

8085

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BACILLUS SPHAERICUS'UN SİVRİSİNEKLERE ETKİSİ
ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA**

Cumhur ÇÖKMÜŞ

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**1 9 8 9
A N K A R A**

**T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi**

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BACILLUS SPHAERICUS'UN SİVRİSİNEKLERE ETKİSİ
ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA**

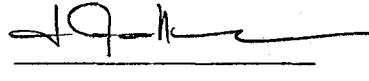
Cumhur ÇOKMUŞ

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI


Bu Tez 9/10/1989 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Tarafından 100 (Yüz)
Not Takdir Edilerek Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.



Prof. Dr. Sevinç KAROL
Danışman



Prof. Dr. Lütfü ÇAKMAKÇI



Doç. Dr. Orhan AKKOL



Ö Z E T

Doktora Tezi

**BACILLUS SPHAERICUS'UN SIVRISINEKLERE ETKİSİ
ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA**

Cumhur ÇÖKMÜŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim DalıDanışman : Prof.Dr. Sevinç KAROL
1989, Sayfa : 74Jüri : Prof.Dr.Sevinç KAROL
Prof.Dr.Lütfü ÇAKMAKÇI
Doç.Dr.Orhan AKKOL

Bu çalışmada, 85 farklı örnekten 342 *Bacillus sphaericus* izolatu elde edilmiştir. Bunlardan 9 tanesinin sivrisinek larvalarına (*Culex* sp.) karşı patojenik olduğu bulunmuştur. Ancak bu patojen izolatlardan 7 tanesi 1 ay - 3 yıl sonra insektisidal aktivitelerini kaybetmiştir (6, 18, 27, 28, 29 ve 71 numaralı izolatlar). Sadece 2 izolat insektisidal aktivitelerini devam ettirmiştir (31 ve 34 numaralı izolatlar). *B. sphaericus* 31 ve 34 numaralı suşların LC50 değerleri sırasıyla 20 µg spor/ml ve 6 µg spor/ml olarak bulunmuştur. *Culex quinquefasciatus*'un ikinci devredeki larvaları kullanılarak elde edilen bu değerler *B. sphaericus* 2362'ye göre 1.5×10^6 ve 4.5×10^5 defa daha düşüktür. 31 ve 34 numaralı *B. sphaericus* suşlarının aynı zamanda, SST fajı hariç bütün fajlarla reaksiyona girdiği görülmüştür. Aynı zamanda *B. sphaericus* X ve Y suşları izole edilmiştir. Bu suşlar faj grubu 3 olarak sınıflandırılmıştır (*B. sphaericus* 1593 grubu). Bununla birlikte bu suşların ikinci devredeki *Culex quinquefasciatus* larvalarına karşı larvasidal aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür. Bu iki izolat bakteriyosin üretimine 7. saatten sonra başlamış, 9. saatte maksimum seviyeye ulaşmış ve 24. saatte bakteriyosin aktivitesi kaybolmuştur.

ANAHTAR KELİMELER : Sivrisineklerin mikrobiyal kontrolü, *Bacillus sphaericus*, virülens, faj tiplendirmesi, bakteriyosin.

ABSTRACT

PhD Thesis

AN INVESTIGATION ON THE EFFECT OF *BACILLUS SPHAERICUS*
ON MOSQUITOES

Cumhur ÇOKMUŞ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor : Prof.Dr. Sevinç KAROL
1989, Page : 74

Jury : Prof.Dr.Sevinç KAROL
Prof.Dr.Lütfü ÇAKMAKÇI
Assoc.Prof.Dr.Orhan AKKOL

In this study, 342 isolates of *Bacillus sphaericus* were obtained from 85 different samples. 9 of them were found to be pathogenic against mosquito larvae (*Culex* sp.). However, 7 of these pathogenic isolates lost their insecticidal activities after 1 month - 3 years (numbers: 6, 18, 25, 27, 28, 29 and 71). Only 2 isolates maintained their insecticidal activities (numbers: 31 and 34). The LC50 values of *B. sphaericus* strain 31 and 34 were found to be 20 µg spore/ml and 6 µg spore/ml respectively. These values are 1.5×10^6 and 4.5×10^5 times lower than that of *B. sphaericus* 2362 against second instar of *Culex quinquefasciatus* larvae. The strains of *B. sphaericus* 31 and 34 were also observed to react with all phages except phage SST. *B. sphaericus* X and Y were also isolated. These strains were classified to be phage group 3 (*B. sphaericus* 1593 group). However, they were seen to have no larvicidal activity against the second instar of *C. quinquefasciatus* larvae. These two isolates produced bacteriocin starting from the 7th hour reaching the maximum level at the 9th hour and losing their bacteriocin activity at the 24th hour.

KEY WORDS : Microbial control of mosquitoes, *Bacillus sphaericus*, virulence, phagetyping, bacteriocin.

TEŞEKKÜR

Tez konusunu bana veren ve desteğini eksik etmeyen sayın hocam Prof.Dr. Sevinç KAROL'a (Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, TÜRKİYE); denemelerin yürütülmesinde, sonuçların değerlendirilmesinde ve tezin yazımında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm sayın hocam Prof.Dr.Lütfü ÇAKMAKÇI'ya (Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara TÜRKİYE); sayın Prof.Dr. Allan A. YOSTEN'a (Virginia Polytechnic Institute and State University, Department of Biology, Virginia, U.S.A.); sayın Dr. Elizabeth W. DAVIDSON'a (Arizona State University, Department of Zoology, Arizona, U.S.A.); İzmir'de yapılan biyoesseylerde yardımlarını gördüğüm sayın Prof.Dr. Mehmet ÖNER'e (Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir, TÜRKİYE) ve antiserumların hazırlanmasında yardımcı olan sayın Dr. Nevin SEZGİNMAN'a (Hıfzıssıhha Araştırma Enstitüsü, Ankara, TÜRKİYE) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İ Ç İ N D E K İ L E R

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET | ii |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Böcek Patojeni <i>Bacillus</i> Cinsine Giren Bakterilerin Ayrım Anahtarı | 3 |
| 1.2. <i>Bacillus sphaericus</i> Suşların İzolasyonu, "Teşhisi ve Karakterizasyonu | 3 |
| 1.3. <i>Bacillus sphaericus</i> 'un Toksisitesi ile ilgili Çalış- malar | 9 |
| 1.3.1. Toksinin sentezi, yapısı ve yerleştiği yer | 9 |
| 1.3.2. Toksinin etki mekanizması | 12 |
| 1.3.3. Toksik aktivite ile sporulasyonun ilişkisi | 14 |
| 1.3.4. Toksin sentezinin genetiği | 16 |
| 1.3.5. <i>Bacillus sphaericus</i> 'un toksisitesini etkileyen fak- törler | 17 |
| 1.4. <i>Bacillus sphaericus</i> 'un Formülasyonu ve Arazi Denemeleri | 21 |
| 1.5. Amaç | 23 |
| 2. MATERYAL VE METODLAR | 24 |
| 2.1. Materyaller | 24 |
| 2.1.1. <i>Bacillus sphaericus</i> 'un izolasyonu için incelenen örnekler | 24 |
| 2.1.2. Biyoesseylerde ve diğer çalışmalarda kontrol olarak kullanılan bakteriler | 24 |
| 2.1.3. Biyoesseylerde kullanılan sivrisinek larvaları | 24 |
| 2.1.4. Antiserumların hazırlanmasında kullanılan tavşanlar. | 27 |
| 2.2. Metodlar | 27 |
| 2.2.1. <i>Bacillus sphaericus</i> 'un izolasyonu | 27 |
| 2.2.1.1. <i>Bacillus sphaericus</i> 'un toprak ve dip çamurundan izolasyonu | 27 |
| 2.2.1.2. <i>Bacillus sphaericus</i> 'un sudan izolasyonu | 28 |
| 2.2.1.3. <i>Bacillus sphaericus</i> 'un sivrisinek larvası ve diğer canlılardan izolasyonu | 28 |
| 2.2.2. <i>Bacillus sphaericus</i> izolatlarının karakterizasyonu için yapılan incelemeler | 28 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2.1. Morfolojik incelemeler | 29 |
| 2.2.2.2. Biyokimyasal ve kültürel incelemeler | 29 |
| 2.2.3. Biyoesseylerin yapılışı | 32 |
| 2.2.3.1. izolatların patojenliklerini anlamak için yapılan biyoesseyler | 32 |
| 2.2.3.2. izolatların virülenslerini tayin etmek için yapılan biyoesseyler | 33 |
| 2.2.4. <i>Bacillus sphaericus</i> antiserumlarının hazırlanışları ve lam aglutinasyon testi | 34 |
| 2.2.4.1. Antijenlerin hazırlanışı | 34 |
| 2.2.4.2. Enjeksiyon işlemleri ve antiserumların eldesi | 35 |
| 2.2.4.3. Lam aglutinasyon testi | 35 |
| 2.2.5. <i>Bacillus sphaericus</i> suşlarının faj tiplendirmeleri | 35 |
| 2.2.6. <i>Bacillus sphaericus</i> X ve Y'nin antibakteriyel etkisi ile ilgili deneyler | 36 |
| 2.2.6.1. Antibakteriyel etkinin kültür yaşı ile ilişkisi .. | 36 |
| 3. SONUÇLAR | 40 |
| 3.1. <i>Bacillus sphaericus</i> 'un izolasyonu ve izolatların Patojenlikleri | 40 |
| 3.2. <i>Bacillus sphaericus</i> izolatlarının Morfolojik Özellikleri | 41 |
| 3.3. <i>Bacillus sphaericus</i> izolatlarının Kültürel ve Biyokimyasal Özellikleri | 43 |
| 3.4. <i>Bacillus sphaericus</i> 'un Patojenizitesi | 43 |
| 3.5. <i>Bacillus sphaericus</i> izolatlarının Virülensleri | 45 |
| 3.6. <i>Bacillus sphaericus</i> Antiserumlarının Özellikleri | 48 |
| 3.7. <i>Bacillus sphaericus</i> 'un Faj Tiplendirme Sonuçları | 48 |
| 3.8. <i>Bacillus sphaericus</i> X ve Y ile ilgili Sonuçlar | 49 |
| 3.8.1. <i>Bacillus sphaericus</i> X ve Y'nin izolasyonu | 49 |
| 3.8.2. <i>Bacillus sphaericus</i> X ve Y'nin morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özellikleri | 49 |
| 3.8.3. <i>Bacillus sphaericus</i> X ve Y'nin etki spektrumu..... | 51 |
| 3.8.4. Bakteriyosin üretiminin kültür yaşıyla ilişkisi..... | 51 |
| 4. TARTIŞMA | 56 |
| KAYNAKLAR | 60 |
| EKLER | 67 |

1. GİRİŞ

Zararlı böceklerle savaşta yaklaşık 40- 50 yıldan beri, oldukça yoğun olarak uygulanan metod kimyasal insektisitlerin kullanılmasıdır. Bu uygulamalar sonucunda gerek çevrede ve gerekse canlı vücudunda kimyasal insektisit birikimi meydana gelmektedir. Kimyasal insektisitlerin neden olduğu kirlenme, bir yandan ekosistemdeki dengeyi bozarken diğer yandan besin zincirine dahil olarak ölümlere neden olmaktadır. Diğer yandan böceklerdeki bağışıklık sistemi kimyasal insektisitlere karşı direnç meydana getirmektedir. Bu da kullanılan insektisit dozlarının arttırılmasına ve daha etkili, doğada daha uzun süre kalabilen ilâçların geliştirilmesine neden olmaktadır. Kimyasal insektisitlerin bu zararlı etkileri özellikle 1980'li yıllardan sonra ortaya çıkarılabilmiş ve başta DDT olmak üzere birçok ilâcın kullanımı yasaklanmıştır. Dolayısıyla kimyasal mücadele yöntemine alternatif olabilecek emniyetli olan biyolojik mücadele yöntemleri üzerinde yoğun olarak durulmaya başlanmıştır. Biyolojik mücadelenin kimyasal mücadeleye göre üstünlükleri aşağıdaki şekilde ortaya konabilir.

