabilir (Tablo 14). Bu nedenlerden dolayı 3 numaralı izolatin cins seviyesinde bırakılmasına yani *Pseudomonas* sp. olduğuna karar verildi.

Tablo 14. 3 numaralı izolatin sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Pseudomonas</i> sp., %99	<i>Chromobacterium violaceum</i> %98	<i>Pseudomonas oryzaehabitans</i> %95
<i>Pseudomonas orientalis</i> , %99		
<i>Pseudomonas veronii</i> , %99		
<i>Pseudomonas marginalis</i> , %99		
<i>Pseudomonas antarctica</i> , %99		
<i>Pseudomonas trivialis</i> , %99		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , %98		
<i>Pseudomonas meridiana</i> , %99		
<i>Pseudomonas poae</i> , %98		

4 numaralı izolatin gram (-), spor üretmeyen, hareketsiz, katalaz ve oksidaz üretebilen, aerobik ve basil formda bakteriler olduğu belirlendi. Oksidaz üretebilmeleri ile *Acinetobacter*'lerden, glukozu fermente edemeyişleri ile *Enterobacter* ve *Pasteurellaceae* üyelerinden ayrılan bu izolatin, *Flavobacter* cinsine ait olduğuna karar verildi. Ayrıca bu

bakterinin nitratı indirgeyebildiği; sitratı ve mannitolu kullanamadığı; nutrient agar üzerinde oluşturduğu kolonilerin koyu sarı renkli olduğu ve kolonilerinin oldukça yavaş geliştiği tespit edildi. Beta galaktosidaz üretebilmeleri ve üreyi parçalayamamaları ile *Flavobacter* türleri arasında *F. meningosepticuma* benzemesine rağmen indol üretememesi ve glukozu fermente edememesi ise bu tür olmadığını göstermektedir.

Tüm bu sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde bu izolatın tür seviyesinde karakterizasyonunda 16S rDNA dizin analizi, API20E ve Phoenix 1000A test sistemlerinin de yetersiz kaldığı bunlarında sadece cins seviyesinde güvenilir sonuçlar verdiği görülmektedir (Tablo 15). Bu nedenle bu izolatın cins seviyesinde bırakılmasına karar verildi.

Tablo 15. 4 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Flavobacterium</i> sp. (96%) <i>Flavobacterium columnare</i> (95%)	<i>Pseudomonas cepacia</i> %82	<i>Flavobacterium brevis</i> , %95

5 numaralı izolat gram (+), spor üretmeyen, hareketli, basil formda bakterilerden oluşmaktadır. Nutrient agar üzerinde oluşturduğu kolonilerin açık sarı renkli oldukları belirlenmiştir. Hareketli oldukları için *Brevibacterium*, *Renibacterium*, *Caseobacter* ve *Corynebacterium*'lardan ayrılırlar. Ayrıca bu bakterinin aerobik oluşu, katalaz enzimi üretirken oksidaz enzimi üretmediği; nitratı indirgeyemediği; jelatini ve üreyi hidroliz edemediği; pH 10'da üreyebildiği; sukroz, ramnoz ve arabinozu fermente edebildiği için *Microbacterium* cinsine dahil olduğu belirlendi. Sarı renkli olması ve arabinozu fermente edememesi ile diğer *Microbacterium* türlerinden ayrılarak *Microbacterium foliorum* olabileceği düşünülmektedir (Funke, 1998). Ancak yinede yapılan çalışmalarda kullanılan testlerin Gram (-) bakteriler için özelleşmiş ortamlar olması bu izolatın cins seviyesinde bırakılması gerektiğini düşündürmüştür.

*Microbacterium foliorum* Funke (1998) tarafından yapılan bir çalışma ile literatüre kazandırılmıştır. Bu çalışmada 16S rDNA dizin analizi kullanılmış ve bu dizin analizi sonuçları bazı biyokimyasal testlerle desteklenerek ve *M. foliorum* yeni bir tür olarak belirlenmiştir.

Tablo 16’de dikkat çekici olarak API20E ve Phoenix 1000A test sisteminin sonuçları 16S rDNA dizin analizi sonuçları ile uyum sağlamamaktadır. Bu iki sistemin sonuçlarının gram (-) bakteriler, izolatomuzun ise gram (+) bakteriler olması bu sonuçların değerlendirme dışında tutulmasını gerektirir.

Tablo 16. 5 numaralı izolatin sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Microbacterium</i> sp., %99	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> %92	<i>Burkholderia gladioli</i> , %99
<i>Microbacterium foliorum</i> , %99		
<i>Microbacterium paraoxydans</i> , %98		
<i>Microbacterium oxydans</i> , %98		
<i>A. liquefaciens</i> , %98		
<i>Microbacterium luteolum</i> , %98		

6 numaralı izolatin gram (-), spor üretmeyen, fakültatif anaerobik, hareketli, basil formda bakteriler olduğu belirlendi. Bu özellikleri ile birlikte glukozu fermente edip gaz üretebildikleri dikkate alındığında bu izolatin *Enterobacter* cinsine ait olduğu görülmektedir. Bu cins içerisinde ise sorbitolu fermente edememesi, MK (-) olması, nutrient agar üzerinde oluşturduğu kolonilerin sarı renkli olması bu izolatin *E. cloaceae* olamayacağını göstermektedir. İndol ve VP değişken olması, H<sub>2</sub>S üretmemesi, üreyi parçalayamaması ve lizin dekarboksilaz sentezlememesi ise bu izolatin *Enterobacter agglomerans* olduğunu göstermektedir. 16S rDNA dizin analizi, API20E ve Phoenix 1000A sistemlerinin analiz sonuçları da (Tablo 17) bu tanıyı desteklemektedir. Yapılan literatür çalışması sonucunda elde edilen veriler ise sonuçların güvenilirliğini desteklenmiştir (Gavini vd., 1989; Egbert vd., 2001).

Tablo 17. 6 numaralı izolatin sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Enterobacter agglomerans</i> , %99	<i>Enterobacter agglomerans</i> , %85	<i>Enterobacter agglomerans</i> , %99
<i>Pantoea agglomerans</i> , %99		
<i>Pantoea ananatis strain</i> , %98		
<i>Erwinia herbicola</i> , %99		
<i>Erwinia uredovora</i>		



7 numaralı izolatin gram (-), aerobik, spor üretmeyen, hareketli, basil formda bakteriler olduğu belirlendi. Bu özelliklerinin yanı sıra nutrient agar üzerinde oluşturdukları kolonilerin sarı renkli olması ve 37°C'de üreyememesi Tablo 18.'de gösterilen API20E sonucunun geçersiz olduğunu kanıtlamaktadır. Zorunlu aerobik olması, nitratı indirgeyememesi, katalaz üretebilmesi, ramnozu kullanabilirken sorbitolu kullanamaması ve katı besiyerinde oluşturdukları kolonilerin mukoid yapıda olması izolatin *X. campestris* ve *X. fragariae* olabileceğini göstermektedir. Bu iki tür karşılaştırıldığında ise %5'lik NaCl'de büyüebilmesi nedeni ile bu türün *X. campestris* olabileceği düşünüldü ancak glukoz, arabinoz ve sukroz gibi birçok şekeri fermente edememesi bu türde olamayacağını düşündürmektedir (Sneath, 1986).

Tablo 18. 7 numaralı izolatin sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Xanthomonas campestris</i> , %99	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> , %92	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> , %90
<i>Xanthomonas cynarae</i> , %99		
<i>Xanthomonas axonopodis</i> , %99		
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> , %99		
<i>Xanthomonas oryzae</i> , %99		
<i>Xanthomonas gardneri</i> , %99		
<i>Xanthomonas axonopodis</i> , %99		
<i>Pseudomonas cissicola</i> , %99		

Tablo 18.'de yer alan panel test sistemlerinin 7 nolu izolat için verdiği sonuçların güvenilirlik yüzdelerinin düşük olması, 16S rDNA dizin analizi yönteminin ise daha sağlıklı sonuç vermesi dikkat çekmektedir. Bu bilgiler ışığında değerlendirme yapıldığında bu izolatin cins seviyesinde bırakılması uygun görüldü ve *Xanthomonas* sp. olduğuna karar verildi.

8 numaralı izolatin gram (-), spor üretmeyen, aerobik, basil formda bakteriler olduğu belirlendi. Bu bilgilerin yanı sıra hareketli olduğu ve katalaz üretebildiği *Pseudomonaceae* familyasından olduğunu göstermektedir. Arginin dihidrolaz üretememesi, oksidaz üretememesi, 41°C'de büyüememesi, nitratı indirgeyememesi ve jelatini hidroliz ederken nişastayı kullanamaması bu izolatin *Pseudomonas syringae* olabileceğini düşündürmektedir.

Tablo 19'e bakıldığında Phoenix 1000A hariç diğer analiz yöntemlerinin bu türün *Pseudomonas* cinsine ait olduğunu açık bir şekilde göstermektedir. Bu izolatın *Pseudomonas syringae* olup olamayacağı söz konusu olduğunda *Pseudomonas syringae*'nin bitki patojeni bir tür olması ve *Oberea linearis* larvalarının bitkiyle çok yakın bir ilişki içinde olmalarının bir sonucu olabileceği düşünülerek bu tür olabileceğini desteklemektedir (Sneath, 1986). Ancak tür tayininde sadece 16S rDNA dizin analizinin sonucu kesinlik sağlayamayacağından bu izolatın *Pseudomonas* sp. olarak bırakılmasına karar verildi..

Tablo 19. 8 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Pseudomonas syringae</i> , %99	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> , %74	CDC Group EF-4b
<i>Pseudomonas tremae</i> , %99		
<i>Pseudomonas congelans</i> , %99		
<i>Pseudomonas meliae</i> , %99		
<i>Pseudomonas cannabina</i> , %99		
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> , %98		
<i>Pseudomonas borealis</i> , %98		
<i>Pseudomonas mandelii</i> , %98		

Yine yapılan birçok çalışmada *Pseudomonas syringae* bir bitki patojeni olarak bulunmuş ve bu türden izole edilen bitki patojeni proteinlerin insektisidal aktivitesi olan diğer proteinlere yapısal olarak benzediği bulunmuştur (Shan Fu vd., 2005; Dongjin vd., 2004; Nicholas vd., 2003).

API20E'nin veritabanında *Pseudomonas syringae*'nin olmayışı bunun yerine başka sonuç vermesinin ve verdiği sonucunda yine *Pseudomonas* cinsine ait bir tür olması elde ettiğimiz verilerle zıtlık oluşturmamaktadır. Bu izolat Phoenix 1000A sisteminde sağlıklı olarak büyüyemediği için buradan herhangi bir sonuç elde edilememiştir.

9 numaralı izolatın gram (-), merkezi spor üreten, aerobik, hareketli, basil formda bakteriler olduğu, oksidaz ve katalaz üretebilmesi bu izolatın *Pseudomonas* cinsine ait olduğunu göstermektedir. 40°C'de büyüyememesi, jelatini ve nişastayı parçalayamaması, arginin dihidrolaz üretebilmesi, arabinoz fermentleyebilmesi sayesinde bu izolatın diğer türlerden ayrılarak *Pseudomonas putida* olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca diğer sistemlerle yapılan testlerin elde edilen bu veriyi desteklediği açıkça görülmektedir (Tablo 20). Tablo 20’de API20E’nin bu izolatın iki tür olabileceği yönünde bir değerlendirme yaptığı görülmektedir. Ancak izolatın krem renkli olması bu iki türden *Pseudomonas fluorescens*’in değil *Pseudomonas putida*’nın değerlendirmeye alınması gerektiğinin açıkça bir göstergesidir.

Tablo 20. 9 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Pseudomonas putida</i> , %99	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> , %98	<i>Pseudomonas putida</i> , %90
<i>Pseudomonas sp.</i> , %99		
<i>Pseudomonas gingeri</i> , %98		
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> , %98		
<i>Flavimonas oryzihabitans</i> , %98		

10 numaralı izolatın yapılan çalışmalar sonucunda fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin tümünün 12 numaralı izolatla aynı olduğu gözlemlendi. Aralarındaki tek farkın morfolojik bir farklılık olan koloni renklerinin olduğu belirlendi. 16S rDNA dizin analizi, API20E ve Phoenix 1000A sistemlerinin analiz sonuçlarının dahi bu iki izolat için tamamıyla aynı olması bu iki izolatın birbirlerine çok yakın iki tür olduğunu göstermektedir (Tablo 21, Tablo 22). Sadece aralarındaki renk farklılığı yüzünden 10 numaralı izolatın 12 numaralı izolattan farklı bir alttür olduğu düşünülmektedir. Bütün bu verilere dayanılarak bu iki izolatın *Stenotrophomonas* cinsine dahil olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 21. 10 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , %99	<i>Xanthomonas maltophilia</i> , %100	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , %99
<i>Stenotrophomonas sp.</i> , %99		
<i>Gamma proteobacterium</i> , %99		
<i>Pseudomonas hibiscicola</i> , %98		
<i>Pseudomonas geniculata</i> , %98		

Tablo 22. 12 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , %99	<i>Xanthomonas maltophilia</i> , %100	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , %99
<i>Stenotrophomonas</i> sp., %99		
<i>Gamma proteobacterium</i> , %99		
<i>Pseudomonas hibiscicola</i> , %98		
<i>Pseudomonas geniculata</i> , %98		

Bu iki izolat gram (-), spor oluşturmeyen, hareketli, aerobik ve basil olmaları lizin dekarboksilaz üretememesi, sitratı kullanabilmesi ve oksidaz üretememesi nedeniyle *Stenotrophomonas* cinsine dahil edilir. Aralarındaki tek ayırt edici özellik olan nutrient agar üzerinde oluşturdıkları renklerin farklılığı sadece birinin tür tayininin yapılabilmesini sağlamıştır. Bu izolatlardan sarı renkli olan 12 numaralı izolatın *Stenotrophomonas maltophilia* olduğuna karar verildi. Diğer izolatın ise cins seviyesinde bırakılmasının daha uygun olacağı kanaatine varıldı.

Tablolardan da anlaşılacağı üzere bu iki izolat sadece morfolojik bir farklılık olan koloni rengi bakımından ayırt edilebilmiştir. Burada elde API20E ve Phoenix 1000A sistemlerinin elde ettiği sonuçlar birbirinde farklı değildir her iki tür ismide birbirinin sinonimidir.

*Stenotrophomonas maltophilia* en fazla izole edilen ikinci *Pseudomonas* türüdür (Sneath, 1986). Ayrıca bu türün daha önce gerçekleştirilen mikrobiyal mücadele çalışmalarında kullanılmış olduğu bilinmektedir (Wivat vd., 1996). Wivat ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bu türün kitinaz geni *Bacillus thuringiensis*'lere aktararak bu türün patojenitesi artırılmıştır. Ayrıca yapılan bir çalışmada yine böcek larvaları çeşitli kimyasallarla muamele edildikten sonra elde edilen bakteriyal izolatlarda *Stenotrophomonas maltophilia* tespit edilebilmiştir (Bell vd., 1981).

11 numaralı izolatın gram (-), spor üretmeyen, fakültatif anaerobik, hareketli, basil formda olduğu için *Enterobacter* cinsine dahil olduğuna karar verildi. Nitrat ve nitriti indirgeyebilmesi açısından *Erwinia* ve *Yersinia* cinslerine ait olmadıkları tespit edildi. Tür seviyesinde ise üreyi parçalayamaması bakımından *E. gergoviae*'den lizin dekarboksilaz üretememesi ile *E. aerogenes*'den ariginin dihidrolaz üretebilmesi ve kolonilerin sarı renkli olması sayesinde *E. agglomerans*'tan ayrılarak tür olarak *Enterobacter cancerogenus* olarak tespit edildi (Sneath, 1986).

Sonuçların tümü karşılaştırıldığında iki tür ön plana çıkmaktadır. Bunlardan biri *Enterobacter cloacae* diğeri ise *Enterobacter cancerogenus*'dur. Ancak yapılan incelemelerde izolatomuzun ornitin dekarboksilaz üretememesi ile *Enterobacter cloacae* olamayacağına karar verildi. Test sistemlerinin ve 16S DNA dizin analizinin sonuçlarına bakıldığında ise durum farklılık arz etmektedir (Tablo 23). Bunun nedeni ise *Enterobacter cancerogenus*'un yeni bir tür olması nedeni ile bu test sistemlerinin veritabanında yer almamasıdır.

Tablo 23. 11 numaralı izolatin sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Enterobacter cancerogenus</i> , %99	<i>Enterobacter cloacae</i> , % 89	<i>Enterobacter cloacae</i> , %99
<i>Enterobacter aerogenes</i> , %99		
<i>Enterobacter cloacae</i> , %99		
<i>Klebsiella oxytoca</i> , %99		
<i>Pantoea agglomerans</i> , %98		
<i>Morganella morganii</i> , %98		
<i>Gamma proteobacterium</i> , %98		
<i>Enterobacter ludwigii</i> , %98		

13 numaralı izolatin gram (-), fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen, hareketli, basil formda, güçlü bir katalaz aktivitesine sahip ve kırmızı renkte koloni oluşturan bakteriler olduğu için *Serretia* cinsine dahil olduğuna karar verildi. *Serretia* cinsi VP (+) olması ve glukozun fermantasyonu ile diğer *Enterobacter*'lerden ayrılır. Tür seviyesinde ise arabinozun sentezlenememesi ile diğerlerinden ayrılarak *Serretia marcescens* olduğunu düşündürmüştür. Rutin çalışmaların ve panel test sistemlerinin bu izolat için %99 seviyesinde *Serretia marcescens* olduğunu söylemesine karşın lisin dekarboksilaz sentezlememesi bu izolatin *Serretia marcescens* olabileceği hakkında şüpheler oluşturmaktadır. Buna karşın bu özelliğin plazmit kaynaklı olabileceği ele alınırsa yapılan tür tayini doğru olabilir.

Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda ve bu izolatin kitinaz aktivitesinin de tespit edilmiş olduğu düşünüldüğünde, elimizdeki izolatin *Serretia marcescens*'in bir alttürü olduğu kanaatine varıldı.

Tablo 24. 16 numaralı izolatın sonuçlarının karşılaştırılması

16S rDNA	API20E	Phoenix 1000A
<i>Pantoea agglomerans</i> , %98	<i>Serratia marcescens</i> , %98	<i>Serratia marcescens</i> , %99
<i>Pantoea ananatis</i> , %98		
<i>Enterobacter agglomerans</i> , %98		
<i>Erwinia herbicola</i> , %98		
<i>Serratia marcescens</i> , %97		

*Serratia* genusu içerisinde yer alan türler böceklerde oldukça yaygındır. Bu genusta yer alan *S. marcescens*, *S. entomophila*, *S. proteamaculans*, *S. liquefaciens*, *S. rubidea* ve *S. fonticola* daha önce yapılan bir çok çalışmada böceklerden izole edilmiştir. (Lepesme, 1937; Steinhaus, 1951, 1959; Steinhaus ve Marsh, 1962; Bucher, 1963; McLaughlin ve Keller, 1964; Bell, 1969; Lipa ve Wiland, 1972; Sikorowski, 1985; Krieg, 1987; O'Callaghan ve Jackson, 1993; Martinez vd., 1994; Klein ve Kaya, 1995; Sikorowski ve Lawrence, 1998; Sezen ve Demirbağ, 1999; Jackson vd., 2001; Kuzina vd., 2001; Osborn vd., 2002; Jeyaprakash vd., 2003)

*Oberea linearis* ülkemiz fındık tarlalarında çok ciddi zararlara yol açmaktadır. Bu böceğin kontrolü için mekanik ve kimyasal mücadele uygulanmasına rağmen zararlının larvasının yaşadığı ortamın dış etkenlerden oldukça bağımsız olması nedeni ile bu zararlı ile mücadelede tatmin edici bir sonuç henüz elde edilememiştir (URL-4, 2005).

Elde edilen bu izolatlardan 16 numaralı izolatın *Oberea linearis*'e karşı % 65 öldürücü etkiye sahip olduğu bulunmuş ve böylece *Oberea linearis*'e karşı biyolojik kontrol ajanı olabilecek bir bakteriyel izolat tespit edilmiştir.