Buna göre;

a) Konukçu seçiciliği: Kimyasal insektisitlerin seçiciliği oldukça düşüktür. Dolayısıyla hedeflenen zararlıdan başka yararlı canlıların da ölümüne neden olmaktadır. Bu şekilde, doğadaki bazı biyolojik zincirlerde bozukluklar meydana gelmektedir. Biyolojik mücadelede ise etki spesifiktir ve sadece hedeflenen zararlı yok edilir.

b) İnsan ve diğer canlılar üzerine etki: Kimyasal insektisitler insan dahil bütün canlılar üzerinde zararlı etkiye sahiptir. Biyolojik mücadelede kullanılan biyoinsektisitlerin ise bu tip zararlı etkileri yoktur.

c) Çevre kirliliği: Kimyasal insektisitler çevrede kirlenmelere ve ekosistemde bozulmalara neden olmaktadır. Biyoinsektisit olarak kullanılan organizmaların bu tip etkileri yoktur. Ya da belirli bir riske sahip olanlar pratikte kullanılmamaktadır.

d) Konukçu direnci: Böcekler, kimyasal insektisitlere karşı zamanla direnç kazanmaktadır. Biyoinsektisitlere karşı direnç ise çok nadir meydana gelmekte ve gelse de biyoinsektisit olarak kullanılan organizmada meydana getirilen yeni genetik düzenlemelerle konukçu direnci ortadan kaldırılmaktadır.

e) Gen mühendisliği çalışmaları: Kimyasal insektisitlerin etkisi belirli bir dereceden daha fazla arttırılamazken biyoinsektisit olarak kullanılan organizmaların gen mühendisliğindeki yeni gelişmelerle daha fazla etkili hale getirilmesi mümkündür. Daha önemlisi, özellikle son yıllarda yapılan araştırmalarla biyoinsektisit olarak kullanılan organizmaların insektisidal aktiviteyi kodlayan gen/leri korunması istenen canlının genomuna dahil edilebilmekte ve bu canlı zararlılara karşı dirençli hale getirilebilmektedir.

Sivrisinekler, başta sıtma etmeni olmak üzere bazı hastalıkları taşımaları, insanları rahatsız etmeleri bakımından önem taşır. Sivrisineklerin beslenme ve üreme kaynakları tatlı sular ve bataklıklardır. Bu bölgelere bırakılan yumurtalardan sivrisinek larvaları çıkmakta ve larvalar birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü devreleri geçirdikten sonra prepupa ve pupa şeklinde olgunlaşmakta, daha sonra da ergin sivrisinek meydana gelmektedir. Sivrisineklerin bu hayat devreleri göz önüne alındığında, mücadelede 2 esas yolun ortaya çıktığı görülür. Bunlardan birincisi, ergin sivrisinek meydana gelmeden önce bataklıktaki veya su kaynağındaki mücadele; ikincisi ise ergin sivrisinek meydana geldikten sonraki devrede yapılan mücadeledir. Günümüzde, ergin sivrisineklerle mücadelede püskürtme yoluyla birçok kimyasal insektisit kullanılmaktadır. Bataklık devresinde yani sivrisinek larva devresinde iken, su yüzeyine bir film gibi yayılıp su içindeki canlıların havasızlıktan ölmesine neden olan bazı organik maddeler kullanılmaktadır.

Sivrisineklerle mücadelede, biyoinsektisitler kimyasal mücadeleye alternatif olarak özellikle son yıllarda bazı ülkelerde kullanılmaya ve üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Biyoinsektisitler sivrisinekleri larva devresinde iken öldürmekte ve bu şekilde ergin sivrisinek meydana gelememektedir. Larva devresinde yapılan mücadelenin ergin devrede yapılanaya göre daha kolay ve etkili

olduğu kesindir. Çünkü, larvaların hareket yetenekleri erginlere göre son derece sınırlı olduğu için mücadelede kolaylık sağlamaktadır.

Bugün, sivrisineklerle mücadelede kullanılan iki farklı bakteri türü mevcuttur. Bunlardan *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* preparat haline getirilmiş ve başta A.B.D. (Amerika Birleşik Devletleri) olmak üzere birçok ülkede sivrisinek habitatlarında uygulanmaya başlanmıştır. Ülkemizde *B.thuringiensis* ile ilgili çalışmalara başlanmış olup halen devam etmektedir (Boşgelmez vd 1983, 1984, Çakmakçı vd 1985). Sivrisineklerle mücadelede aday olan ve laboratuvar düzeyindeki ve kısmen de. arazi düzeyindeki araştırmalarla potansiyele sahip olduğu anlaşılan diğer bakteri ise *Bacillus sphaericus*'tur.

1.1. Böcek Patojeni *Bacillus* Cinsine Giren Bakterilerin Ayrım Anahtarı

Böceklerde patojen olan *Bacillus* cinsine giren türler şunlardır: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus larvae*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus popilliae* ve *Bacillus sphaericus*. Bu bakteriler bazı temel farklılıklarıyla birbirinden ayrılmaktadır. Ayrım anahtarı Tablo 1.1.'de verilmiştir (de Barjac 1981). Tablo 1.1. incelendiğinde, 3 farklı morfolojik grubun ortaya çıktığı görülür. Birinci grubu, şişkinlik meydana getirmeyen sporangiyumlar içerisinde eliptik sporeler içeren bakteriler oluşturur (*B.thuringiensis*). İkinci grubu, şişkinlik meydana getiren sporangiyumlar içerisinde oval veya eliptik sporeleri meydana getiren bakteriler (*B.popilliae*, *B. lentimorbus*, *B. larvae*); üçüncü grubu ise , şişkinlik meydana getiren sporangiyumlar içerisinde yuvarlak sporeler oluşturan bakteriler oluşturur (*B. sphaericus*).

1.2. *B.sphaericus* Suşlarının İzolasyonu, Teşhisi ve Karakterizasyonu

Sivrisinek larvaları üzerinde patojen etkiye sahip ilk *B. sphaericus* suşu California'dan (A.B.D.) toplanan *Culiseta incidens* larvalarından izole edilmiştir (Kellen ve Meyers 1964, Kellen vd 1965). Daha sonra da ölü sivrisinek larvalarından izole edilmişler-

Tablo 1.1. Böcek Patojeni *Bacillus* Türlerinin Ayrım Anahtarı
 ("The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. Classification and Identification" adlı kitaptan alınmıştır
 Editörler: R.C.W.BERKELEY ve M. GOODFELLOW).

A. Bakteriler geniş çubuk şeklindedir (Hücrelerin çapı $>1.0\mu\text{m}$).
 Şişkinlik meydana getirmeyen sporangiyumlar içerisinde
 eliptik sporeler bulundurur.

Yuvarlak, kare şeklinde veya şekli belirsiz parasporal
 kristaller mevcuttur.

Lepidoptera ve *Diptera* larvalarında patojendirler.

= *Bacillus thuringiensis*

B. Bakteriler daha küçük çomaklar şeklindedir (Hücrelerin
 çapı $<1.0\mu\text{m}$).

1. Şişkinlik yapan sporangiyumlar içerisinde eliptik
 sporeler bulundurur ve basit besiyerlerinde üremez.

Bazı *Coleoptera* larvalarında patojendirler.

Çeşitli şekillerde parasporal kristaller oluşturur.

= *Bacillus popilliae*

Parasporal kristaller bulunmaz.

= *Bacillus lentimorbus*

Parasporal kristaller bulunmaz. Bal arısı
 larvalarında patojendir.

= *Bacillus larvae*

2. Şişkinlik yapan sporangiyumlar içerisinde yuvarlak
 sporeler bulundurur. pH'i 6.0 olan basit besiyerlerinde
 bile gelişirler.

Birçok karbohidrat üzerine etki etmez.

Bazı suşları sivrisinek larvalarında patojendir.

= *Bacillus sphaericus*

dir (Singer 1973). Sivrisinek larvalarında patojen olduğu tesbit edilen *B.sphaericus* suş sayısı 1985 yılının sonunda 40'ı aşmış (E.W. Davidson 1985, yazılı görüşme), şu ana kadar da en az 50'yi bulmuştur. Bu suşların coğrafik orijinlerine bakıldığında, Asya ve Afrika'dan izole edilen suşların Amerika ve Avrupa'dan izole edilenlere göre daha fazla sayıda olduğu görülmüştür. Ekolojik orijinleri incelendiğinde ise, ölü sivrisinek larvalarından veya sivrisinek habitatlarından izole edilen suşların diğer orijinlerden izole edilenlere göre daha yüksek bir insektisidal aktiviteye sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır.

Değişik araştırmacılar tarafından farklı orijinlerden *B. sphaericus* suşları izole edilmiştir (Menon vd 1982a, Brownbridge ve Margalit 1986, Bursalıoğlu ve Öner 1987). Menon vd (1982a), *Culex fatigans*'ın laboratuvar kültüründe ölen larvalarından gram (+) ve yuvarlak sporlu bir basil izole etmişler; yaptıkları morfolojik, kültürel ve biyokimyasal incelemeler sonucunda bu bakterinin *B. sphaericus* olduğunu tesbit etmişlerdir. İzole edilen bu bakterinin *C.fatigans*'ın ikinci devredeki larvalarında patojen olduğu görülmüştür. Brownbridge ve Margalit ise (1986) İsrail'deki sivrisinek habitatlarından topladıkları dip çamuru ve toprak örneklerinden 19 adet *B.sphaericus* suşu elde etmişlerdir. Bu izolatların bakteriyofaj gruplarını tesbit etmişler ve 3 numaralı faj grubuna giren 2613, 2615, 2619 ve 2620 numaralı izolatların diğerlerine nazaran daha yüksek bir insektisidal aktiviteye sahip olduklarını görmüşlerdir. Bu araştırmacılar, toprak tiplerinin, su pH'ının, tuzluluğunun ve günlük sıcaklık değişimlerinin *B.sphaericus*'un canlılığı üzerine etki edebileceğini ileri sürmüşlerdir. Bursalıoğlu ve Öner (1987), Bandırma'dan (Balıkesir) 1982 yılında topladıkları toprak örneklerinden *B. sphaericus*'u izole etmişler ve *Culex sp.* larvalarında patojen olduğunu bulmuştur.

Son yıllarda yapılan bazı araştırmalarla, sivrisinek larvalarında patojen olan *B. sphaericus* suşlarının ölü sivrisinek larvası ve sivrisinek habitatlarından başka orijinlerden de izole edilebileceği görülmüştür (Lysenko vd 1985, Weiser 1984, de Barjac vd 1988). Lysenko vd (1985) tarafından yapılan bir incelemede tırtıllardan ve çekirgelerden izole edilen *B. sphaericus* izolatlarının izole edil-

dikleri bu canlılarda patojen olmadıkları halde sivrisinek larvalarında (*Culex quinquefasciatus*) patojen oldukları bulunmuştur. Aynı şekilde Weiser de (1984), 2362 numaralı *B. sphaericus* suşunu karasinekten (*Simulium damnosum*) izole etmiş ve sivrisinek larvalarında oldukça virulent olduğunu bulmuştur. De Barjac vd (1988) ise, salyangozlardan izole ettikleri *B.sphaericus*'un sivrisineklerde patojen olduğunu görmüştür. Fakat salyangozlarda patojen olup olmadığını test etmemiştir. Bu sonuçlar, sivrisinek patojeni *B. sphaericus* sularının sivrisinek larvaları ve sivrisinek habitatları dışında da bulunabileceğini göstermektedir.

Davidson (1982b), değişik araştırmacılarından topladığı bilgilerden faydalanarak 1982 yılına kadar sivrisinek larvalarında patojen olduğu tesbit edilen suşları, orijinlerini, bakteriyofaj gruplarını, serotiplerini ve virülenslerini (LC50) özetlemiştir (Tablo 1.2).

B. sphaericus'un ölü sivrisinek larvaları, diğer böcekler, toprak, su ve dip çamurundan izolasyonunda çeşitli araştırmacılar tarafından değişik besiyerleri ve metodlar kullanılmıştır. Bursalıoğlu ve Öner (1987), pastörizasyon ve zenginleştirmeden sonra TNA (Toprak ekstraktı karıştırılmış Nutrient Agar) besiyerini, Menon vd (1982a) ise ölü sivrisinek larvalarından izolasyonda NA (Nutrient Agar) besiyerini kullanmışlardır.