Zararlı böceklerin patojenleri çalışılırken bakteriler arasındaki zorunlu simbiyotik ilişkilerde büyük önem taşımaktadır (Baerwald vd., 1968; Helmuth, 1956; Rubio vd., 1966; Hagen, 1996). Böcek ve patojenleri arasındaki ilişki göz önüne alındığında patojenitenin çoğunlukla bağırsaklarda başladığı dikkat çekicidir (Autori, 1941; Kemarrec vd., 1986). Zararlı böceklerin biyolojik kontrolünde bu organizmaların kullanılmaları birçok güncel bilimsel araştırma için potansiyel oluşturmuş durumdadır (Haiwen vd., 2005). Simbiyotik bakteriler genetik olarak transform edilerek zararlının bağırsağında patojeniteyi oluşturacak olan proteinleri üretmesi sağlanabilir. Birçok böcek türü bireysel yada populasyon seviyesinde bakterilerle çok sayıda ilişkiye sahiptir (Bour saux-Eude ve Gross, 2000).



Simbiyotik bakterilerin bu kadar önemli olmalarından dolayı bütün bakteriyel floranın tespit edilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle bu zararlıya karşı bir mikrobiyal ajan geliştirmek amacıyla yapılan bu çalışmada sadece hasta veya ölü larvalardan alınan izolatlarla yetinilmemiş, sağlıklı bireylerin mikrobiyal florasıda çalışmaya dahil edilmiştir. Bunun nedeni araştırıldığında, bu bioassay çalışmasında kullanılan larvaların hepsinin son instar aşamasına gelen larvalar olduğu ve bu larvaların genç bireylere göre oldukça dayanıklı olabileceği sonucuna varıldı.



## 5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda ülkemiz fındık tarlalarında ciddi zararlara yol açan *Oberea linearis*'in bakteriyal florası, ve mikrobiyal kontrolleri hakkında bilgiler elde edildi. Ayrıca biyolojisi ve yaşama ortamları ile ilgili bilgiler tespit edildi.

1) Larvaların yaşama ortamları ile ilgili bazı özellikler tespit edildi. Larvaların nadirde olsa fındık ocaklarının her yerinde rastlanılmasına karşın daha çok fındık ocaklarının doğu kısımlarındaki oldukça sağlıklı ve diri olan bir yıllık fındık fidelerini tercih ettikleri tespit edildi.

2) Erginlerin yumurta bırakacakları fındık fidelerini özenle seçtikleri ve bu fidelerdeki yaprak saplarının hemen alt kısımlarına yumurta koydukları tespit edildi.

3) Ölü ve sağlıklı larvalardan 13 farklı bakteri izole edildi. İzole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve bazı moleküler özellikleri tespit edildi.

4) Yapılan tanı sonucu, izole edilen bakterilerin 7'si tür seviyesinde, 6'sı ise cins seviyesinde tanımlandı. Tanımlanan bakteriler *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas* sp., *Enterobacter cancerogenus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens* olarak tespit edildi.

5) İzole edilen bu bakterilerin *Oberea linearis* larvaları üzerine olan insektisidal etkilerinin belirlenmesi için farklı zamanlarda bioassaylar gerçekleştirildi. Bu uygulama sonucu elde edilen izolatlardan *Serratia marcescens*'in %65 patojenik bir etkiye sahip olduğu belirlendi.

7) Coleopteralar üzerinde öldürücü etkiye sahip olduğu bilinen *Bacillus thuringiensis* ve *Serratia marcescens* izolatlarının *Oberea linearis* üzerinde patojen etkisi araştırıldı. Bu izolatların *Oberea linearis* larvaları üzerinde de yüksek öldürücü etkiye sahip oldukları belirlendi.

## 6. ÖNERİLER

Bu çalışmada *Oberea linearis*'ten 13 farklı bakteri izole edilmiş ve *Oberea linearis* üzerinde insektisidal etkileri araştırılmıştır. Elde edilen izolatların başka zararlılar üzerinde de insektisidal etkilerinin araştırılması gerekmektedir.

İnsektisidal aktivite testleri yapılırken zararlı böcek larvalarına sadece tek bir izolat uygulanmıştır. Bu insektisidal aktiviteyi oluşturan kitinaz proteini saflaştırılarak farklı bakterilerden elde edilecek insektisidal proteinlerle birlikte etkisi araştırılabilir. Bu yöntem saflaştırılmış protein seviyesinde uygulanabileceği gibi bakterilerin kendilerinde birlikte etkileri incelenebilir.

Bu çalışmayla elde edilen *Serretia marcescens* izolatının insektisidal aktivitesinin sahip olduğu kitinaz aktivitesinden kaynaklandığı bilinmektedir.

*Serretia marcescens*'in sentezlediği kitinaz geni uygun primerlerle çoğaltılıp mevcut olan diğer kitinazlarla karşılaştırması yapılabilir. Yine bu genin bir ekspresyon vektörüne klonlanıp fazla miktarda ekspresyonu sağlandıktan sonra kitinazın saflaştırılarak protein immobilizasyonu ile aktivitesini koruyabileceği bir şekilde uzun süreli depolanması araştırılabilir. Böylece elde edilen ürün bakterinin kendisi olmadan tarım alanlarında zararlılarla mücadelede rahatlıkla uygulanabilir hale gelecektir.

Elde edilen insektisidal aktiviteye sahip bu izolatın daha ileri moleküler metotlarla, alltür olabilme ihtimali araştırılmalıdır.

Yapılan bu çalışmanın sonuçları ve kullanılan metodlar açısından ileride yapılması düşünülen benzer çalışmalara örnek olacağı kanaatindeyim.

## 7. KAYNAKLAR

- Abbott, W. S., 1925. A Method of Computing of Effectiveness of on Insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265–267.
- Ananda, K. P., Sharma, R. P. ve Malik, V. S., 1996. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*, Adv. Appl. Microbiol., 42, 1-43.
- Arif, B. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, Kurstak, E. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., 179, New York, USA.
- Autuori, M., 1941. Contribuicao para o conhecimento da sauva (*Atta spp.*). I. Evolucao do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908), Arq. Inst. Biol., 12, 197–228.
- Ayfer, M., The Hazelnut Culture in Turkey, Atti del Convegno in ternazionale sul Nocciuolo, Avellino, Italy, (1983) 19-27.
- Baerwald, R. J., Boush, G. M., 1968. Demonstration of the bacterial symbiote *Pseudomonas melophthora* in the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*, by fluorescent-antibody techniques. J. Invertebrat Pathol., 11, 251–259.
- Bell, E., James, V., King, G. ve Robert, J., 1981. Some microbial contaminants and control agents in a diet and larvae of *Heliothis* spp., Bioenvironmental Insect Control Laboratory, Science and Education Administration, U.S. Department of Agriculture, Stoneville.
- Bell, J. V., 1969. *Serratia marcescens* Found in Eggs of *Heliothis zea*: Tests Against *Trichoplusia ni.*, J. Invertebr. Pathol., 13, 151-152.
- Ben-Dov, E., Boussiba, S. ve Zaritsky, A., 1995. Mosquito Larvicidal Activity of *Escherichia coli* with Combinations of Genes from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*, J. Bacteriol., 2581-2587.
- Benson, H. J., 1985. Microbiological Applications, a Laboratory Manuel in General Microbiology, Brock, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.
- Bernard, R. G., ve Jack J. P., Molecular Biotechnology - Principles and Applications of Recombinant DNA, Baskı: 3, Amer Society for Microbiology, New York, 2003.
- Black, R. ve Sweetmore, A., 1994. Appropriate Bacterial Identification Systems for Small Plant Pathology Laboratories Overseas Incorporating the Biolog Method, Plant Pathol., 43, 438-441.
- Boursaux-Eude, C., ve Gross, R., 2000. New insights into symbiotic associations between ants and bacteria, Res. Microbiol., 151, 513–519.

- Braxton, S. M., Onstad, D. W., Dockter, D. E., Giordano, R., Larsson, R. ve Humber, R. A., 2003. Description and Analysis of two Internet-Based Databases of Insect Pathogens: EWDIP and VIDIL, J. Invertebr. Pathol., 83, 185-195.
- Brooks, W. M., 1988. Entomogenous Protozoa, In "Handbook of Natural Pesticides", Vol. V: "Microbial Insecticides, Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi" (Ignoffo, C. M. ve Mandava, E. D., Eds.), 1-149, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bucher, G. E. ve Stephens, J. M., 1957. A Disease of Grasshoppers Caused by the Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, Can. J. Microbiol., 7, 641-655.
- Burges, H. D. (Ed.), 1981. Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980, Academic Press, London.
- Cappuccino, J. G. ve Sherman, N., 1992. Microbiology, a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Fewitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. ve Dean, D. H., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 807-813.
- Çanakçioğlu, H., 1989. Orman Entomolojisi, Genel Bölüm, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
- Demir, İ., Ertürk, Ö., Nalçacıoğlu, R. ve Demirbağ, Z., 2000. Insecticidal effects of some biological agents on the *Gypsonema dealbana* (Lepidoptera) and *Hyphantria cunea* (Lepidoptera), Pakistan Journal of Biological Sciences, 3/4, 552-554.
- Demir, İ., Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2002. The First Study on Bacterial Flora and Biological Control Agent of *Anoplus roboris* (Coleoptera: Curculionidae), The J. Microbiol., 40, 104-108.
- Demirbağ, Z. ve Beldüz, A. O., 1997. Baculovirüs'ün Biyolojik Mücadeledeki Önemi, Kükem Dergisi, 20, 1, 49-58.
- Dongjin, J., Youngkeun, Y., Ga-Hwa, K., Yong-Hwa, C., Pankyung, K., Nam-In, B., ve Yonggyun, K., 2004. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria, Microbiology Letters, 239, 241-248.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, 27, Samsun.
- Egbert, J., Johannes, A., Breeuwer, J., Jacobs, G. ve Mollemat, C., 2001. The Association of Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis*, with a near *Erwinia* Species Gut Bacteria: Transient or Permanent, Journ. of Inv. Path., 77, 120-128.
- Erdem, R. ve Çanakçioğlu, H., Orman Entomolojisi, Fakülteler Matbaası, İstanbul, VIII., 1970.

- Evans, H. F., 1986. Ecology and Epizootiology of Baculoviruses, In "The Biology of Baculoviruses, Vol 2, Practical Application for Insect Control" (Granados, R. R. ve Federici, B. A., Eds.), 89-132, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ferre, J., Real, M. D., Van Rie, J. Jansens, S. ve Peferoen, M., 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 5119-5123.
- Funke, L., Behrendt, U., Ulrich, A. ve Schumann, P., 1998. Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens*, Int. J. of Syst. and Ev. Microbio., 51, 1267-1276.
- Gamo, M. ve Shoji, T., 1999. A Method of Profiling Microbial Communities Based on a Most-Probable-Number Assay that Uses Biolog Plates and Multiple Sole Carbon Sources, Appl. Environ. Microbiol., 65, 4419-4424.
- Gaugler, R., 1997. Alternative Paradigms for Commercializing Biopesticides, Phytoparasitica, 25, 179-182.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., ve De, L. J., 1989 Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 39, 337-345.
- Gelernter, W., ve Schwab, G. E., 1993. *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. (Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., ve Higgs, S., (ed.), John Wiley & Sons.), 89-104, Chichester, United Kingdom.
- Georgis, R., 1997. Commercial Prospects of Microbial Insecticides in Agriculture, In "Microbial Insecticides: Novelty or Necessity?" (Evans, H. F., Chair), Proc. Br. Crop. Prot. Council Symp., 68, 243-252.
- Goodfellow, O'Donnell, A. G., 1993. Root of Bacterial Systematics. Handbook of New Bacterial Systematics, Goodfellow, M., O'Donnell, A. G., Eds., Academic Press Ltd., London.
- Granados, R. R. ve Federici, B. A., 1986. The Biology of Baculoviruses, Vol.2, Practical Applications for Insect Control, Boca Raton, FL.
- Gray, M. W., Sankoff, D., Cedergren, R. J., 1984. On the Evolutionary Descent of Organisms and Organelles: A global Phlogeny Based on a Highly Conserved Structural Core in Small Subunit Ribosomal RNA, Nuc. Acids Res., 12, 5837-5852.
- Grootth, A. T. ve Dicke, M., 2002. Insect-resistant transgenic plants in a multi-trophic context The Plant Journal., 31, 387.



- Gröner, A., 1986. Specificity and Safety of Baculoviruses, In "The Biology of Baculoviruses, Vol.2, Practical Applications for Insect Control" (Granados, R. R. ve Federici, B. A., Eds.), 177-202. Boca Raton, FL.
- Hagen, K. S., 1966. Dependence of the olive fruit fly, *Dacus oleae*, larvae on symbiosis with *Pseudomonas savastanoi* for the utilization of olive. Nature, 209, 423–425.
- Haiwen, Li., Freder, M., S., Bradleigh, V., ve Craig, J., 2005. Coates Isolation, characterization, and molecular identification of bacteria from the red imported fire ant (*Solenopsis invicta*) midgut, Journal of Invertebrate Pathology., 89, 203-209.
- Hajek, A. E. ve Leper, R. J., 1994. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts, Ann. Rev. Entomol., 39, 293-322.
- Hajek, A. E., 1997. Ecology of Terrestrial Fungal Entomopathogens, In "Advanced in Microbial Ecology" (Jones, J. H., Ed.), 15, 193-249, Plenum Press, New York.
- Halda-Alija, L., 2004. Incidence of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* species in freshwater wetlands, Letters in Applied Microbiology, 39, 445-450.
- Hamm, J. J., 1984. Invertebrate Pathology and Biological Control, Journal of Georgia Entomol. Soc., 19, 3, Second Supplement, 6-13.
- Harger, J. D., 1987. Applied Epizootiology: Microbial Control of Insects, In "Epizootiology of Insect Diseases" (Fuxa, J. R. ve Tanada, Y., Eds.), 473-496, Wiley, New York.
- Held, G. A., Bulla, L. A., Ferrari, E., Hoch, J., Aronson, A. I., ve Minnich, S. A., 1982. Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, Proc. Nntl. Acad. Sci. USA., 79, 6065-6069.
- Helmuth, H., 1956. Untersuchungen zur Bakteriensymbiose der Trypetiden (Diptera), Z Morphol Oekol Tiere., 44, 483–517.
- Hoffman, M. P. ve Frodsham, A. C., 1993. Naturel Enemies of Vegetable Insect Pests, Cooperative Extension, 63, Cornell University, Ithaca.
- Humber, R. A., 1997. Fungi: Identification, In "Manuel of Techniques in Insect Pathology" (Lacey, L. A., Ed.), 153–185, Academic Press, New York.
- Işık, M. ve Dündar, F., Fındık Zararlıları ve Hastalıkları ile Mücadele, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara, 1992.
- Jackson, T. A., Boucias, D. G. ve Thaler, J. O., 2001. Pathobiology of Amber Disease, Caused by *Serratia spp.*, in the New Zeland Grass Grub, *Costelytra zealandica*, J. Invertebr. Pathol., 78, 232-243.

- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A. ve Allsopp, M. H., 2003. Bacterial Diversity in Worker Adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) Assessed Using 16S rRNA Sequences, J. Invert. Pathol., 84, 96-103.
- Kaya, H. K. ve Stock, S. P., 1997. Techniques in Insect Nematology, In "Manuel of Techniques in Insect Pathology" (Lacey, L. A., Ed.), 281-324, Academic Press, London.
- Kaya, H. K., 1976. Insect Pathogens in Natural and Microbial Control of Forest Defoliators, In "Perspectives in Forest Entomology" (Anderson, J. F. ve Kaya, H. K., Eds.), 251-263, Academic Press, New York.
- Kermarrec, A., Febvay G., ve Decharme, M., 1986. Fire Ants and Leaf-cutting Ants, Westview, Boulder, CO 339-355.
- Klein, M. G. ve Kaya H. K., 1995. *Bacillus* and *Serratia* Species for Scarab control, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 90, 87-95.
- Konopka, A., Oliver, L. ve Turco, R. F., 1998. The Use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Enviromental and Ecological Microbiology, Microb. Ecol., 35, 103-115.
- Koskella, J. ve Stotzky, G., 1997. Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. Appl. Environ. Microbiol., 63, 3561-3568.
- Krieg, A., 1987. Diseases Caused by Bacteria and Other Prokaryotes, In "Epizootiology of Insect Diseases" (Fuxa, J. R. ve Tanada, Y., Eds.), 323-355, J. Wiley, New York.
- Kurt, H., 2004. Fındık Üretim ve Pazarlama Aşamasındaki Sorunlar Adlı Seminer. Fındık Araştırma Enstitüsü.
- Kurt, M. A., Doğu Karadeniz Bölgesinde Fındık Zararlıları Tanınmaları, Yayılış ve Zararları, Yaşayışları ve Savaşım Yöntemleri, Tarım ve Orman Bakanlığı, Samsun Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müd., Mesleki Kitaplar Ser., No: 26, 1982.
- Kuzina, L. V., Miller, E. D., Ge, B. ve Miller, T. A., 2002. Transformation of *Enterobacter gergoviae* Isolated from Pink Bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) Gut with *Bacillus thuringiensis* Toxin, Curr. Microbiol., 44, 1-4.
- Kuzina, L. V., Peloquin, J. J., Vacek, D. C. ve Miller, T. A., 2001. Isolation and Identification of Bacteria Associated with Adult Laboratory Mexican Fruit Flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), Curr. Microbiol., 42, 290-294.
- Lacey L. A., 1997. Bacteria: Laboratory Bioassays of Bacteria Against Aquatic Insects with Emphasis on Larvae of Mosquitos and Black Flies, In "Manual of Techniques in Insect Pathology (Lacey, L. A., Ed.), 79-88, Academic Press, New York.

- Lacey, L. A. ve Brooks, W. M., 1997. Initial Handling and Diagnosis of Diseased Insects, In "Manual of Techniques in Insect Pathology" (Lacey, L. A., Ed.), 1-15, Academic Press, New York.
- Lacey, L. A. ve Kaya, H. K. (Eds.), 2000. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evolution of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Lacey, L. A., Fransen, J. J. ve Carruthers, R., 1996. Global Distribution of Naturally Occurring Fungi of *Bemisia*, Their Biologies and Use as Biological Control Agents, In " *Bemisia*, 1995: Taxonomy, Biology, Damage and Management" (Gerling, D. ve Mayer, R., Eds.), 9, 401-433, Intercept, Andover.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K. ve Vail, P., 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?, Biol. Control, 21, 230-248.
- Lampel, J. S., Canter, G. L., Dimock, M. B., Kelly, J. L., Anderson, J. J., Uratani, B. B., Foulke, J. S., ve Turner, J. T., 1994. Integrative cloning, expression, and stability of the *cryIA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. Appl. Environ. Microbiol., 60, 501-508.
- Latge, J. P. ve Papierok, B., 1988. Aphid Pathogens, In "Aphids: Their Biology, Natural Enemies and Control" (Minks, A. K. ve Harrewijn, P., Eds.), Vol. B, 323-335, Elsevier, Amsterdam.
- Lepesme, P., 1937. Sur la Presence du *Bacillus prodigiou*s chez le Criquet Pelerin (*Schistocerca gregaria* Forsk), Bul. Soc. Hist. Aft. N., 28, 406-411.
- Lian, C., Zhao, J., Zhang, Z., Liu, W., 2004. Genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis Mycoses, 47, 495-502.
- Lipa, J. J. ve Wiland, E., 1972. Bacteria Isolated from Cutworms and their Infectivity to *Agrotis sp.*, Acta Microbiologica, Polonica, Series B 4, 127-140.
- Lipa, J. J., 1975. An Outline of Insect Pathology, Warsaw, Poland.
- Liu, J. T., Sui, M. J., Ji, D. D., Wu, I. H., Chou, C. C., ve Chen, C. C., 1993. Protection from ultraviolet radiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Invertebr. Pathol., 62, 131-136.
- Maddox, J. V., 1987. Protozoan Diseases, In "Epizootiology of Insect Diseases" (Fuxa, J. R. ve Tanada, Y., Eds.), 417-452, Wiley, New York.
- Manceau, C. ve Horvais, A., 1997. Assessment of Genetic Diversity Among Strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of rRNA Operons with Special Emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*, Appl. Environ. Microbiol., 63, 498-505.