Bazı araştırmacılar tarafından da *B. sphaericus*'un izolasyonu için seçici besiyerleri geliştirilmiştir. *B.sphaericus* için seçici olduğu bildirilen ilk besiyeri Hertline vd (1979) tarafından geliştirilmiştir. Bu besiyerinin esası, *B. sphaericus*'un 10 mg/litre streptomisin konsantrasyonuna dirençli olmasına dayanmaktadır. Bundan sonra geliştirilen besiyerleri ise *B. sphaericus*'un 100 mg/litre streptomisin konsantrasyonuna direnci ve karbon kaynağı ihtiyacı esasına dayanmaktadır (Yousten vd 1982, 1985, Massie vd 1985). Yousten vd (1982), *B. sphaericus*'un sudan ve sedimentlerden izolasyonu ve sayımı için NYST agar (Nutrient Agar + Yeast Ekstrakt + Streptomisin Sülfat) besiyerini geliştirmiştir. Daha sonraki yıllarda ortaya konan bir başka besiyeri patojen *B. sphaericus* suşlarının gelişmesine izin verirken patojen olmayanların gelişmesini

Tablo 1.2. Sivrisinek Larvalarında Patojen Olan *B. sphaericus* Suşlarının Orijinleri, Bakteriyofaj Grupları, Serotipleri ve Virülensleri

| Suş | Orijin | Faj Grubu | Serotipi | İnsektisidal Aktivite LC50 ($\mu\text{g/ml}$) ¹ |
|------------|------------------|-----------|----------|--|
| Kellen K | Kalifornia (ABD) | 1 | H1 | 0.41 |
| Kellen Q | " " | 1 | H1 | 0.83 |
| SSII-1 | Hindistan | 2 | H2 | 0.29 |
| 1404 | Filipinler | 2 | H2 | 0.42 |
| 1883 | İsrail | 2 | H2 | - |
| 1885 | " | 2 | H2 | - |
| 1886 | " | 2 | H2 | - |
| 1887 | " | 2 | H2 | - |
| 1888 | " | 2 | H2 | - |
| 1889 | " | 2 | H2 | - |
| 1890 | " | 2 | H2 | - |
| 1891 | " | 2 | H2 | - |
| 1892 | " | 2 | H2 | - |
| 1893 | " | 2 | H2 | - |
| 1895 | " | 2 | H2 | - |
| 1896 | " | 2 | H2 | - |
| 1593 | Endonezya | 3 | H5a5b | 4.5×10^{-4} |
| 1691 | El Salvador | 3 | H5a5b | 7.4×10^{-5} |
| 1881 | " | 3 | H5a5b | 4.1×10^{-4} |
| 2013-6 | Romanya | 3 | H5a5b | 6.5×10^{-5} |
| 2117-2 | Filipinler | 3 | H5a5b | 1.0×10^{-4} |
| 2362 | Nijerya | 3 | H5a5b | 3.8×10^{-5} |
| 2297 (MR4) | Sri Lanka | 4 | H25 | 9.8×10^{-4} |
| ISPC5 | Hindistan | 4 | H25 | 9.1×10^{-3} |
| 2314-2 | Tayland | 4 | H25 | - |
| 2317-3 | " | 4 | H25 | 1.3×10^{-2} |
| ISPC6 | Hindistan | 4 | H25 | 7.2×10^{-3} |
| 1894 | İsrail | 5 | - | 1.9×10^{-2} |
| 2115 | Filipinler | 6 | - | 8.0 |
| 2118 | " | 7 | - | 7.4 |
| 2315 | Tayland | 8 | - | - |

1: Larvaların % 50'sini öldürebilmek için sivrisinek larvalarına verilmesi gereken liyofilize spor dozu

engellemektedir (Yousten vd 1985). BATS adı verilen bu besiyerinde (Biotin - Arjinin - Tiamin - Streptomisin - Tuz Besiyeri) inorganik tuzlardan başka C ve N kaynağı olarak arjinin ve seçiciliğini sağlamak için de 100 mg/litre oranında streptomisin sülfat bulunur. Yapılan incelemelerden, BATS besiyerinin *B. sphaericus*'un sivrisinek larvalarında patojen suşlarının gelişmesine izin verdiği halde, patojen olmayanların ise % 68'ini inhibe ettiği anlaşılmıştır. Diğer bir çalışmada da (Massie vd 1985), *B. sphaericus*'un topraktan izolasyonu için karbon kaynağı olarak sadece sodyum asetat bulunduran (37 veya 74mM) besiyeri tavsiye edilmiştir. Toprak örnekleri pastörize edilmediği zaman *B. sphaericus*'un yanında *Arthrobacter* türleri de kolaylıkla üreyebilmiştir. Pastörizasyonla bu türler elimine edilmiş ve bu besiyeri *B. sphaericus* için seçici hale getirilmiştir. Bütün bu sonuçlardan sonra E.W. Davidson tarafından *B. sphaericus*'un topraktan izolasyonu için NYST veya BATS besiyerlerinin kullanıldığı bir metod geliştirilmiştir (E.W. Davidson 1985, yazılı görüşme).¹

B. sphaericus'un teşhisi ve suşlarının ayrımı için değişik metodlar geliştirilmiş ve halen bu yöndeki çalışmalara devam edilmektedir. Morfolojik, kültürel ve biyokimyasal incelemeler oldukça fazla zaman aldığı ve maliyeti yüksek olduğu için serolojik testlerden, bakteriyofaj ilişkilerinden ve DNA homolojilerinden faydalanılabilmektedir (Krych vd 1980, de Barjac 1981, Yousten 1984, Yousten ve Hedrick 1982). Yukarıda bahsedilen metodlarla *B. sphaericus* teşhis edilebildiği gibi patojen olan ve olmayan suşlar birbirinden ayrılabilir. Singer vd (1986) ise patojen *B. sphaericus* suşlarının patojen olmayanlardan ayrılabilmesi için bazı enzimlerin kriter olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmış ve aminopeptidazların kullanılabileceğini ileri sürmüştür. Bu konudaki çalışmalar yeni başlamış olup henüz kesinlik kazanmamıştır.

1: E.W. Davidson, Arizona State University, Department of Zoology, Tempe, Arizona 85287 USA.

1.3. *B. sphaericus*'un Toksisitesi ile ilgili Çalışmalar

1.3.1. Toksin sentezi, yapısı ve yerleştiği yer

Singer (1980), *B. sphaericus*'un *B. thuringiensis*'tekinin aksine parasporal kristal oluşturmadığını, toksik aktivitenin hücre duvarı ile ilgili olduğunu ileri sürmüştür. Yine bu tip bir sonuç Myers ve Yousten (1980) tarafından da elde edilmiştir. Bu araştırmacılar *B. sphaericus* 1593 suşunu kullanarak hücreyi fraksiyonlarına ayırmışlar, ayrı ayrı sivrisinek larvalarına karşı denemişlerdir. Sonuçta, en yüksek toksik aktiviteye sahip olan fraksiyonun hücre duvarı olduğu görülmüştür. Çözülebilir sitoplazma ve hücre zarı fraksiyonları ise hücre duvarına göre daha az bir toksisiteye sahiptir. Bu araştırmacılar hücre duvarındaki toksinin bir protein olabileceğini ileri sürmüştür.

Tinelli vd (1980), *B. sphaericus* 1593 sporlarından *Anopheles stephensi* larvalarında 24 saat içerisinde % 100 ölüme neden olan bir toksin izole etmişlerdir. Bu toksinin protein tabiatında, yüksek molekül ağırlığına sahip ve spor ceketinin dışında yerleşmiş olduğu görüşüne varılmıştır. Davidson (1982a) da *B. sphaericus* 1593'ün sporlanmakta olan hücrelerinden sitoplazmada çözülmüş olarak bulunan ve 100 kD (kilo Dalton) molekül ağırlığına sahip bir proteini izole ederek sivrisinek larvalarına karşı toksik olduğunu göstermiştir. Tinelli ve Bourgouin (1982)'de *B. sphaericus* hücrelerinden *A. stephensi* larvalarına karşı toksik olan bir ham ekstrakt elde etmiştir. Bu ekstraktın bir veya birden fazla protein içerebileceği görülmüştür. Bunlardan 7 numara ile işaretlenen fraksiyonun sivrisinek larvalarına karşı toksik olduğunu ve bu fraksiyonun 55 ve 25 kD molekül ağırlığında olan iki adet protein içerdiğini tesbit etmiştir. Bu toksin ile Davidson (1982a) tarafından izole edilen 100 kD'luk protein birbirinden farklıdır.

Yapılan bazı araştırmalarla da *B. thuringiensis*'tekine benzer şekilde toksin kristallerinin bulunup bulunmadığı incelenmiş ve toksik aktivite ile ilişki kurulmaya çalışılmıştır (Davidson ve Myers 1981, Yousten ve Davidson 1982, Payne ve Davidson 1984). Davidson ve Myers (1981), 8 adet patojen, 5 adet de patojen olmayan *B. sphaericus* suşunu parasporal kristallerin varlığı yönünden ince-

lemiş ve patojenlikle ilişkilerinin olup olmadığını araştırmıştır. Bu çalışmada yüksek virülense sahip olan 1593, 2013-4, 1691 ve MR4 (=2297) suşları ile bunlara nazaran daha düşük virülense sahip olan SSII-1, 1404-924B, 1888, Kellen Q suşları ve patojen olmayan 7054, 717, 14577, 10208 ve 9602 numaralı suşlar incelenmiştir. Sonuç olarak sporulasyonla ilişkisi olduğu bilinen çok kenarlı bir kristalin yüksek virülensi sağladığı sonucuna varılmıştır. Yousten ve Davidson da (1982) *B. sphaericus* 2297 suşundaki parasporal kristalin sivrisinek larvalarına karşı toksik olduğunu ve bu kristalin teşekkülü ile birlikte bakterinin toksik etkisinin oldukça arttığını elektron mikroskopu çalışmaları ile de göstermiştir. Payne ve Davidson ise (1984) *B. sphaericus* 1593'ün spor kompleksini fraksiyonlara ayırmış ve bu fraksiyonları *C. quinquefasciatus*'un ikinci devre larvalarına karşı test etmiştir. Kristal şeklindeki parasporal cisimciklerin en yüksek toksik aktiviteye sahip fraksiyonda toplandıkları görülmüştür. Buna karşılık sporangiyum, ekzosporium ve sporları içeren fraksiyonlar ise daha düşük bir toksisiteye sahiptir. Bu sonuçlar, kristal oluşturan *B. sphaericus* suşlarının başlıca toksin kaynağının kristaller olduğunu göstermektedir.

Özellikle son yıllardaki araştırmalar, *B. sphaericus* toksininin kimyasal yapısı, sentezi ve genetiğine yönelmiş olup bu konuda kısa sürede önemli sayılabilecek ilerleme kaydedilmiştir (Baumann vd 1985, 1986, Broadwell ve Baumann 1986, Bowditch vd 1989). Baumann vd (1985, 1986), *B. sphaericus* toksininin 43 kD olduğunu ve larvalardaki sindirim sonucunda toksin molekül ağırlığının 40 kD'a düştüğünü göstermiştir. Molekül ağırlığındaki 2-4 kD'luk bu düşüşün toksinin aktifleştirilmesi için gerekli olduğunu ileri sürmüştür. Araştırmacılar toksinin sentez mekanizmasını açıklayabilmek için *B. sphaericus* 2362 suşunu, kültürden değişik zamanlarda örnekler alarak incelemiştir. Bu örneklerdeki proteinler kristal proteinlere karşı daha önceden hazırlanmış olan antiserumlarla serolojik olarak teşhis edilmişlerdir. Bu araştırmaya göre, bakteri hücrelerinde ilk oluşan protein 125 kD'luktur. Kırksekiz saat sonra ise en fazla bulunan proteinler 43, 63 ve 110 kD'luk proteinlerdir. Bu anda 98 ve 125 kD'luk proteinlerin miktarı azalmıştır. Yaklaşık olarak 7 saat sonra ise kristallerde sadece 43 ve 63 kD'luk proteinlerin mevcut olduğu, buna

karşılık 125 ve 110 kD'luk proteinlerin miktarının azaldığı görülmüştür. 43 ve 63 kD'luk proteinlere karşı antiserumlar hazırlanmış ve bu iki proteinin serolojik olarak birbirlerinden farklılık göstermelerine rağmen 98, 110 ve 125 kD'luk proteinlerle antijenik determinantları yönünden benzer oldukları görülmüştür. Bu sonuçların ışığı altında, 125 kD'luk proteinin bir seri parçalanma reaksiyonu sonucunda, önce 110 kD'luk ve daha sonra da 63 ve 43 kD'luk alt birimleri meydana getirdiğine dair bir hipotez kurulmuştur. Saflaştırılan 43 ve 110 kD'luk proteinler *Culex pipiens*'in ikinci - üçüncü devredeki larvalarına karşı toksik bulunmuştur. Larvalarda biriken proteinin ise 40 kD'luk olduğu görülmüştür. Bu durumda, 43 kD'luk protein larva bağırsak proteolitik enzimleri tarafından 40 kD'luk forma dönüştürülmektedir. Yapılan toksisite denemeleri 40 kD'luk proteinin 43 kD'luk proteine göre çok daha fazla toksik olduğunu göstermiştir.

Broadwell ve Baumann (1986), *B. sphaericus* 2362 suşundan 110 kD'luk proteini izole etmişler ve bu proteinin *C. pipiens* larvalarına karşı toksik olduğu halde *C. quinquefasciatus*'un doku kültürü hücrelerine karşı toksik olmadığını tesbit etmiştir. Buna karşılık 43 kD'luk proteinin ise doku kültüründeki hücrelere karşı toksik olduğunu görmüştür. Araştırmacılar bu sonuçlardan sonra 110 ve 125 kD'luk proteinlerin protoksin olduğunu ve sporulasyon sırasında 43 kD'luk forma dönüştürüldüklerini ileri sürmüştür. Araştırmacılar ayrıca kristal toksin sentezinin, üssel gelişme devresinin sonunda başladığını ve 7 saat sonra tamamlandığını tesbit etmiştir.