- Martinez, A. J., Robacker, D. C., Garcia, J. A. ve Esau, K. L., 1994. Laboratory and Field Olfactory Attraction of the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) to Metabolites of Bacterial Species, Florida Entomologist, 77, 1, 117-126.
- McCoy, C. W., Samsun, R. A. ve Boucias, D. G., 1988. Entomogenous Fungi, In "Handbook of Natural Pesticides, Bölüm:5 Microbial Insecticides, Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi", (Ignoffo, C.M. ve Mandava, N.B., Eds.), 151-236, CRC Press, Boca Raton, FL.
- McLaughlin, R. E. ve Keller, J. C., 1964. Antibiotic Control of an Epizootic Caused by *Serratia marcescens* Bizio in the Boll Weevil, *Anthonomus grandis* Boheman, J. Insect Pathol., 6, 481-185.
- Muratoğlu, H., Sezen, K., Katı, H., Nalçacıoğlu, R., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2005. Fındık zararlısı *Xyleborus dispar*'dan izole edilen bakterilerin tanımlanması, XIV. Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir.
- Nicholas, R., Waterfield, P., Daborn, J., Andrea, J., Guowei, Y., Hares, M., ve Richard, H., 2003. The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy 2 (Mcf2) shows similarity to HrmA, an avirulence protein from a plant pathogen, Microbiology Letters, 229, 265-270.
- O'Callaghan, M. ve Jackson, T. A., 1993. Isolation and Enumeration of *Serratia entomophila*, a Bacterial Pathogen of the New Zealand Grass Grub, *Costelytra zealandica*, J. Appl. Bacteriol., 75, 307-314.
- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 8, Isparta.
- Osborn, F., Berlioz, L., Vitelli-Flores, J., Monsalve, W., Dorta, B. ve Lemoine, V. R., 2002. Pathogenic Effects of Bacteria Isolated from Larvae of *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae), J. Invertebr. Pathol., 80, 7-12.
- Palleroni, N.J., 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, Krieg, N. R. ve Holt, J. G., Williams and Wilkins, Baltimore,
- Peter, G., 1984. *Plant Pests and Their Control*, Fenemore, London.
- Poinar, G. O., 1979. *Nematodes for Biological Control of Insects*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Relman, D. A., Schmidt, T.M., MacDermott, R.P., Falkow, S., 1992. Identification of the Uncultured *Bacillus* of Whipple's Disease, N. Engl. J. Med., 327, 293-301.
- Rubio, R. E. P., McFadden, M., 1966. Isolation and identification of bacteria in the digestive tract of the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens*. Ann Entomol Soc Am., 59, 1015-1016.
- Sacchi, C. T., Whitney, A.M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R.S., and Popovic, T., 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*, Emerg. Infect. Dis., 8, 1117-1123.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Baskı: 2, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schleifer, K. H. ve Stackebrandt, E., 1983. Molecular Systematics of Prokaryotes, Ann. Rev. Microbiol., 37, 143-187.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J., Van Rie, D., Lereclus, J., Baum, J., Feitelson, D. R., Zeiger, ve Dean, D. H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 775-806.
- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 1999. Isolation and Insecticidal Activity of Some Bacteria from the Hazelnut Beetle (*Balaninus nucum* L.), Appl. Entomol. Zool., 34, 85-89.
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2002. *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae)'ya karşı entomopatojenlerin belirlenmesi, Türkiye 5. Biyolojik Mücadele Kongresi, Erzurum.
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2004. Studies of the bacterial flora as a biological control agent of the *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). Biologia Bratislava, 59, 327-331.
- Sezen, K., Fındık Kurdu (*Balaninus nucum*)'nun Biyolojisi, Bakteriyal Florası ve Biyolojik Mücadele Ajanının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 1998.
- Sezen, K., Yaman, M. ve Demirbağ, Z., 2001b. Insecticidal Potential of *Serratia marcescens* Bn10, Biologia, 56, 333-336.
- Shan, F. Q., Li, F. ve Chen, L. L., 2005. Gene expression analysis of six GC-rich Gram-negative phytopathogens, Biochemical and Biophysical Research Communications, 332, 380-387.
- Sikorowski, P. P., Nebeker, T. E., Lawrence, A. M. ve Price, T. S., 1995. Virus and Virus-Like Particle Found in Southern Pine Beetle Adults in Mississippi and Georgia, Eastern Forests USDA Miscellaneous, 675, Entomol. Soc., 15, 235-241.
- Sneath, A. P., 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2, Sneath, A. P., Mair, N. S., Sharge, M. S. ve Holt, J. G., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Springer, B., Stockman, L., Teschner, K., Roberts, G. D., ve Bottger, E. C., 1996. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods, J. Clin. Microbiol., 34, 296-303.
- Sramova, H., Daniel, M., Absolonova, V., Dedicova, D., Jedliekova, Z., Lhotova, H., Petras, P. ve Subertova, V., 1992. Epidemiological role of arthropods detectable in health facilities, Journal of Hospital Infection, 20, 281-292.
- Stackebrandt, E., Goebel, B. M., 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology, Int. J. Sys. Bacteriol., 44, 846-849.



- Stackebrandt, E., Goodfellow, M., 1991. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, Chicster, John Wiley and Sons.
- Steinhaus, E. A. ve Marsh, G. A., 1962. Report of Diagnosis of Diseased Insects, 1951-1961, Hilgardia, 33, 349.
- Steinhaus, E. A., 1949. Principles of Insect Pathology, McGraw-Hill, New York.
- Steinhaus, E. A., 1951. Possible Use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an aid in the Biological Control of the Alfalfa Caterpillar, Hilgardia, 20, 359.
- Steinhaus, E. A., 1956. Microbial Control: The Emergence of an Idea, J. Agric. Sci., 26, 107-160.
- Steinhaus, E. A., 1959. *Serratia marcescens* Bizio as an Insect Pathogen, Hilgardia, 28, 351-380.
- Şahin, F., 2003. Moleküler Tanı Yöntemleri, 2003 Biyoinformatik-I Lisansüstü Yaz Kursu Kitabı, 6. Bölüm (Telefoncu, A., Küfrevioğlu, İ. ve Pazarlıoğlu, N., Eds.), Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Tanada, Y. ve Kaya, H. K., 1993. Insect Pathology, Academic Press, New York.
- Undeen, A. H. ve Vavra, J., 1997. Research Methods for Entomopathogenic Protozoa, In "Manual of Techniques in Insect Pathology" (Lacey, L. A., Ed.), 117-149, Academic Press, New York.
- URL-1 <http://ordutb.tobb.org.tr/eng/findik.asp> Fındık Sorunları ve Çözümleri. 13 Aralık 2005.
- URL-2 [http://www.cikosan.com/findik\\_hakkinda.htm](http://www.cikosan.com/findik_hakkinda.htm) Türkiye'den Dünyaya Evrensel Tat; Fındık. 14 Aralık 2005.
- URL-3 Elektronik Sosyal Bilimler Dergisi [www.e-sosder.com](http://www.e-sosder.com) ISSN:1304-0278 Yaz 2005 C.4 S. 13 (112-120)
- URL-4 <http://findikci.net/uckurutan.htm> Fındık Teke Böceği, Uçkurutan ( *Obera linearis* L. Col: Cerambycidae ). 14 Aralık 2005.
- URL-5 <http://findikci.net/dalkiran.htm> Dalkıran (*Xyleborus dispar* F. Col:Scolytidae). 14 Aralık 2005.
- URL-6 <http://findikci.net/Aalni.htm> Kızılağaç Yaprak Böceği (*Agelastica alni* L. Col.:Chrysomelidae). 14 Aralık 2005.
- URL-7 <http://findikci.net/gsinegi.htm> Fındık Galsineği (*Mykomyia coryli* Kief. Dip: Cecidomyiidae). 14 Aralık 2005.
- URL-8 <http://findikci.net/fkokarcasi.html> Fındık Yeşil Kokarcası (*Palomena prasina* L. Het: Pentatomidae ). 14 Aralık 2005.



- URL-9 <http://findikci.net/kirtirtili.htm> Kırtırtılı (*Lymantria dispar* L.) (Lep. : Lymantridae). 14 Aralık 2005.
- Ünal, G., 1998. Zirai Mücadele İlaçları Toksikolojisi ve Çevre, Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü Seminer Notları, Ankara.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Coiwell, R. R., Grimon, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebract, E., Starr, M. P., Trüper, H. G., 1987. Report of The *ad hoc* Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics, Int. J. Syst. Bacteriol., 37, 463-464.
- Weiser, J., 1969. An Atlas of Insect Diseases, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.
- Wilson, M. J. ve Gaugler, R., 2000. Terrestrial Mollusca Pests, In "Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests" (Lacey, L. A. ve Kaya, H. K., Eds.), 787-804, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Wilson, M. J., Glen, D. M. ve George, S. K., 1993. The Rhabditid Nematode *Pharmarhabditis hermaphrodita* as a Biological Control Agent for Slugs, Biocontr. Sci. Technol., 3, 503-511.
- Woese, C. 1990. *Prokaryote Systematics: The Evolution of a Science* (second ed.), Prokaryotes., 3-18.
- Woods, S. A. ve Elkinton, J. S., 1987. Biomodal Patterns of Mortality from Nuclear Polyhedrosis Virus in Gypsy Moth (*Lymantria dispar*) Populations, J. Invertebr. Pathol., 50, 151-157.
- Yaman, M. ve Demirbağ, Z., 2000a. Studies of the Bacterial Flora as a Microbial Control Agent of the Large White *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae), African J. Entomol., 8, 144-148.
- Yaman, M., Demirbağ, Z. ve Beldüz, A. O., 2000b. Isolation and Insecticidal Effects of Some Bacteria from *Euproctis chrysorrhoea* L. (Lepidoptera: Lymanthriidae), Acta Microbiologica Polonica, 49, 3-4, 217-224.
- Yaman, M., Nalçacıoğlu, R. ve Demirbağ, Z., 2002. Studies on The Bacterial Flora of Fall Webworm, *Hyphantria cunea* Dury. (Lepidoptera: Arctiidae), Journal of Applied Entomology., 26, 470-474.
- Yılmaz, H., *Dendroctonus micans*'ın Bakteriyal Florası Ve Mikrobiyal Mücadele Ajanlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2004.

## 8. EKLER

### Ek 1., Mc FARLAND Standart Solusyonları

Mc Farland Standardları bakterilerin özelliklerini tespit etmek amacıyla panel test sistemlerine yapılacak olan ekimlerde bir birim olarak kullanılır. Mililitredeki koloni oluşturabilecek bakteri sayısını verir. (CFU: Koloni oluşturabilen birim)

**0,5 Mc Farland Standardı içeriği** yaklaşık olarak  $1 \times 10^7$  ila  $1 \times 10^8$  CFU/ml dir.

Barium Chloride, 0,048M solution 0,5 ml

Sulfuric Acid, 0,18M solution 99,5 ml

O.D at 625nm 0,08-0,1

**1,0 Mc Farland Standardı içeriği**

Barium Chloride, 0,048M solution 1,0 ml

Sulfuric Acid, 0,18M solution 99,0 ml

O.D. at 625nm 0,16-0,2

**2,0 Mc Farland Standardı içeriği**

Barium Chloride, 0,048M solution 2,0 ml

Sulfuric Acid, 0,18M solution 98,0 ml

O.D. at 625 nm 0,32-0,4

**3,0 Mc Farland Standardı içeriği**

Barium Chloride, 0,048M solution 3,0 ml

Sulfuric Acid, 0,18M solution 97,0 ml

O.D. at 625 nm 0,48-0,6

**4,0 Mc Farland Standardı içeriği**

Barium Chloride, 0,048M solution 4,0 ml

Sulfuric Acid, 0,18M solution 96,0 ml

O.D. at 625 nm 0,64-0,8

**5,0 Mc Farland Standardı içeriği**

Barium Chloride, 0,048M solution 5,0 ml

Sulfuric Acid, 0,18M solution 95,0 ml

O.D. at 625 nm 0,8-1,0

## Ek 2., Besiyeri, Ayıraç ve Boyaların Hazırlanışı

### Ek 2. 1., Besiyerlerinin Hazırlanışı

**Anaerobik Agar:** 20 g triptikaz, 10 g glukoz, 5 g sodyum klorür, 15 g agar, 2 g sodyum thioglycolate, 1 g sodyum formaldehit sulfoksilat 1000 ml deiyonize su (ddH<sub>2</sub>O)'da çözüldü; pH'ı 7,2'ye ayarlanarak otoklavda steril edildi.

**Brain-Heart Infusion (BHI) Agar:** Toz haldeki hazır besiyerinden 37 g alındı; 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözümlenip otoklavda steril edildi.

**Karbonhidrat Fermentasyon Besiyeri:** Bu besiyerinin hazırlanması için ilk olarak temel besiyeri hazırlandı: 1 g diamonyum hidrojen fosfat, 0,2 g potasyum klorür, 0,2 g magnezyum sülfat, 0,2 g yeast extract, 15 g agar 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; pH'ı 7,0'a ayarlanmadan önce % 0,04 (w/v) oranında hazırlanan bromcresol purple solüsyonundan 15 ml ilave edilerek otoklavda steril edildi. Daha sonra fermentasyon özelliklerine bakılacak olan şekerler hazırlandı. Öncelikle her bir besiyerinin hazırlanacağı test tüpleri otoklavda steril edildi. % 10 oranındaki karbonhidrat solüsyonları ise filtreden geçirilmek suretiyle steril edildi. 50 °C'ye kadar soğutulan steril temel besiyerine, % 0,5 oranında olacak şekilde karbonhidrat solüsyonundan ilave edildi ve besiyeri slant olarak kullanıldı.

**Kligler Iron Agar (KIA):** 55 g hazır besiyeri 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; otoklavlanarak steril edildi.

**Metil Kırmızısı, Voges-Proskauer Broth (MRPV):** 7 g pepton, 5 g glukoz, 5 g sodyum klorür 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; pH'ı 6,5'e ayarlanarak otoklavda steril edildi.

**Nişasta Agar:** 1g patates nişastası 10 ml soğuk ddH<sub>2</sub>O'da çözümlenip 100 ml nütrient agarla karıştırıldı ve otoklavlanarak steril edildi.

**Nitrat Broth:** 5 g pepton, 3 g beef extract, 1 g potasyum nitrat 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; pH'ı 0,7'ye ayarlanarak otoklavda steril edildi

**Nütrient Agar (NA):** 5 g pepton, 3 g beef extract, 15 g agar 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; otoklavlanarak steril edildi. Çalışmada ayrıca ticari olarak satılan nütrient agar da kullanıldı.

**Nütrient Broth (NB):** 5 g pepton, 3 g beef extract, 1 g potasyum nitrat 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; pH'ı 7,0'a ayarlanarak otoklavda steril edildi.

**Nütrient Jelatin:** Ticari olarak satılan nütrient jelatinden 120 g 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü, pH'ı 7,0'a ayarlanarak kullanıldı. Bunun yanısıra, % 0,4 oranında gelatin ihtiva eden nütrient agar da kullanılabilir.

**Sabouraud Dextroz Agar:** 10 g pepton, 40 g dextroz, 15 g agar 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; pH'ı 5,6'a ayarlanarak otoklavda steril edildi.

**Sabouraud Dextroz Broth:** 10 g pepton, 20 g dextroz, 15 g agar 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; pH'ı 5,6'a ayarlanarak otoklavda steril edildi.

**Simmon's Sitrat Besiyeri:** 23 g hazır besiyeri 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; otoklavlanarak steril edildi.

**Tryptic Soy Agar (TSA):** 40 g hazır besiyer 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; otoklavlanarak steril edildi.

**Tryptofan Broth:** 15 g hazır tryptofan broth 1000 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; otoklavlanarak steril edildi.

**Üre Hidroliz Besiyeri:** 0,1 g yeast extract, 9,1 g potasyum fosfat monobazik, 9,5 g potasyum fosfat dibazik, 0,2 g üre ve 0,001 g fenol kırmızısı karışımına 117 ml ddH<sub>2</sub>O ilave edildi; pH'ı 6,8'e ayarlandıktan sonra 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip steril filtrelerden geçirilmek suretiyle steril edildi.

## **Ek 2.2., Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı**

Aseton Alkol: 250 ml % 95'lik etanol ve 250 ml saf aseton karıştırılarak hazırlandı.

Bakır Sülfat (CuSO<sub>4</sub>) Solüsyonu: 20 g bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) 80 ml suda çözülerek hazırlandı.

Dimetil- $\alpha$ -Naftilamin: 5 g  $\alpha$ -naftilamin 1000 ml ve 5 N'lik asetik asitte çözülerek hazırlandı.

Gram İyodu: 1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür (KI) 5 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; üzerine 250 ml ddH<sub>2</sub>O ve 60 ml % 5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) ilave edildi.

Katalaz Ayıraç: Ayıraç olarak % 10'luk hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) çözültisi kullanıldı.

Kovak Kimyasalı: 5 g p-dimetilaminobenzaldehid 75 ml amilalkolde çözüldü ve 25 ml HCl ilave edildi.

Kristal Viyole Boyası: Bu boya iki ayrı solüsyon olarak hazırlanıp ardından ikisi birbirine karıştırıldı: 1) 1 g kristal viyole, 10 ml etanol, 90 ml distile su ile karıştırıldı. 2) 4 g amonyum oksalat ve 400 ml ddH<sub>2</sub>O karıştırıldı. Bu iki solüsyon daha sonra birbirine karıştırılarak kullanıldı.

Malakit Yeşili: 5 g malaşit yeşili 100 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek kullanıldı.

Oksidaz Ayıraç: 6% tetrametilfenilendiamin hidroklorit, dimetil sulfoksit çözültisinde hazırlanır.

Safranin: 2,5 g safranin O, 100 ml %95'lik etanol ve 500 ml ddH<sub>2</sub>O karıştırılarak hazırlandı.

Sülfanilik Asit: 8 g sülfalidik asit 1000 ml ve 5 N'lik asetik asit (1 kısım asetik asit: 2,5 kısım distil su) içinde çözülerek hazırlandı.

Vogus-Proskauer-I Ayıraç: 5 g  $\alpha$ -naftol 100 ml'den az absolute alkolde çözüldü ve 100 ml'ye tamamlanıp 5 °C'de muhafaza edildi.

Vogus-Proskauer-II Ayıraç: 40 g KOH hızlı bir şekilde 100 ml'den az ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; soğutuldu ve ddH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı; hazırlandıktan 7-8 saat sonra kullanıldı.