Bowditch vd (1989), daha önceki araştırmalarda toksin prekürsörü olarak ileri sürülen *B. sphaericus* 2362'den elde edilen 125 kD'luk proteini kodlayan geni *Escherichia coli* içerisinde klonlamıştır. Sonuçta 125 kD'luk proteinin toksin kristali ile herhangi bir ilişkisinin olmadığı, bu proteinin hücre duvarındaki S(yüzey) tabakasında hücrenin her devresinde mevcut olduğu görülmüştür. Bu araştırmacılara göre daha önceki araştırmalarda 125 kD'luk proteinin 110 kD'luk protein için prekürsör olarak gösterilmesinin nedeni kullanılan ekstraksiyon ve saflaştırma metodlarının yetersizliğinden dolayı bu proteinin ekstrakta karışmış olmasına bağlanmaktadır. Bu araştırmanın sonunda 122 kD'luk proteinin 110 kD'luk için prekürsör

olduğu, daha sonra da 42 ve 51 kD'luk proteinlerin meydana geldiği grlşine varılmıştır. Western Blotting ve immunostaining metodları kullanılarak, aynı araştırıcılar daha önce 42 ve 51 kD'luk proteinlere karşı hazırladıkları antiserumların (Baumann vd 1985) 122 ve 110 kD'luk proteinlerle çapraz reaksiyon verdiklerini grmştir. Bu çalışmada, kristallerde esas olarak bulunan proteinlerin 42 ve 51 kD'luklar olduğu gösterilmiştir.

Bir başka çalışmada da *B. sphaericus* 2362 veya 2297'deki 41.9 kD'luk proteini kodlayan genler *E. coli*'de klonlanmış, fakat bu hücrelerin *Culex* sp. larvalarına karşı toksik olmadığı, ancak 51.4 kD'lugu da birlikte ürettiği takdirde toksik olduğu ileri srlmştir (Baumann vd 1987). Toksik olmayan 51.4 kD'luk proteinin 41.9'luk proteinin davranışını ne şekilde etkilediği açıklanamamıştır.

Davidson ise (1987), *B. sphaericus* toksininin parasporal bir kristal halinde bulunduğunu fakat aynı zamanda bakteri hücresinin diğer yapılarında da yerleşebileceğini savunmaktadır.

1.3.2. Toksinin etki mekanizması

Menon vd (1982b), *B. sphaericus* (ISPC)'un *C. fatigans* zerine toksik ve histopatolojik etkisini incelemiş, ölüm belirtisini tanımlamıştır. Bakteri sivrisinek larvalarının sadece sindirim kanalına etki etmekte olup bu bölgede çoğalmaktadır. Ölüm olayı bir infeksiyondan ziyade toksisite ile ilgilidir. Toksisite sonucunda ölen larvalar siyahlaşmış ve şişmiştir. Toksisite, sonikasyondan, devamlı pasajdan, oda sıcaklığında ve soğuk şartlarda saklamaktan etkilenmemiştir.

B. sphaericus toksininin sivrisinek larva sindirim kanalı hücreleri üzerine olan toksik etkisi özellikle son 2-3 yılda çalışılmış, belirli oranda aydınlatılmıştır (Davidson 1986, 1987, Davidson vd 1987a, 1987b, Davidson ve Titus 1987).

Davidson (1986), *B. sphaericus* 1593 ve 2362 suşlarının spor/kristal toksininin sivrisinek hücre kültürü üzerine etkisini incelemişlerdir. 2362 suşunun toksinine karşı hazırlanan antiserumun gerek

işaretlenmiş *B. sphaericus* toksini ve sekonder antikor teknikleri kullanılarak, toksinin duyarlı olan *C. quinquefasciatus* hücrelerine oldukça kuvvetli bir şekilde bağlandığı halde duyarlı olmayan larva sindirim kanalı hücrelerine ise daha gevşek bağlandığı gösterilmiştir. Yaptıkları incelemede, toksinin endositozla ve reseptör aracılığı ile içeri alındığı, reseptörün de muhtemelen N-Asetil D-Glukozamin içeren bir glikoprotein olduğunu göstermişlerdir. Toksinin hücre zarındaki lipidlere bağlandığına dair hiç bir delil bulunamamıştır. Sonuç olarak, toksin larva sindirim kanalındaki epitel hücre zarlarında büyük porların meydana gelmesine neden olmakta ve zar fonksiyonu bozulan hücreyi ölüme götürmektedir. Davidson ve Titus da (1987) toksinin *C. quinquefasciatus* larva hücrelerinde organel seviyesindeki etkisini incelemiştir. Toksinin etkisi ile mitokondri kristallarının, endoplazmik retikulumların ve golgi salgı keseciklerinin genişleyip açıldığı ve mitokondrilerin bir araya toplandığı görülmüştür. Hücrede çok sayıda sitolizozomlar meydana gelmiş ve toksinin etkisiyle hücre zarı yavaş yavaş ortadan kalkmıştır.

1.3.3. Toksik aktivite ile sporulasyonun ilişkisi

Toksisite ile bakteri sporulasyonunun ilişkisinin olup olmadığını açıklayabilmek için değişik *B. sphaericus* suşları ile çalışılmış ve bu durumun suşlara göre değiştiği tesbit edilmiştir (Myers ve Yousten 1978, Myers vd 1979, Menon vd 1982a, Yousten ve Davidson 1982, Kalfon vd 1984, Charles 1986).

Myers ve Yousten (1978), *B. sphaericus* SSII-1 suşunun sivrisinek larvalarına karşı olan öldürücü etkisinin bir infeksiyondan ziyade bir toksisite olayı olduğunu ileri sürmüştür. Çünkü bakteri hücreleri kloroform veya ultraviyole ile muamele edildiklerinde canlılıklarını kaybettikleri halde larvasidal aktivitelerini kaybetmemiştir. SSII-1 suşunun larvasidal aktivitesi ile sporulasyonu arasında hiç bir ilişki bulunamamıştır. Elektron mikroskopik çalışmalar, sitoplazmada, SSII-1 suşunun toksisitesi ile ilgili olabilecek herhangi bir cisimciğin mevcut olmadığını göstermiştir. Ayrıca bakterinin üretildiği besiyeri filtre edilmiş ve süpernetantın toksik aktivite göstermediği tesbit edilmiştir. Araştırmacılar bu sonuçların

ışığı altında, SSII-1 suşundaki toksisitenin hücre yapısı ile ilgili olması gerektiğini ileri sürmüştür.

Myers vd (1979), SSII-1 ve 1593 suşlarını virülens yönünden karşılaştırmış ve 1593'ün SSII-1'e nazaran 3000 defa daha fazla toksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, SSII-1 suşunun toksisitesi gelişme boyunca sabit kaldığı halde 1593 suşunda sporulasyonun başlamasıyla birlikte toksisitede büyük bir artış görülmüştür. Bu araştırmada da SSII-1 ve 1593'ün elektron mikroskopik incelemelerinde herhangi bir kristale rastlanmamıştır. Menon vd (1982a)'de izole ettikleri *Bacillus* (ISPC5) izolatının sporulasyon devresinde iken *C. fatigans* larvalarını hızlı bir şekilde öldürdüğünü gözlemiştir.

Yousten ve Davidson (1982), *B. sphaericus* 2297 suşu ile çalışmış ve sporları kaynatarak nispeten toksik olmayan spor inokulumu hazırlamıştır. Üssel gelişme devresinin başlangıcındaki ve sonundaki bakteri suspansiyonlarının *C. quinquefasciatus* larvalarına karşı olan toksik aktivite seviyelerini tesbit etmiştir. Toksik aktivitenin üssel gelişmenin başlangıç devresinde 30 defa, geç devresinde ise 1000 defa arttığı gözlenmiştir. Araştırmacılar, toksisitedeki bu artışın bakterinin sporulasyonu ve bu olayla birlikte yürüyen parasporal toksin kristallerinin teşekkülü ile ilgili olduğunu ileri sürmüştür. Bu görüşlerini ispatlayabilmek için ise sporları ve parasporal kristalleri sivrisinek larvalarına yedirmiş ve 15 dakika sonra larvaları elektron mikroskopunda inceleyerek toksin kristallerinin larva bağırsağında çözüldüğünü göstermiştir.

Kalfon vd (1984) tarafından, *B. sphaericus* 2297 suşunun sporulasyonu senkronize edilmiş sıvı kültür ile çalışılmıştır. Buna göre sporulasyon, gecikme (lag) fazından 7 saat sonra başlamaktadır. Kristal yapılar ise daha sonra ortaya çıkmakta (9. saat), son büyüklüklerine ise 12-13 saat sonra ulaşmaktadır. 22 saat sonra da spor/kristal kompleksi serbest kalmakta ve besiyerine karışmaktadır. Araştırmacılar 24 saat sonraki bakteri kültürünün sadece vejetatif hücreler bulunduran daha genç kültüre göre yaklaşık olarak 100.000 defa daha fazla toksik ve bunun da parasporal kristallerin yapımı ile ilgili olduğunu göstermiştir.

Charles da (1986) *B. sphaericus* 2297 suşunun sporulasyonu ile toksik aktivitenin ilişkili olduğunu bildirmiştir. Sporulasyonun son devresindeki toksisitenin sporulasyonunun başlangıç devresine göre 10.000 - 100.000 defa daha fazla olduğunu, bunun da toksin kristallerinden ileri geldiğini göstermiştir.

1.3.4. Toksin sentezinin genetiği

Krych vd (1980), *B. sphaericus* suşları arasındaki DNA homolojilerini araştırmak için *B. sphaericus*'un 62, *Bacillus pasteurii*'nin 4, *Bacillus brevis*'in 6, *Bacillus globisporus*'un ve *Bacillus aminovorans*'ın 1 suşunu incelemiştir. Sonuçta 5 farklı DNA homoloji grubunun ortaya çıktığı görülmüştür. Sivrisinek larvalarında patojen olduğu bilinen bütün *B. sphaericus* suşlarının DNA homoloji grubu IIA'ya girdikleri görülmüştür. Bu sonuçlar patojen *B. sphaericus* suşlarında toksin sentezini determine eden homolog DNA bölgelerinin varlığını göstermektedir.

Abe vd (1983), *B. sphaericus*'un farklı suşlarındaki plazmidleri incelemişler ve plazmid tipleri ile larvasidal etki arasında bir ilişkinin olup olmadığını araştırmışlardır. Araştırmacılar patojen olmayan ve virülensi değişik 6 adet *B. sphaericus* suşunda plazmid tiplerini tayin etmişler ve patojenlikle plazmid bulunuşu veya tipleri arasında herhangi bir ilişki bulamamıştır.

Genesan vd (1983) tarafından *B. sphaericus*'un aktivitesini kodlayan DNA segmenti, vektör olarak pHV33 plazmidini kullanılarak *E. coli*'de klonlanmış ve *E. coli* hücrelerinin larvasidal aktivite kazandıkları görülmüştür.

Louis vd de (1984), *B. sphaericus*'un biosidal genini prob olarak kullanarak patojen olan ve olmayan suşlarını homolog DNA dizileri yönünden incelemişlerdir. Patojen suşların patojen olmayanlardan farklı olarak 6.6, 6.4, 5.8, 1.6, 1.3 ve 0.6 kB (kilo baz)'lık DNA dizilerine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, hibridizasyon kalıpları yönünden, virülensi oldukça düşük olan suşlar yüksek virülense sahip olanlardan kesin farklılıklar göstermişlerdir. Araştırmalar bu prob ile incelenen *B. thuringiensis*'in iki suşunun

(var. *berliner* ve var. *israelensis*) homolog bölgeye sahip olmadığını göstermiştir.

Mc Donald ve Burke (1984), *B. subtilis*'den izole ettikleri pUB110 (neomisine direnç genlerini taşır) plazmidini ve pBC16 (tetrasikline direnç genlerini taşır) plazmidini *B. sphaericus* 1593 suşuna aktarmıştır. Araştırmacılar *B. sphaericus* transformantlarından bazılarının *C. pipiens* var. *quinquefasciatus* larvalarına karşı daha fazla toksik hale geldiğini tesbit etmişler ve *B. sphaericus* ile yapılacak bundan sonraki genetik çalışmalarda bu iki plazmidin kullanılabilceğini ileri sürmüşlerdir.

Bir başka çalışmada da *B. sphaericus* 1593'ün toksin geni *Anacystis nidulans*'da (*Cyanobacterium*) klonlanmış, fakat toksisitenin 100 defa daha düşük olduğu görülmüştür (Tandean de Marsac vd 1987).

1.3.5. *Bacillus sphaericus*'un toksisitesini etkileyen faktörler

B. sphaericus'un larvalara etkisini azaltan veya arttıran şimdiye kadar incelenmiş olan faktörleri 3 ana grup halinde toplamak mümkündür: a) Bakteriden kaynaklanan faktörler. b) Konukçudan kaynaklanan faktörler. c) Çevreden kaynaklanan faktörler.

a) Bakteriden kaynaklanan faktörler

a.a. Bakteri suş farkının etkisi: Yapılan bazı araştırmalarla bakteri suş farkının toksisiteyi etkileyen birinci derecede faktör olduğunu göstermiştir (Myers vd 1979, Davidson ve Myers 1981). Myers vd (1979), *C. pipiens quinquefasciatus*'un ikinci devredeki larvalarıyla yaptıkları denemede *B. sphaericus* 1593 suşunun SSII-1 suşuna göre 3000 defa daha fazla toksik olduğunu tesbit etmişlerdir. Davidson ve Myers (1981) tarafından bazı *B. sphaericus* suşlarının insektisidal aktiviteleri özetlenmiştir (Tablo 1.3).

b. Konukçudan kaynaklanan faktörler

b.a. Sivrisinek tür farkının etkisi: Ramoska ve Pacey (1979), *C. quinquefasciatus* larvalarının *Anopheles albimanus* larva-

larına nazaran *B. sphaericus*'a karşı çok daha fazla duyarlı olduklarını göstermişlerdir. Lacey ve Singer de (1982), sivrisinek tür farkının toksisite üzerine etkisini gösterebilmek için *B. sphaericus*'un 2013-4 ve 2013-6 numaralı suşlarını kullanmışlardır. Bulunan sonuçlar Tablo 1.4'de gösterilmiştir (Davidson 1982b). Tablo 1.4. incelendiğinde *Culex*, *Anopheles* ve *Psorophora* türlerinin *Aedes* türlerine nazaran daha fazla duyarlı olduğu görülmüştür.

Tablo 1.3. Bazı *Bacillus sphaericus* Suşlarının İnsektisidal Aktiviteleri

| Suş | LC50 (cfu/ml) ¹ |
|-------------|----------------------------|
| 1593 | 2.5x10 ² |
| 2013-4 | 5.6x10 ² |
| 1691 | 2.4x10 ² |
| MR4 (=2297) | 6.5x10 ¹ |
| SSII-1 | 2.5x10 ⁸ |
| 1404-924B | 5.7x10 ⁶ |
| 1888 | 5.5x10 ⁶ |
| Kellen Q | 1.9x10 ⁶ |
| 7054 | Patojen değil |
| 717 | " |
| 14577 | " |
| 10208 | " |
| 9602 | " |

1: *C. quinquefasciatus* larvalarının %50'sini öldürmek için sivrisineklere verilmesi gereken bakteri dozu (ml'deki koloni oluşturan birim sayısı)

Tablo 1.4. *Bacillus sphaericus* 2013-4 ve 2013-6 Preparatlarının Farklı Sivrisinek Türlerine Etkileri.

| Sivrisinek Türü | LC50(ppb) ¹ |
|----------------------------------|------------------------|
| <i>Culex quinquefasciatus</i> | 1.5 ² |
| <i>Anopheles albimanus</i> | 18.7 ² |
| <i>Anopheles quadrimaculatus</i> | 52.7 ² |
| <i>Aedes triseriatus</i> | 94.1 ³ |
| <i>Psorophora columbiae</i> | 4.6 ³ |

1: Liyofilize bakteri dozu (milyarda 1 kısım).

2: 2013-4 ve 2013-6 suşlarının etkileri aynıdır.

3: Sadece 2013-4 suşu test edilmiştir.

b.b. Larva devresinin etkisi: Tsuchiyama (1980), *B. sphaericus* SC1713 suşunu *C. pipiens*'in farklı devrelerdeki larvalarına karşı denemiş ve larva yaşındaki artışla LC50 değerinin arttığını, yani larvaların bir miktar direnç kazandıklarını tesbit etmiştir. Birinci, ikinci-üçüncü ve dördüncü devredeki sivrisinek larvaları için tesbit edilen LC50 değerleri (hücre/ml) sırasıyla 2.3×10^4 - 2.0×10^5 , 4.8×10^5 - 5.2×10^6 ve 1.5×10^6 - 1.0×10^7 olarak bulunmuştur. Wraight vd de (1981a), laboratuvarında üretilen ve araziden toplanan *C. pipiens pipiens* larvalarına karşı *B. sphaericus* 1593 suşunu denemişlerdir. Laboratuvarında üretilen larvaların yaşlarındaki artış ile LC50 değerleri değişmemiştir. Buna karşılık araziden toplanan larvalardaki yaş artışı ile *B. sphaericus*'un etkisi azalmıştır. Araştırmacılar, bu farklılığın arazi ve laboratuvar şartları arasındaki fiziksel ve kimyasal faktörlerin meydana getirdiği metabolik ve anatomik farklılıklardan ileri gelebileceğini ileri sürmüşlerdir.

c. Çevreden kaynaklanan faktörler

c.a. Direkt güneş ışığı ve UV'nin etkisi: Myers vd (1979) UV'nin ve kloroform muamelesinin *B. sphaericus*'un (SSII-1 suşu) toksisitesini değiştirmediği halde bakteri hücrelerini öldürdüğünü tesbit etmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada ise UV ışığına belirli süreler maruz bırakılan *B. sphaericus* sporları *C. quinquefasciatus*'un ikinci devredeki larvalarına karşı denenmiştir. (Burke 1983). Bu çalışmada bakterinin hem larvasidal etkisi ve hem de spor canlılığı incelenmiştir. 10.800 J/M^2 'lik UV ışığına maruz bırakılan kültürlerdeki canlı spor sayısı 7.5 dakika sonra 3.7×10^7 spor/ml yoğunluktan 10^4 yoğunluğuna düşmüştür. 4 saat sonra ise ml'deki canlı spor sayısı 50'nin altına düşmüştür. Sonuçta, UV ışığının bakterinin sporlarının canlılığını azalttığı halde toksik aktivitesini etkilemediği görülmüştür. Mulligan vd (1980) direkt güneş ışığının *B. sphaericus*'un toksik aktivitesini yok ettiğini tesbit etmişlerdir.

c.b. Besin ve diğer faktörler: Ramoska ve Pacey (1979), larvalara verilen besin miktarı ile *B. sphaericus*'un toksik aktivitesinin ters bir ilişki gösterdiğini tesbit etmişlerdir. Tsuchiyama (1980)'da *B. sphaericus* SC1717 suşu ile çalışmış ve *C. pipiens* larvaları besinsiz bırakıldıkları zaman LC50 değerinin düştüğünü gözle-

mişlerdir. Fermentörde yapılan diğer çalışmalarda da besiyerine verilen havadaki oksijen gazı oranının %100'e yükseltilmesi durumunda *B. sphaericus* 1593 sporulasyonunun ileri bir devrede bloke edildiği, buna karşılık toksin sentezinin etkilenmediği görülmüştür (Yousten vd 1984a, 1984b). Goldberg vd (1977)'de mikrobiyal floranın *B. sphaericus* SSII-1 suşunun *C. pipiens*'e olan toksik aktivitesini etkilediğini bildirmişlerdir.

c.c. Besiyerinin etkisi: Menon vd (1982a), farklı besiyerlerinde geliştirilen *B. sphaericus* ISPC5 suşunun *C. fatigans*'ın ikinci devredeki larvalarına karşı etkisini incelemişler ve Tablo 1.5.'deki değerleri bulmuşlardır. Besiyerleri karşılaştırıldığında, en uygun besiyerinin NB ve NEM olduğu görülür.

Myers vd ise (1979), *B. sphaericus* ile yaptıkları deneyde NYSM (Nutrient Broth + Yeast Extract + Salts Medium)'dan Ca^{++} , Mg^{++} ve Mn^{++} iyonları çıkarıldığı zaman sporulasyonda düşüş ve buna bağlı olarak da LC50 (cfu/ml) dozunda artış bulmuşlardır. ml'deki spor sayısı 7×10^7 'den 1.4×10^5 'e düşerken LC50 dozu 1.5×10^2 'den 3.3×10^5 'e yükselmiştir.

Tablo 1.5. Besiyerlerinin *B. sphaericus* ISPC5'in Toksisitesi Üzerine Etkisi

| Bakteri Kültürünün Yaşı (saat) | LC50 ($\times 10^4$ cfu/ml) | | | |
|--------------------------------|------------------------------|------|-------|--------|
| | NB | NEM | YEGPB | BHIB |
| 21 | 2.58 | 9.17 | 45.50 | 62.90 |
| 24 | 2.28 | 7.52 | 61.60 | 109.00 |
| 27 | 2.12 | 5.68 | 70.60 | 80.80 |
| 30 | 1.66 | 1.89 | 52.80 | 85.20 |
| 48 | - | - | 2.03 | 2.58 |
| 54 | - | - | - | 17.00 |
| 72 | - | - | - | 19.50 |

NB : Nutrient Broth

YEGPB: Yeast Extract + Glukoz + Phospate Broth

NEM : Nutrient Broth + %3 Molasses

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

Dharmsthiti vd (1985), *B. sphaericus*'un kültürü için H7 adında yeni bir besiyerini tavsiye etmişlerdir. Bu araştırmacılar H7 besiyerinin *B. sphaericus*'un fermentasyonu için daha önce kullanılan NYSM besiyerine nazaran daha uygun olduğunu ileri sürmüşlerdir. % 7 oranında HDL (Monosodyum glutamat faktöründen elde edilen hidrolize çözelti) içeren H7 besiyeri NYSM besiyerine göre; 1) Daha ucuza mal edilmekte (10 litre besiyeri için 0.03 Dolar'a karşılık 11.67 Dolar), 2) *B. sphaericus*'un gelişmesini ve yeteri düzeyde toksik aktivite kazanmasını temin etmekte, 3) Daha kolay hazırlanabilmektedir.

c.d. Sıcaklığın etkisi: Wraight vd (1978), *B. sphaericus* SSII-1 suşunun farklı sıcaklıklarda *Aedes stimulans* larvalarına karşı etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar 27°C'deki LC50 dozunu 7.23×10^6 hücre/ml bulurlarken, 15-18°C'de bu dozun 4 misli arttığını tesbit etmişlerdir. LC95 değerleri (larvalarının % 95'ini öldürmek için gerekli olan ml'deki spor/hücre sayısı) karşılaştırıldığında ise, 15-18°C'deki LC95 dozu 27°C'dekine göre 5.8 misli artmıştır. Wraight vd (1981b), *B. sphaericus* 1593'ün araziden toplanan *Ae. stimulans* larvalarına karşı toksik etkisinin sıcaklığın düşürülmesi ile önemli ölçüde azaldığını tesbit etmişler ve *B. sphaericus*'un daha ziyade ılıman bölgelerde uygulanması gerektiğini ileri sürmüşlerdir.

c.e. pH'in etkisi: Mulligan vd (1980), *B. sphaericus*'un Stauffer MW-716 nolu toz preparatını kullanarak değişik pH derecelerinin bakterinin toksik aktivitesi üzerine etkisini incelemişlerdir. pH 10.00'a tamponlandığı zaman toksik aktivitenin ortadan kalktığı gözlenmiştir. Bunun için *C. quinquefasciatus*'un ikinci - üçüncü devredeki larvalarını kullanmışlardır. Yousten vd de (1984a) fermentördeki pH'ın nötral tutulması durumunda ise *B. sphaericus* 1593'ün toksik aktivitesinde 10 katlık bir artışın elde edildiğini bildirmişlerdir.

1.4. *Bacillus sphaericus*'un Formülasyonu ve Arazi Denemeleri

B. sphaericus'un toz preparat haline getirilmesi ve arazi denemeleri oldukça yenidir. *B. sphaericus*'un formülasyonuna ilk olarak 1985 yılında başlanmıştır (Mulla 1986). *B. sphaericus*'un 1593

susu kullanılarak Pasteur Enstitüsündeki Biyolojik Mücadele laboratuvarında RB80 kodlu bir preparat üretilmiş, daha sonra da *B. sphaericus* 2297 suşundan RB80'e göre daha etkili olduğu bildirilen SPH84 preparatı aynı laboratuvarında üretilmiştir (Thiery 1986).

Mulligan vd (1978), *B. sphaericus* 1593 suşunun, Kern County'deki *C. tersalis* populasyonunu arazi şartlarında gayet iyi bir şekilde kontrol ettiğini görmüştür. Bu kültürden WP adlı bir preparat geliştirilmiştir. Laboratuvarında iyi sonuçlar alınmasına rağmen, arazi denemelerinde *Aedes* türleri ile beklenen sonuçlar alınamamıştır. Aynı çalışmada 5×10^4 spor/ml konsantrasyonda bile sivrisineklerle biyolojik mücadelede kullanılan *Gambusia affinis affinis* (Baird and Girard) balıklarının zarar görmediği rapor edilmiştir.

Mulla (1986), *B. thuringiensis* var. *israelensis*'in 0.11-0.5 kg/hektarlık dozlarının *Culex*, *Aedes* ve *Psorophora* larvalarını %95 - 100 oranında kontrol ettiğini gözlemiştir. *B. sphaericus*'un ise *Culex* larvalarına karşı daha yüksek bir etkiye sahip olduğu ve 0.1 - 0.2 kg/hektarlık uygulamaların larva populasyonunu %95-100 oranında kontrol ettiği bulunmuştur. Araştırmacı, arazi deneme sonuçlarını veya uygulanması gereken dozu sivrisinek tür farkının, suyun akışkanlığının, su derinliğinin, kirliliğinin, bitki florasının ve bakteri doğal zararlılarının etkilediğini ileri sürmüştür.

Davidson vd (1984) tarafından *B. sphaericus* 1593 ve 2362 suşlarından hazırlanan toz preparatlar *C. tersalis* ve *Anopheles franciscanus* larvalarına karşı arazide uygulanmıştır. *C. tersalis*'in en iyi kontrolü 0.122 ve 0.244 kg/hektar dozunda ortaya çıkmıştır. *B. sphaericus* sporları hızlı bir şekilde dip çamuruna çökmektedir. Bu çalışmada, *B. sphaericus*'un hem laboratuvarında ve hem de arazi koşullarında ölü larvalarda ürettiği ve spor sayısında 100-1000 defalık artışların olduğu tesbit edilmiştir.