### Ek 3., Elde Edilen İzolatların 16S rRNA Gen Sıraları

#### 1 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

GATTATTGAATCCAACGCGTTGGGGAGCTCTCCCTATGGTTCGACCTGCAGGCCGGCCGCGAATTCAGTAGTGAT  
TATTCAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAAGTCGAGCGGAGAGA  
GGTAGCTTGTACCCGATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAA  
ATTCGAAAGGAATGCTAATAACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTTCGCTAATA  
GATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAG  
AGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC  
AATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTATGGTTGTAAAGCACTTAAAGCGA  
GGAGGAGGCTACTGAAGTTAATAACCTTCAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG  
CCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCCGGCT  
AATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGGA  
GAGGATGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCC  
ATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCATG  
CCGTGAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCGC  
CTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTAAAACCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATAGTAAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCC  
TTCGGGAACTTACATACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC  
ACGAGCGCAACCCCTTTCTTATTTGCCAGCGAGTAATGTTCGGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACT  
GGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGTTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCG  
TACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA  
CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  
TACACACCGCCCGTACACGGTACCATAATCGAATTTCCCGCGCCCGCCATGGCGGCGCGGAGCCATGCGATCT  
ACGCTCCCC

#### 2 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

ATCACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGCCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTATGGTACCGT  
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTAAGTAGCGATTCC  
GACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGTCTCTCGCGA  
GGTTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTTGTAGCACGTTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGT  
CATCCCCACCTTCTTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCTTTGAGTTCCCGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGA  
TAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCAACATTTCAACAACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTG  
TCTCAGAGTTCGGAAGGCACCAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCG  
CGTTGCATCGAATTAACACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACCTTG  
CGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGCACTTAAACGCGTTNAGCTCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAA  
GTTCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTTCGCACCTGAGCG  
TCAGTCTTTGTCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTTACCGCTACACCT  
GGAATTCACCCCCCTTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTT  
TCACATCCGACTTGACAGACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGCACCTCCGT  
ATTACCGCGGCTGCTGGCAGGAGTTAGCCGGTCTTCTTCTGCGAGTAACGTCATCACTAAGGTTATTAAC  
CTTAACGCTTCTCTCTGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCCTTCTTCATACACGGGCATGGCTGCAT  
CAGGCTTGCGCCATTTGTGCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAG  
TGTGGCTGGTTCATCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTGCCTAGGTGAGCCATTACCTCACCTACTAGCTAAT  
CCCATCTGGGCACATCTGATGGCATGAGGCCTGAAGGTCCCCCACTTTGGTCTTTCGACGTTATGCGGTATTA  
GCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTACTCACCCGTCCGCGCTCGTC  
ACCAAAGAGCAAGCTTCTCTGTGCTACCGCTCGACTTGCATGTGTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGA  
GCCATGATCAAACCTTAGAATAATCGAATTTCCCGCGCCCGCCATGGCGGCGCGGAGCTGNANGGC



### 5 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

ATCACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTATGGTACCGT  
 GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGACATTCGATTGCGGATTACTAGCGATTCC  
 GAC TTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGGATTAGTCCACCTCGCGG  
 CTTGGCAACCCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGT  
 CATCCCCACCTTCCTCCGTTTGTACCGGCAGTCTCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGG  
 ACAAGGTTTGCCTCGTTACGGGACTTAAACCCAAACATCTCAGCACAGGCTGACGACAGCCATGCAGCACCT  
 GTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCCATCCATCTCTGGAAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAAGGTTCTTC  
 GCGTTGCTTCGAAATTAACACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTT  
 GCGGCGTACTCCCCAGGCGTCAACTTAATGCGTTAGNTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTA  
 GTTGACATCGTTTACGGCGTGGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTCAGT  
 GTCAGTGTGGTCCAGGTGGTTCGCTTCGCCACTGGTGTCTCTTCTATATCTACGCATTTTACCGCTACACA  
 GGAAATTCACACCACCTCTACCACACTTAGTCAGTCAGTTTGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGAT  
 TTCACATCCAACTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGGATTAACGCTTGCACCCCTCTG  
 TATTACCGCGGGTGCAGGCACAGAGTTAGCCGGTGTCTATTCTGTGCGGTAACGTCAAAAACAATCACGTATTAG  
 GTAAC TGCCCTTCCTCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGA  
 TCAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATTTCCCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCA  
 GTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCTTGGTGAGCCATTACCTCACAACTAGCTAA  
 TCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCGAAAGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATT  
 AGCGTCCGTTTCCGAACGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCCTAGGCTTACTACCCGTCGCGCGCTCTC  
 AAGAGAAGCAAGCTTCTCTTACCCTCGACTTGCATGTGTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAT  
 GATCAAACCTTAGAATAATCGAATTCGCGCGGCCCATGGCGGCCGGAGCNGCACNCGCCA

### 6 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

CTTCTCACGCGTNGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTATTTCTAGA  
 GTTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAAACACATGCAAGTCGAGGGGTATAGCACTTCGGT  
 GCTAGAGACCGGCGCACGGTGCCTAACGCTATGCAATCTGCCCTTTCACAGAGGGATAGCCAGAGAAATTT  
 GGATTAATACCTCATAGCATAGCACAAATCGCATGATTTGAGCTATTTAAAGTCACAACGGTGAAAGATGAGCATG  
 CGTCCCATTAGCTGTTGGTAAAGTAAACGGCTTACCAAGGCTACGATGGGTAGGGGTCTGAGAGGGAGATCC  
 CCCACACTGGTACTGAGACACGGATCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTTGGTCAATGGGCGCA  
 AGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGACGGTCTATGGATTGTAAACTGCTTTTGTACGAGAAGAAAC  
 ACTCCTTCGTGAAGGAGCTTGACGGTATCGTAAGAAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAA  
 TACGGAGGATCCAAGCCTTATCCGGAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGTTNTGGTAAAGTCAGTGGT  
 GAAAGCCCCATCGCTCAACGGTGAACGGCCATTGATACTGCTGGACTTGAATTTATTAGGAAGTAACTAGAAT  
 ATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGAGATTACATGGAATACCAATTCGGAAGGCAGGTTACTACTAATGGAT  
 TGACGCTGATGGACGAAAGCCTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGA  
 TACTAGCTGTTGGAAGCAATTTCAGTGGCTAAGCGAAAGTGATAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGAAACGCAA  
 GTTTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGA  
 GGAACCTTACCAAGGCTTAAATGCAGACTGACCGATTTGGAAACAGATCTTTCGCAAGACAGTTTACAAGGTG  
 CTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTCCGTTGAGGTGTGAGTTAAGTCTATAACGAGCGCAACCCCTGTTGTTA  
 GTTGCCAGCGAGTAGTGTGGGAACCTTAACAAGACTGCCAGTGCAAACTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  
 AAATCATCACGGCCCTTACGCCCTGGGCTACACACGTGCTACAAATGGCCGGTACAGAGAGCAGCCACTGGGCG  
 ACCAGGAGCGAATCTATAAAGCCGGTACAGTTCCGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTTGAAGCTGGAATC  
 GCTAGTAATCGGATATCAGCCATGATCCGTTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCCACCGGT  
 ACCATAATCGAATTTCCCGCGGCCCATGGCGGCCGGAGCTGGATCGC



## 7 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

CTGNTCAGCGTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGGCCGGAATTCAGTAGTGATTATGGTACCG  
 TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACT  
 CCGACTTCATGAGGTCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAACTGGGACCGGCTTTTTGGGATTGCTCCACCTCGC  
 GGTATTCAGACCCCTTTGTACCGGCCATTTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGAC  
 GTCATCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTATCCCATGAGTTCCACCATTACGTGCTGGCAACATA  
 GAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCAC  
 CTGTTTACGAGTGTCCAAAGAGTTGACCATTTCTGGCCCGTTCTCGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTT  
 CGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTLAGCCT  
 TCGCGCCGTACTCCCAGGCGGGGAACTTAATGCGTTAGCTGCGTCACGGAATCCGTGGAATGGACCCACAA  
 CTAGTTCCCAACGTTTACGGGGTGGACTACCAGGGTATCTAAGCCTGTTTGTCTCCCCACCTTTGCTCCTCA  
 GCGTCAGTTACGGCCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCTGATATCTGCGCATTCCACCGTACA  
 CCAGCAATCCAATCTCCCTACCGCACTTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAGGCGGGAGGTTGAGCCTCCGG  
 ATTTACAGCAGACGCGACAAACCGCTACGAGCTCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCGCCCTA  
 CGTATTTACCGCGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTGCTTCTTCCC  
 TGCTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCACGCGCGTTGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTG  
 TGCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCAACCTC  
 TCAGGCCGGCTACCCGTCGACGCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCC  
 CCAACCAATAAATCTTTCCAGTAACTGACCATGCGGTGCTACTCGTATCCAGTATTAGACGCCGTTTCCAGC  
 GCTTATCCAGAGTCAGGGTCAGGTTGCTCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTGATCCACAGAGCAAGCT  
 CCGTGTTCACCGTTGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTAG  
 AATAATCGAATTTCCCGCGGCCCATGGCGCCGGAGCAGNACNCG

## 8 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

CCGACATTGACTCACGTNCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGGCCGGAATTCAGTAGTGA  
 TTATTTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGGACGGTAGC  
 ACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGG  
 ATAACCACTGGAAACGTTGGCTAATACCGCATAACGTTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCCGGCCCTCCCAC  
 TATCGGATGAACCCAGATGGGATTTAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCACCTAGGGCAGCATCCCTAGCTGGT  
 CTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT  
 TGCACAAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTT  
 AGCGGGGAGGAAGGCGATGCGGTTAATAACCGCGTCGATTTGACGTTACCCGCAAGAAGCACCGGCTAACTC  
 CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGAGGC  
 GGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAATCT  
 TGTAGAGGGGGGTAGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAACGGTGGCGAAGGC  
 GGCCCCCTGGACAAAGACTGACGTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTC  
 CACGCCGTTAAACGATGTCGACTTGGAGTTGTTCCCTTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTTAGTCAA  
 CCGCTTGGGGATGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT  
 GTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCGAACTTAGCAGAGATGCTTTG  
 GTGCCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCAATGGCTGTTGTGAGTCTGTTGTTGAAATGTTGGGTTAAGTC  
 CCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCCTTTGTGCCAGCGATTCGGTCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATA  
 AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGG  
 CGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCACAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATCGGAGTCT  
 GCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGC  
 CTTGTACACACCGCCCGTACACGCTACCATAATCGAATTTCCCGCGGCCCATGGCGCCGGAGCAGGACTCG  
 CACC

### 9 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

CCACCATGACATCAAACGCGTTGGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAC TAGTG  
 ATTATTTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACAACATGCAAGTCGAACGGCAG  
 CACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTTTCTG  
 GGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAAGCGGAGGACCTTCGGGCTT  
 CGCGCGAATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGTAAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAG  
 CTGGTCTGAGAGGATGGTCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG  
 AATATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGGGTGAAAGGCCCTTCGGGTGTAAAAGCC  
 CTTTTGTTGGGAAAGAAAAGCAGTCCGTTAATACCCGATTTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCT  
 AACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAAGCGTGGC  
 TAGGTGGTGGTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACTGGGAATTCAGTGGATACTGGGTCACTAG  
 AGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTCGGTGAGCAGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCGTGGCG  
 AAGGCGGCTACCCTGGCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATAGATAACCTGG  
 TAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACCGCTTA  
 AAGTTCGCCGCCCTGGGGAGTACGGTCCGACACTGAAACTCAGAGGAATTTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTG  
 GAGTATGTTGTTAAATTTGGATGCAACGCGAAGACCCCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTCCAGAGAT  
 GGATTTGGTGCCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGT  
 TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTAAGGAGACCGCC  
 GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTACT  
 ACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAACCCCGGAGGGTAAGCCAATCCAGAAACCTATCTCAGTCCGGATT  
 GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAFTCGGAATCGTAGTAATCGCAGATCAGCATTTGCTGCGGTGAATACGT  
 TCCCGGGCTTTGTACACACCGCCCGTACACGGTACCATAATCGAATTTCCCGCGCCCGCATGCGGCCGGGAG  
 CATGCGANGTCCGCCACCC