Becker ve Metz (1986), Batı Almanya'da 60'dan fazla kasaba ve yerleşim yerinde sivrisineklerin kontrolü için *B. thuringiensis* (H14)'in yanında *B. sphaericus* 2362 suşunun da uygulandığını bildirmektedirler.

Nicolas (1986), Batı Afrika'daki Ivory kıyısında *C. quinquefasciatus* larvalarına karşı *B. sphaericus* 2362'nin bir preparatını 10 gr/m² yoğunluğunda uygulamıştır. 5-6 hafta içerisinde larva popülasyonu % 100 azalmıştır. Sporların 6 saat içerisinde bütün su yüzeyine yayıldığı gözlenmiştir. *B. sphaericus* sporlarının ölü larvalarda ürediği ve 72 saat içerisinde larva başına 10⁴ - 10⁶ spor oluşturduğu bulunmuştur.

1.5. Amaç

Bundan önceki açıklamalardan da anlaşılacağı üzere, *B. sphaericus*'un sivrisineklerle biyolojik mücadelede kullanılmaya aday bir mikroorganizma olduğu görülmektedir. Bu konudaki çalışmalara ülkemizde yeni başlanmıştır. Kimyasal insektisitlerin neden olduğu birçok yan etki gözönünde tutularak biyolojik mücadelede kullanıma aday olan *B. sphaericus* tez konusu olarak seçilmiştir. Bu tezin amacı, ülkemizi mümkün olduğu kadar bu bakteri yönünden taramak, elde edilen patojen izolatları beynelminel *B. sphaericus* suşları ile başta virülens olmak üzere birçok yönden karşılaştırmaktır.

2. MATERYAL VE METODLAR

2.1. Materyaller

2.1.1. *Bacillus sphaericus*'un izolasyonu için incelenen örnekler

1984 - 1987 yılları arasında Türkiye'nin 11 ilindeki değişik sivrisinek habitatlarından toplanarak incelenen toplam 85 adet toprak, dip çamuru, su, sivrisinek larvası, karasinek ve çekirge örnekleri Tablo 2.1.'de verilmiştir.

2.1.2. Biyoesseylerde ve diğer çalışmalarda kontrol olarak kullanılan bakteriler

B. sphaericus'un 1593, SSII-1, 2297 ve 2362 suşları E.W. Davidson'dan; *B. sphaericus*'un 2362 suşu ile *B. thuringiensis* var. *israelensis*, *B. thuringiensis* 74E-37-14, *B. thuringiensis* 73E-10-16 Ser: 10 ve *B. thuringiensis kyushiensis* Ser: 11a, 11c A.A. Yousten¹ den temin edilmiştir. *Salmonella typhi* ise Refik Saydam Hıfzıssıhha Araştırma Enstitüsü'nden (Ankara) temin edilmiştir.

2.1.3. Biyoesseylerde kullanılan sivrisinek larvaları

Değişik tarihlerde yapılan biyoesseyler için değişik bölgelerden toplanan larvalar kullanılmıştır. Ankara'da yapılan biyoesseyler için Eymir gölünden, Gökova'da yapılan biyoesseyler için Gökova'dan, İzmir'de yapılan biyoesseyler için Bostanlı ve Aydın'dan toplanan *Culex* sp. larvaları kullanılmıştır. İzolatların virülenslerini tesbit etmek için yapılan biyoesseylerde ise Selçuk-Belevi'den (İzmir) toplanan ikinci-üçüncü devredeki *Culex* sp. larvaları kullanılmıştır. Virginia Polytechnic Institute and State University, Department of Biology'de yapılan biyoesseylerde ise Dr. A.A.Yousten'in laboratuvarında kültürüne devam edilen ikinci devredeki *C. quinquefasciatus* larvaları kullanılmıştır.

¹: A.A. Yousten, Virginia Polytechnic Institute and State Univ. Department of Biology, Blacksburg, Virginia 24061-0406 U.S.A.

Tablo 2.1. *B. sphaericus*'un izolasyonu için incelenen örnekler
Toplandığı Bölgeler

| Örnek No | Toplandığı Yer | Örnek |
|----------|-----------------------------------|--------------------|
| 1 | Doğankent drenaj kanalı-1 (ADANA) | Sivrisinek larvası |
| 2 | " " " -2 " | " " |
| 3 | Ali Korkmazoğlu Çiftliği | " " |
| 4 | Misis drenaj kanalı | " " |
| 5 | Doğankent drenaj kanalı-1 | Su |
| 6 | " " " -2 " | " " |
| 7 | Ali Korkmazoğlu çiftliği | " " |
| 8 | Misis drenaj kanalı | " " |
| 9 | Solaklı drenaj kanalı | " " |
| 10 | Doğankent-1 | Toprak |
| 11 | Doğankent-2 | " " |
| 12 | Ali Korkmazoğlu Çiftliği | " " |
| 13 | Solaklı | " " |
| 14 | İncirlik | " " |
| 15 | Misis | " " |
| 16 | Yüzbaşı Köyü | " " |
| 17 | Çine - Karpuzlu - Göl (AYDIN) | " " |
| 18 | " " " " | Dip çamuru |
| 19 | " " " " | Ölü karınca |
| 20 | " " " " | Ölü çekirge |
| 21 | Tepecik | Toprak |
| 22 | İncirliova | Toprak-1 |
| 23 | " " " " | " -2 |
| 24 | " " " " | " -3 |
| 25 | " " " " | " -4 |
| 26 | " " " " | " -5 |
| 27 | Koçarlı - Göl | Toprak-1 |
| 28 | " " " " | Toprak-2 |
| 29 | " " " " | Toprak-3 |
| 30 | B.Menderes Kenarı-Gölet 1 | Dip çamuru |
| 31 | " " " 2 | " " |
| 32 | " " " 3 | " " |
| 33 | " " " 4 | " " |
| 34 | " " " 5 | " " |
| 35 | Çeştepe-Kanal Kenarı | " " |
| 36 | Kuşadası-Davutlar-Bataklık | Dip çamuru-1 |
| 37 | " " " " | " " -2 |
| 38 | " " " " | " " -3 |
| 39 | " " " " | Ölü karınca |
| 40 | " " " " | Su |
| 41 | " " " " | Sivrisinek larvası |
| 42 | Mogan Gölü (ANKARA) | Dip çamuru |
| 43 | Eymir Gölü | " " -1 |
| 44 | " " " " | " " -2 |
| 45 | " " " " | " " -3 |
| 46 | " " " " | " " -4 |
| 47 | " " " " | " " -5 |

Tablo 2.1. (Devamı)

| Örnek No | Toplandığı Yer | Örnek |
|----------|---------------------------------|--------------------|
| 48 | Yedigöller-Deringöl (BOLU) | Dip çamuru |
| 49 | " -Sazlı göl " | " " |
| 50 | " -Nazlı göl " | " " |
| 51 | " -İnce göl " | " " |
| 52 | " -Büyük göl " | " " -1 |
| 53 | " " " | " " -2 |
| 54 | Ayvalık-Tuzla (İZMİR) | Toprak |
| 55 | Bostanlı " | Dip çamuru-1 |
| 56 | " " " | " " -2 |
| 57 | " " " | " " -3 |
| 58 | " " " | " " -4 |
| 59 | " " " | " " -5 |
| 60 | " " " | " " -6 |
| 61 | " " " | " " -7 |
| 62 | " " " | Sivrisinek larvası |
| 63 | Selçuk-Belevi-Göl " | Dip çamuru-1 |
| 64 | " " " | " " -2 |
| 65 | " " " | " " -3 |
| 66 | " " " | " " -4 |
| 67 | " " " | " " -5 |
| 68 | " " " | " " -6 |
| 69 | Menemen-Kesikköy-Çeltik trl. " | Dip çamuru-1 |
| 70 | " " " | " " -2 |
| 71 | Karaçoralı deresi (KASTAMONU) | Toprak-1 |
| 72 | " " " | " -2 |
| 73 | Yeşilhisar-Ovaçiftlik (KAYSERİ) | Toprak |
| 74 | Milas-Bataklık (MUĞLA) | Su |
| 75 | " " " | Dip çamuru-1 |
| 76 | " " " | " " -2 |
| 77 | " " " | " " -3 |
| 78 | " " " | " " -4 |
| 79 | " " " | " " -5 |
| 80 | Bor-Klavuz (NİĞDE) | Toprak |
| 81 | Çepni (SİVAS) | " |
| 82 | Gemerek " | Toprak-1 |
| 83 | " " " | " -2 |
| 84 | Boğazlıyan (YOZGAT) | Toprak-1 |
| 85 | " " " | " -2 |

2.1.4. Antiserumların hazırlanmasında kullanılan tavşanlar

B. sphaericus'un 1593, 2297 ve 2362 numaralı suşlarına karşı antiserumların hazırlanmasında her suş için ikişer adet olmak üzere 3.0-3.5 kg ağırlığında, sağlıklı, beyaz renkli ve erkek Yeni Zelanda tavşanları kullanılmıştır. Tavşanlar, Refik Saydam Hıfzıssıhha Araştırma Enstitüsü'nün Ankara'daki Serum Üretim Çiftliğinden temin edilmiştir.

2.2. Metodlar

2.2.1. *Bacillus sphaericus*'un izolasyonu (Bu bölümde adı geçen besiyerleri ve hazırlanışları Ek-A'da sunulmuştur)

B. sphaericus suşlarının toprak, dip çamuru, su, sivrisinek larvası ve diğer canlılardan izolasyonunda E.W. Davidson'dan temin edilen (E.W. Davidson 1985, yazılı görüşme) izolasyon metodu kullanılmıştır.

2.2.1.1. *Bacillus sphaericus*'un toprak ve dip çamurundan izolasyonu

1. Örnekten 1 gr tartılmış,
2. Steril bir tüp içerisine konarak 1 ml steril damıtık su ile süspanse edilmiş,
3. 80°C'lik su banyosunda 12 dakika bekletilerek pastörize edilmiş,
4. Bu süspansiyondan steril bir pipetle 0.1 ml alınarak 100 ml'lik erlenmayer içerisinde bulunan 20 ml NYSM Broth'a (Myers ve Yousten 1978) inokule edilmiş,
5. Erlenmayerdeki besiyeri 28°C'de 150-200 devir/dakikada 48 saat çalkalanarak inkübe edilmiş,
6. Inkübasyondan sonra bu süspansiyondan spor boyama yapılmış (Bölüm 2.2.2.1'de açıklandığı şekilde) ve immersiyon objektifi ile (100x) incelenmiştir. Terminal, şişkinlik yapan sporangiyumlar içerisinde yuvarlak sporlar bulunan *B. sphaericus* hücrelerinin bulunup bulunmadığına bakılmıştır.

7. Bu tip kültürlerden steril bir tüp içerisine 1 ml alınmış ve 80°C'de 12 dakika süre ile tekrar pastörize edilmiştir.
8. Bu numuneler baget yardımıyla NYST (Yousten vd 1982) veya BATS (Yousten vd 1985) seçici besiyeri yüzeyine yayılmış ve 28-30°C'de 24-48 saat süre ile inkübe edilmiştir.
9. Yuvarlak, sarımsı kahverengi ve krater merkezli koloniler işaretlenerek koloninin yarısından alınan örnekte spor boyama yapılmış ve immersiyon objektifi ile incelenmiştir. Tipik *B. sphaericus* morfolojisi gösteren kolonilerin geri kalan yarısı ise yatık NA (Nutrient Agar) besiyerlerine alınarak 28-30°C'de 48 saat geliştirilmiştir.
10. Bu kültürler daha sonra ikinci-üçüncü devredeki *Culex* sp. larvalarına karşı denenmişlerdir. İnsektisidal aktivite gösteren kültürler NYST veya BATS besiyerine çizgi ekim metodu ile ekilerek tekrar saflaştırılmıştır.

2.2.1.2. *Bacillus sphaericus*'un sudan izolasyonu

B. sphaericus suşlarının izolasyonunda başlıca iki yol kullanılmış olup, alınan su örnekleri hem pastörize edildikten sonra hem de pastörize edilmeden işleme tabi tutulmuştur. İzolasyon için Bölüm 2.2.1.1'de açıklanan metod kullanılmıştır.

2.2.1.3. *Bacillus sphaericus*'un sivrisinek larvası ve diğer canlılardan izolasyonu

İncelenecek olan canlılar % 70'lik etil alkolde 15-30 saniye bekletildikten sonra steril damıtık su ile iyice yıkamış ve daha sonra steril damıtık su içerisinde ezilerek süspanse edilmiştir. Bu süspansiyondan hem NYST veya BATS besiyerine çizgi ekim yapılmış, hem de pastörize edilerek veya etmeden Bölüm 2.2.1.1'de açıklandığı şekilde izolasyonlar yapılmıştır.

2.2.2. *Bacillus sphaericus* izolatlarının karakterizasyonu için yapılan incelemeler

2.2.2.1. Morfolojik incelemeler (Bu kısımda adı geçen besiyerlerinin ve diğer suspansiyonların kompozisyonları ve hazırlanışları Ek-B'de sunulmuştur)

Gram boyama: Bu boyama işlemi Preston ve Morrel (1962) tarafından Lillie'den modifiye edilerek geliştirilen metoda göre yapılmıştır (Cowan ve Stell 1966). Gram boyama sırasıyla şu şekilde yapılır:

1. Temiz bir lam üzerine 12-18 saatlik bakteri kültüründen sürülmüş, havada kurutulmuş ve 2-3 kez alevden geçirilerek fikse edilmiş,
2. Preparat üzerine amonyum oksalat + kristal viyole solusyonundan dökülmüş ve 0.5 dakika boyanmış,
3. Boya dökülmüş ve preparat üzerine lugol solusyonu ilâve edilerek 30 saniye beklenmiş,
4. Aseton + iyot solusyonu ile yıkanmış,
5. Bunu takiben damıtık su ile yıkanmış,
6. 30 saniye karbol-fuksin boyası ile boyanmış,
7. Damıtık su ile yıkanmış ve havada kurutulmuş,
8. İmmersiyon objektifi ile incelenmiştir.
9. Mor renkte görülen bakteriler Gram (+), kırmızı görülenler ise Gram (-) olarak değerlendirilmiştir.

Spor boyama: Spor boyama işlemi Köşker ve Çakmakçı'ya göre (1983) yapılmıştır.

2.2.2.2. Biyokimyasal ve kültürel incelemeler

B. sphaericus'un karakterizasyonunda temel olan biyokimyasal testlerin yapıları aşağıda verilmiştir. Bu testlerin yapılmasında Cowan ve Stell (1966), Harrigan ve McCance (1966), Köşker ve Çakmakçı (1983) ve Tamer vd (1986) tarafından hazırlanan laboratuvar metodlarından yararlanılmıştır. Testler aşağıdaki şekilde yapılmış ve değerlendirilmiştir (Bu kısımda geçen besiyeri ve ayraçların kompozisyonları ile hazırlanışları Ek-A ve B'de sunulmuştur.

Zar teşekkülü: Tüplerde bulunan 6-7 ml NB besiyerine bir öze

gözü bakteri inokule edilmiş, 28-30°C'de 48 saat inkübe edilmiş ve yüzeyde zar teşekkül edip etmediğine bakılmıştır.

Jelatinin hidrolizi: Tüplerde dik vaziyette katılaştırılmış olan Nutrient Jelatin besiyerine ok uçlu iğne ile bakteri besiyerinin tam ortasına inokule edilerek 28-30°C'de 48-72 saat inkübe edilir. Daha sonra besiyerleri soğuk odaya alınarak inceleme yapılmıştır. Eğer jelatin bakteri tarafından hidrolize edilmişse besiyeri sıvı halde kalır, parçalanmamışsa katılaşır. Bu deney yapılırken bir adet de bakteri inokule edilmemiş jelatinli besiyeri kontrol olarak bırakılmıştır.

Nişastanın hidrolizi: Petri kutularında bulunan Nişasta Agar besiyerine bakteri kültüründen çizgi ekim yoluyla inokulasyonlar yapılmıştır. 28-30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, petri kutusundaki besiyerinin tüm yüzeyini kaplıyacak şekilde lugol solusyonu dökülür. Eğer bakteri nişastayı parçalamışsa bakteri kolonilerinin etrafında açık bir zon kalır, bakterinin gelişmediği bölgeler ise maviye boyanır. Bunun tersine, bakteri nişastayı parçalamamışsa besiyerinin her tarafı maviye boyanır.

Karbohidratların parçalanması testi: İçlerinde Brom Timol Mavisi indikatörü, dürham tüpleri ve farklı şekerler bulunan tüpteki peptonlu su besiyerlerine birer öze gözü bakteri inokule edilir ve 28-30°C'de 48-72 saat inkübe edilir. Eğer inokule edilen bakteri besiyerindeki şekeri kullanıp asit meydana getirmişse besiyerinin rengi ördek başı yeşilden sarıya döner. Asit meydana getirmemişse besiyerinin rengi değişmeden kalır. Eğer bakteri gaz meydana getirmişse dürham tüplerinin taban kısmında gaz birikimi olur. Bu testte *B. sphaericus*'un karakterizasyonu için önemli olan 15 farklı şeker kullanılmıştır.

Hidrojen sülfür teşekkülü: Bu test için Kligler Demirli Agar (Oxoid ltd) besiyeri kullanılmıştır. Öze ile alınan bakteri kütlesi tüpteki yatık besiyerinin yüzeyine ve eğilmemiş kısmın tam ortasına batırılarak inokule edilir. 28-30°C'de 48-72 saat inkübe edilir. Eğer inokule edilen bakteri H₂S meydana getirmişse oluşan FeS'den dolayı besiyerinde bir siyahlaşma meydana gelecektir.

Katalaz testi: Bu test için lam metodu kullanılmıştır. NA'da gelişmiş olan 24 saatlik bakteri kültüründen 1 öze dolusu bakteri alınır ve lam üzerine konur. Bunun üzerine % 3'lük H_2O_2 'den 2-3 damla konur ve öze ile karıştırılır. Gaz kabarcıklarının çıkması H_2O_2 'in parçalandığını ve O_2 gazının meydana geldiğini gösterir.

Sitrat testi: Bu test için Simon Sitrat Agar (Oxoid ltd) besiyeri kullanılmıştır. Tüplerdeki yatık besiyerine bir öze dolusu bakteri dipten yukarı doğru çekilerek yüzeye inokule edilir. Daha sonra, 28-30°C'de 48-72 saat inkübe edilir. Eğer inokule edilen bakteri besiyerindeki sitratı kullanmışsa besiyerinin rengi yeşilden maviye döner.

Indol testi: Tüplerdeki Triptofanlı Nutrient Broth besiyerine bir öze dolusu bakteri inokule edilir ve 28-30°C'de 24 saat geliştirilir. Bunun üzerine 0.5 ml Kowacs ayracı konur ve 1 dakika sonra incelenir. Ayracın bulunduğu fazda kırmızı bir rengin meydana gelmesi triptofandan indolün oluştuğunu gösterir.

Metil kırmızısı testi: Glukoz-Fosfat besiyerine 1 öze gözü dolusu bakteri inokule edilir ve 28-30°C'de 24 saat inkübe edilir. Bunun üzerine 2-3 damla metil kırmızısı ayracı ilâve edilir, karıştırılır ve incelenir. Kırmızı rengin meydana gelmesi durumunda (besiyerinin pH'ı düşmüştür) test (+) olarak değerlendirilir.

Voges-Proskauer testi: Voges-Proskauer testi Barritt metoduna göre yapılmıştır (Cowan ve Steel 1966). Buna göre, Glukoz Fosfat besiyerinde 24 saat geliştirilmiş olan bakteri kültürü üzerine α -naftol solusyonundan 0.6 ml ve % 40'lük KOH'den 0.2 ml ilâve edilir, çalkalanır ve 15 dakika ile 1 saat sonra incelenir. Koyu kırmızı bir rengin meydana gelmesi durumunda test (+) olarak değerlendirilir ve glukozdan asetil metil karbinol'un oluştuğunu gösterir.

Plazma koagülaz testi: Bu test tüpte yapılmıştır. Bunun için, seyreltilmemiş steril plazmadan 0.5 ml alınır ve bunun üzerine 28-30°C'de 24 saat NB'da üretilmiş olan bakteri kültüründen 0.5 ml ilâve edilir ve 28-30°C'ye konarak 1-4 saat boyunca gözlenir. Plazmada koagülasyon meydana geliyorsa test (+), gelmiyorsa (-) olarak değerlendirilir.

Hemoliz deneyi: Petrilerdeki kanlı NA besiyerlerine tek koloni düşürecek şekilde öze ile bakteri ekimleri yapılır. 28-30°C' de 24-48 saat süre ile inkübe edilir. Eğer bakteri kolonilerinin etrafında sarımsı - yeşil zonlar meydana gelmişse α -hemoliz, tamamen açık zonlar meydana gelmişse β -hemoliz olarak değerlendirilir. Herhangi bir zon meydana gelmemişse (-) olarak değerlendirilir.

2.2.3. Biyoesseylerin yapılışı

Bu araştırmada iki farklı amaç için biyoesseyler yapılmıştır. Bunlardan birincisi, uygulanan izolasyon metodu gereğince *B. sphaericis* izolatlarının patojen olup olmadıklarını anlamak için yapılandır. İkincisi ise elde edilen izolatların virülenslerini tayin etmek için yapılandır.

2.2.3.1. İzolatların patojenliklerini anlamak için yapılan biyoesseyler

1. Sterilize edilmiş 100 ml'lik beher veya 200 ml'lik plastik kaplar içerisine steril çeşme suyundan 45 ml konur.

2. Her kapta 25-30 adet olacak şekilde ikinci-üçüncü devredeki *Culex* sp. larvaları konur ve larvaların beslenmesi için spatülle az miktarda süt tozu ilâve edilir.

3. Test edilecek olan bakteri izolatı NYSM Agar besiyerine daha önceden ekilerek 48-72 saat süre ile geliştirilir.

4. Bakteriler steril damıtık su ile besiyeri yüzeyinden yıkanarak bakteri süspansiyonu hazırlanır ($>10^{10}$ hücre/ml).

5. Bakteri süspansiyonundan steril bir pipetle 5 ml alınır ve sivrisinek larvalarının bulunduğu kaplara inokule edilir.

6. 28-30°C'lik etüve konarak 48 saate kadar incelenir.

7. Ölü ve canlı larvalar sayılarak ölüm %'leri hesaplanır.

Bu işlemler esnasında kontrol olarak bakteri inokule edilmiş larvalar ve *B. sphaericus* 1593 inokule edilmiş larvalar da kullanılmıştır.

2.2.3.2. İzolatların virülenslerini tayin etmek için yapılan biyoesseyler

Bu biyoesseyler Türkiye'de yapılan ve A.B.D.'nde yapılan şekilde ikiye ayrılabilir.

a. Türkiye'de yapılan biyoesseyler: Deneyler 4 tekerrürlü olarak yürütülmüş ve izolatların virülensleri % ölüm olarak hesaplanmıştır. Bu işlemler sırasıyla aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

Inokulumların hazırlanışı: Ön biyoesseyler sonucunda patojen olduğu tesbit edilen 27, 28, 29, 31 ve 34 numaralı yerli izolatlarla birlikte karşılaştırma için kullanılacak olan *B. sphericus* 1593 ve SSII-1 suşları NYSM Agar pleytlerine ekilmiş ve 28-30°C'de 48 saat geliştirilmiştir. Daha sonra bakteriler steril damıtık su ile süspansiyon edilmiş ve 10^{11} cfu/ml yoğunluğunda stok süspansiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu inokulumlar + 4°C'ye konmuş ve zaman geçirmeden sivrisinek larvalarına uygulanmıştır.

Bioessey kaplarının hazırlanışı: Bioesseyler için 200 ml'lik plastik kaplar kullanılmıştır. Kaplar % 70'lik etil alkolden geçirildikten sonra steril çeşme suyu ile yıkamışlardır. 3 farklı dozda uygulama yapılacağından birinci doz için kullanılacak kaplara 45'er ml, ikinci ve üçüncü dozlar için kullanılacak kaplara ise 49.5 ml steril çeşme suyu konmuştur. Bu kaplara daha sonra 25-30'ar adet ikinci-üçüncü devredeki *Culex* sp. larvası konmuştur. Larvalara besin olarak taze süt tozu verilmiştir.

Larvalara bakteri süspansiyonlarının verilişi: 10^{11} cfu/ml yoğunluktaki bakteri stok süspansiyondan 5 ml alınarak 45'er ml'lik biyoessey kaplarına ilave edilmiştir. Bu şekilde 10^{10} cfu/ml'lik birinci doz elde edilmiştir. Bu defa birinci dozdan 0.5 ml alınarak 49.5 ml'lik kaplara ilave edilmiş ve 10^9 cfu/ml'lik ikinci doz elde edilmiştir. Aynı şekilde ikinci dozdan 0.5 ml alınarak 49.5 ml'lik diğer kaplara ilave edilmiş ve 10^8 cfu/ml'lik üçüncü doz elde edilmiştir.