### 10 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

ATCACGCGTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAC TAGTGATTTATGGTACCGTG  
 TGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAAACGTATTACCGCGACATTTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCG  
 ACTTCACGCAGTCGAGTTGCGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGC  
 TTGGCAACCCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTC  
 ATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCACCACATAATGTGCTGGTAACTAAGGA  
 CAAGGGTTGCGCCCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTG  
 TCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCAATGGATGTCAAGGCCGTTAAGGTTCTTCG  
 CGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTAGGTTTTAACCTTG  
 CGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGNTGCGCCANTAAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAG  
 TTGACATCGTTTTACGGCGTGGGCTACCGGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGT  
 CAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTCTCCTTCTATATCTACGCAATTCACCGCTACACAGG  
 AAATTCACACCACCTCTACCATACTTAGCTTGCCAGTTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTT  
 CACATCCAACCTAACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGCACCCCTCTGTA  
 TTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCCTTATTCTGTCGGTAAACGTCAAAACAAATCACGTAATTAGGT  
 AACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTTCACACACGCGGCATGGCTGGATC  
 AGGCTTTTCGCCATTGTCCAATATTTCCCACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGT  
 GTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCCTTGGTGGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATC  
 CGACCTAGGCTCATCTGATAGCGAAGGCCGAAGGTCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGATGCGGTTATTAG  
 CGTCCGTTTTCCGAGCGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCCTAGGCATTACTCACCCGTCGCGGCTCGCCA  
 CCAGGTACAAGTACCGTGTGCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAT  
 GATCAAACCTAGAAATAATCGAATTTCCCGCGGCCCGCATGGCGGCCGGAGCTGNNCNCGC

### 11 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

GGGTGGCGACNTGCATGCTCCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATTCTAGAGTTTG  
 ATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAAGA  
 GCTTGCTCTTCGATTACGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGG  
 ACAACGTTTCGAAAAGAACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCG  
 GGCCTTGCCTATCAGATGAGCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG  
 GCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGA  
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCC  
 GCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTA  
 ATACGTTAGTGTTTTACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCG  
 GTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGT  
 TAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAG  
 TACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGTGTAGATATAGGAAGGAACAC  
 CAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA  
 CAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAG  
 ATTTAGTGGCGCAGCTAACGCATAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCCGCAGGTTAAAC  
 TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCCACAA

### 13 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

AAATCATGAATCCNAACGCGNNTTGGGAGCTCTCCCTATGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTGTG  
 ATTATTCTAGAGTTTGGATCATGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAG  
 CACAGAGGAGCTTGGCTCCTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTCTGG  
 GGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATAACCGCATACTACGGGTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGG  
 CGCGATTGAATGAGCCGATGTTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCCAACAGGCGACGATCCGTAGCT  
 GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA  
 TATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGTTGTAAAGCCCT  
 TTTGTTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATAACCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAA  
 CTTCCGTGCCAGCAGCCCGGTTATAAGGAGGGGTGCAAGCGTTACTTGGAAATTAAGTGGGCGAAAAGCGTGG  
 TAGGTGGTTCGTTAAGTCCGTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGACGACTAG  
 AGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGAAGCAGTGAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCG  
 AAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGG  
 TAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTCGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACCGCTTA  
 AGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG  
 AGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAACTTTCAGAGATG  
 GATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTGAGTTCGTGAGATGTTGGGTT  
 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTTAAGGAGACCGCCG  
 GTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTA  
 CAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAAGCCAATCCAGAAAACCTATCTCAGTCCGGATG  
 GAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTT  
 CCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCGTACCATAATCGAATTCGCCGCGGCCCATGCGGCCGGAGCA  
 GGAGTCGCACCA

### 14 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

AAAGCCTTGACATCCANCGNCNNGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACCTA  
 GTGATTATTTAGAGTTTGGATCATGGCTCAGATTTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGG  
 AGAGAGGTAGCTTGGTACCGATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCATTTAGTGGGGG  
 ACAACATTTGAAAGGAATGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTCGCG  
 TAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGT  
 CTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTCGGGGAATAT  
 TGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTA  
 AGCGAGGAGGAGGCTACTGAAAGTTAATACCTTCAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACT  
 CTGTGGGTAATTTTGGGCCCGCAGCCCGGTAATACAGAGGGTCCAAGCGTTATTTGGAATTTACTGGGCGTAA  
 AGCGGGGTAGGCGGCTATTTAAGTCAAATGTGAATTTCCCGAGTTTAACTTTGGGAATGCAATTCGATACGG  
 TTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATTTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC  
 CGATGGCGAAGGCGACCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
 TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAA  
 CGCGATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGACTAAAACCTCAAATGAATTTGACGGGGGCCCGCACAA  
 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTTGACATAGTAAGAATTTTCC  
 AGAGATGGATTTGGTGCCTTCGGGAACTTACATACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTGAGTCTCGTGTGAGATG  
 TTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTTTCTTATTTGCCAGCGAGTAATGTTCGGGAACTTTAAGGAT  
 ACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACA  
 CGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTC  
 CGGATTTGGAGTCTGCAACCCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAA  
 TACGTTCCCGGGCTTTGTACACACCCGCCCGTACACCGGTACCATAATCGAATTTCCCGCGGCCCGCCATGCGGCC  
 GGAGCAGGAGTCGCACC

### 15 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

CAGCATGCATCANNNCGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACCTAGTGT  
 TATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATT  
 ACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTGAGATAGGGTTTTCTGGGATTTGGC  
 TTACCGTCGCCGCTTGCAGCCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTTGTGTAGTCTTCGGCCGTAAGGGCCATG  
 ATGACTTGACGTCATCCCACTTCTCCGGTTTTGTTCATCGGCGGTCTCTTAGAGTTCCACCATTTACGTGC  
 TGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGC  
 CATGCAGCACCTGTGTTCGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTTCGAAAAGTTCTCGACATGTCAAGGCCAG  
 GTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCCTTTT  
 GAGTTTCAGTCTTTCGACCGTACTCCCCAGGCGGCGAACTTAAACGCGTTAGCTTCGATACCTGCGTGC  
 GCACCCAACATCCAGTTTCGATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGGCTCCCCACGCT  
 TTCGTGCCTCAGTGTGAGTTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGCTCCTCCTGATCTCTACGCAT  
 TCACTGCTACACCAGGAATTCGCTACCTCTACCACACTTAGTTCGCCAGTATCCACTGCAGTTCCAGGT  
 TGAGCCCAGGGCTTTCAACCGACTTAAACGACCACCTACGCACGCTTTACGCCAGTAACTCCGAGTAACG  
 CTTGACCCCTTCGTATTTACCGCGGCTGCTGGCAGCAAGTTAGCCGGTGTCTTATCTTTGGGTACCGTCATCCC  
 AACCGGGTATTAGCCAGCTGGATTTCTTTCCCAACAAAAGGGCTTTACAACCCGAAGGCCCTTTCCAGTAACG  
 CGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTGTCCAATATTTCCCACTGCTGCTTCCCGTAGGAGTCTGGACCG  
 TGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGCCCTTGGTGGGCCCTTTACCCC  
 GCCAACTAGCTAATCCGACATCGGCTCATTTCAATCGCGCAAGGTCGGAAGATCCCCGCTTTTACCCGTTAGGT  
 CGTATGCGGTATTAGCGTAAGTTTCCCTACGTTATCCCCACGAAAAAGTAGATTCGGATGTATTTCTCACCC  
 GTCCGCCACTCGCCACCCAGAGAGCAAGCTCTCTGTGCTGCCGTTTCGACTTGCATGTGTTAGGCCCTACCGCC  
 AGCGTTCACTCTGAGCCATGATCAAATCTAGAATAATCGAATTTCCCGCGGCCCGCCATGCGGCCGAGCAGGA  
 CTCGCACC



## 16 Numaralı İzolattan Elde Edilen 16S rRNA Geninin Baz Sırası;

CCAACATGAACTCCACGNNCGTTGGGAGCTCTCCCTATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGA  
 TTATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGGACGGTAGC  
 ACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGG  
 ATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCCCAC  
 TATCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGTAAATGGCCACCCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGT  
 CTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT  
 TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTC  
 AGCGGGGAGGAAGGCGATGCGGTAAATAACCGCGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTC  
 CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAATGGGCGTAAAGCGCACGCAGGC  
 GGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCT  
 TGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC  
 GGCCCCCTGGACAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC  
 ACGCCCCTAACGATGTCGACTTGGAAAGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCGGGAGCTAACCGGTTAAGTCGAC  
 CGCCTGGGGAGTACCGCCGCCAGGTTTAAACTTCATCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC  
 ATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTTGACATCCAGCGAACTTAGCAGAGATGCTT  
 TGGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTTGTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAG  
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGA  
 TAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAAT  
 GGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCACAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGGAGT  
 CTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGG  
 GCCTTGTACACACCGCCCGTACACCGGTACCATAATCGAATTCCCGCGGCCCGCCATGCGGCCGGGAGCAGCGA  
 NCTCCGCCACCC

## ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Trabzon'un Çarşıbaşı ilçesinde doğdu. İlkokulu Cumhuriyet İlkokulu, Ortaokulu birincilik derecesi ile Yunus Emre Ortaokulu'nda ve liseyi Trabzon Lisesi'nde tamamladı. 1998–1999 Eğitim–Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2002 yılında bu bölümden Biyolog ünvanıyla mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.