Biyoessey şartları ve sonuçların değerlendirilmesi: Bakteri inokule edilmiş biyoessey kapları 28-30°C'lik etüve yerleştirilmiştir. Devamlı gözlemler yapılarak 24 ve 48 saat sonraki % ölüm değer-

leri hesaplanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde Varyans Analizi ve Duncan testi kullanılmıştır.

b. A.B.D.'nde yapılan biyoesseyler: A.B.D.'inde yapılan biyoesseylerde faj tiplendirmelerinde ilginç bulunan *B. sphaericus* X, Y, 31 ve 34 numaralı izolatlarla, kontrol olarak *B. sphaericus* 2362 suşu kullanılmıştır. Bakteriler 500 ml'lik erlenmayerler içerisinde bulunan 50 ml NYSM Broth'da 30°C'lik 200 devir/dakikaya ayarlanmış inkübatörde 24 saat üretilmiş, santrifüjle çökertilen spor peleti değişik dilüsyonlarda olmak üzere biyoesseylerde kullanılmıştır. Biyoesseylerde her karakter için 30'ar adet olmak üzere ikinci devredeki *C. quinquefasciatus* larvaları kullanılmıştır. Larvalara besin olarak, sterilize edilmiş maya solusyonu verilmiştir. Deneylerde klorürü çıkarılmış steril damıtık su kullanılmıştır. Bakteri inokule edilmiş 200 ml'lik biyoessey kapları oda sıcaklığında 48 saat bekletildikten sonra ölü larvalar sayılmış ve ölüm yüzdeleri hesaplanmıştır. Daha sonra da çizilen grafiklerden LC50 değerleri (larvaların %50'sini öldürmek için verilmesi gereken µgr/ml dozu) hesaplanmıştır.

2.2.4. *Bacillus sphaericus* antiserumlarının hazırlanışı ve lam aglutinasyon testi

2.2.4.1. Antijenlerin hazırlanışı: *B. sphaericus* test antiserumlarının hazırlanması için kullanılan 1593, 2297 ve 2362 suşlarının somatik O antijenleri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

1. Yatık NA'da 24-48 saat geliştirilmiş olan bakteri kültüründen petri kutularındaki NA besiyerine tek koloni düşürecek şekilde çizgi ekim yapılır ve 28-30°C'de 48 saat inkübe edilir.

2. Tek koloni seçilerek 10 ml'lik NB'a inokule edilir.

3. 24 saat geliştirildikten sonra roux şişelerindeki NA yüzeyine yayılır. Fazlası steril bir pipetle toplanır.

4. İnokule edilen roux şişeleri 28-30°C'de 18 saat inkübe edilir. Bakteriler besiyeri yüzeyinden serum fizyolojik ile toplanır.

5. Bu süspansiyon 100°C'de 2 saat açık otoklavda tutulur.

6. Bakteriler serum fizyolojik ile 3 defa yıkanır.

7. Antijenik yapı steril serum fizyolojik ile tekrar süspanse edilir ve injeksiyon işlemleri için stok olarak kullanılır.

2.2.4.2. İnjesiyon işlemleri ve antiserumların eldesi

Stok antijen süspanسیونundan McFarland skalası kullanılarak 2×10^9 hücre/ml'lik süspanسیون hazırlanmıştır. Her süş için 2 adet tavşan kullanılmış ve injeksiyonlar kulak venasından steril injektörlerle Tablo 2.2'de gösterildiği şekilde yapılmıştır. 1 gün oda sıcaklığında bekletildikten sonra santrifüj edilmiş (2500 devir/dakikada 20 dakika) ve serumları ayrılmıştır.

2.2.4.3. Lam aglutinasyon testi

24 saatlik bakteri kültüründen 1 öze dolusu alınarak lam üzerindeki steril serum fizyolojik içinde ezilir. Üzerine 1 damla antiserum konarak karıştırılır. 1-2 dakika içerisinde aglutinasyonun olup olmadığına bakılır.

2.2.5. *Bacillus sphaericus* süşlarının faj tiplendirmeleri

Faj tiplendirmeleri, Virginia Polytechnic Institute and State University, Department of Biology'de Dr. A.A. Yousten'in laboratuvarında, bu araştırmacı tarafından daha önce izole edilen fajlar kullanılarak aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

1. Test edilecek olan bakteriler 5 ml'lik NYM Broth'a (Nutrient Broth + Yeast Extract) inokule edilir ve 30°C'de 1 gece inkübe edilir.

Tablo 2.2. Tavşanlara İnjesiyonların Yapılışı

| İnjesiyon | Miktarı | Günler |
|-----------------------|---------|--------|
| Birinci injesiyon | 0.5 ml | 0.gün |
| İkinci " | 1.0 ml | 4.gün |
| Üçüncü " | 2.0 ml | 7.gün |
| Dördüncü " | 3.0 ml | 11.gün |
| Beşinci " | 3.0 ml | 14.gün |
| Titre tayini | - | 18.gün |
| Tavşanların kesilmesi | - | 19.gün |

2. Her bakteri suşu için 2 tekrarlı olmak üzere, 1 gece NYM Broth'da geliştirilen bakteri kültürünün 0.3 ml'si ile 50°C'de bekletilen 3 ml NYM yumuşak agar (NYM Broth + %0.75 Agar) karıştırılır, NYSM Agar yüzeyine yayılır.

3. Petri kutuları işaretlenerek değişik dilüsyonları hazırlanan faj süspansiyonlarından 5'er µl inokule edilir ve ters çevirmeksizin oda sıcaklığında 12-24 saat inkübe edilir.

4. İnkübasyondan sonra faj plâklarının oluşup oluşmadığı ve oluşmuşsa plâkların sayısı kaydedilir.

2.2.6. *Bacillus sphaericus* X ve Y'nin antibakteriyel etkisi ile ilgili deneyler (Bu bölümde adı geçen besiyerleri ve hazırlanışları Ek-A'da sunulmuştur)

Antibakteriyel etkinin olup olmadığı Kekessy ve Piquet (1970) tarafından geliştirilen metod kullanılarak aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

1. *B. sphaericus* X ve Y bakterileri NYSM Broth'da 1 gece üretildikten sonra MYSM agarın değişik bölgelerine 2 µl inokule edilir ve 30°C'de 48 saat inkübe edilir.

2. İnkübasyon süresinin sonunda petri kutuları içerisindeki besiyerleri steril bir spatülle ters çevrilir. Bu şekilde steril bir besiyeri yüzeyi elde edilmiş olur.

3. Bir gece NYSM Broth'da geliştirilmiş olan *B. sphaericus* kültüründen 40 µl alınarak 5 ml NYSM yumuşak agar ile karıştırılır ve ters çevrilmiş olan NYSM Agar yüzeyine yayılır.

4. Besiyeri katılaştıktan sonra petri kutuları ters çevrilererek 30°C'de 24-48 saat inkübe edilir. Sonuçta, inhibisyon zonlarının oluşup oluşmadığına bakılır.

B. sphaericus X ve Y'nin antibakteriyel etki spektrumunu tesbit edebilmek için Tablo 2.3'de verilmiş olan mikroorganizmalar kullanılmıştır.

2.2.6.1. Antibakteriyel etkinin kültür yaşı ile ilişkisi

Bakteri kültür yaşı ile antibakteriyel etkinin ilişkisini gösterebilmek için iki farklı yöntem kullanılmıştır. İndikatör

Tablo 2.3. *B. sphaericus* X ve Y'nin Etki Spektrumu için Test Edilen Mikroorganizmalar

| Mikroorganizma | Temin Edildiği Yer |
|---|-------------------------------|
| <i>B. sphaericus</i> 27 | Bu çalışmada elde edilmiştir. |
| " " 28 | " |
| " " 29 | " |
| " " 31 | " |
| " " 34 | " |
| " " Kellen Q | Dr. A.A. Yousten |
| " " 1881 | " |
| " " 1593 | " |
| " " SSII-1 | " |
| " " ATCC 13805 | " |
| " " NRS 592 | " |
| " " ATCC 7055 | " |
| " " NRS | " |
| " " PI | " |
| " " ATCC 12300 | " |
| " " ATCC 14577 | " |
| " " NRS 1198 | " |
| " " NTC 9602 | " |
| <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> | " |
| <i>B. subtilis</i> | Dr. M. Öner ¹ |
| <i>B. cereus</i> | " |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | " |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | " |
| <i>Aspergillus ustus</i> TEM F26 | " |
| <i>Alternaria</i> sp. | " |

1: Prof.Dr. Mehmet Öner, E.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Bornova, İZMİR.

bakteri olarak da en hassas bulunan *B. sphaericus* NRS 592 kullanılmıştır.

1. Katı besiyerinde yapılan test: *B. sphaericus* X NB besiyerinde 1 gece geliştirilir ve indikatör bakterinin inokule edileceği ana göre 84, 60, 48, 24, 12 ve 6 saatlik kültürler olacak şekilde NYSM agarın değişik bölgelerine değişik zamanlarda 2'şer μ l inokule edilerek 30°C'de inkübe edilir. Daha sonra, 1 gece NYSM Broth'da geliştirilmiş olan indikatör bakteriden 40 μ l alınarak 5 ml NYSM yumuşak agar besiyeri ile karıştırılır ve daha önce belirtildiği şekilde ters çevrilmiş olan NYSM agar besiyerinin yüzeyine yayılır. 30°C'de 24-48 saat inkübe edilir ve inhibisyon zonları ölçülür.

2. Sıvı besiyerinde yapılan test: NYSM Broth'da 1 gece üretilmiş olan *B. sphaericus* X kültüründen 3 ml alınır 500 ml'lik erlenmayer içerisinde bulunan NYSM Broth besiyerine inokule edilir. 30°C'de 200 rpm'de inkübe edilir. Başlangıçtan itibaren değişik aralıklarla (0, 4, 7, 9, 11, 24 saat sonra) 3'er ml örnekler alınarak pH ve absorbanları (600 nm) ölçüldükten sonra 0.45 μ m'lik membran filtreden süzülür ve +4°C'de saklanır. Ayrıca, her örnekte mikroskopik inceleme yapılarak hücrelerin gelişme durumları kaydedilir.

Deney tamamlandıktan sonra, eldeki örneklerin antibakteriyel etkilerini test edebilmek için Mayr-Harting vd (1972) tarafından geliştirilen yöntem ve bundan modifiye edilerek geliştirilen yumuşak agar yöntemi kullanılmıştır. Mayr-Harting vd'nin (1972) metoduna göre;

1. Bir gece NYSM Broth'da geliştirilmiş olan indikatör bakteri kültüründen 40 μ l alınarak 5 ml NYSM yumuşak agar ile karıştırılır ve ikinci kat olarak NYSM agar yüzeyine yayılır.

2. Steril Ouchterlany deleceği ile besiyerinde 5 mm çapında delikler açılır.

3. Test edilecek örnekler steril damıtık su ile değişik oranlarda seyreltilerek (Tablo 2.4.) her deliğe 60 μ l olacak şekilde aplike edilir.

Tablo 2.4. Test Edilen Örnek Seyreltmeleri

| Örnek (Saat) | Seyreltme oranı |
|--------------|------------------|
| 0 | 1 (Direkt) |
| 4 | 1, 1/2 |
| 7 | 1, 1/2, 1/4, 1/8 |
| 9 | 1, 1/2, 1/4, 1/8 |
| 11 | 1, 1/2, 1/4, 1/8 |
| 24 | 1, 1/2, 1/4, 1/8 |

4. 30°C'de 24-48 saat inkübe edilir ve inhibisyon zon çapları ölçülür.

Modifiye edilen diğer yöntemle göre ise, genelde bütün işlemler aynı olmasına karşılık çift kat yerine tek kat halinde indikatör bakteri inokule edilmiş (60 µl kültür/20 ml besiyeri) NYSM yumuşak agar besiyeri kullanılmıştır.

3. SONUÇLAR

3.1. *B. sphaericus*'un İzolasyonu ve İzolatların Patojenlikleri

İncelenen 85 farklı örnekten toplam 342 adet tipik *B. sphaericus* morfolojisi gösteren izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar Gram (+), terminal, şişkinlik yapan sporangiyumlar içerisinde yuvarlak sporlar meydana getirmiştir. Tipik *B. sphaericus* morfolojisi gösteren 342 izolatın illere göre dağılımı Tablo 3.1.'de verilmiştir.

İzolatların patojen olup olmadıklarını anlamak için yapılan biyoesseylerde %50'den fazla ölüm meydana getiren izolatlar patojen olarak kabul edilmiş ve 6, 18, 25, 27, 28, 29, 31, 34 ve 71 numaralı izolatların *Culex* sp. larvalarına karşı patojen oldukları bulunmuştur. 8-14 Ağustos 1986 tarihleri arasında Muğla, Akyaka köyü Gökova Orman Bölge Şefliği'nin geyik üretim arazisi içerisinde yapılan biyoesseylerde toplam 89 adet izolat *Culex* sp.'nin ikinci-üçüncü devredeki larvalarına karşı test edilmiş ve 6, 18, 25 ve 71 numaralı izolatların patojen oldukları bulunmuştur. (Tablo 3.2).

Gökova'da yapılan biyoesseylerde patojen bulunan 6, 18, 25 ve 71 numaralı izolatlar bir-iki pasajdan sonra patojenliklerini kaybetmişlerdir. Patojenliklerini tekrar kazanabilmek için sivrisinek larvalarından tekrar izolasyon yapılmış fakat başarılı olunamamıştır.

Tablo 3.1. Tipik *B. sphaericus* Morfolojisi Gösteren İzolatların illere Göre Dağılımı

| İlin adı | İzolat sayısı | İlin Adı | İzolat sayısı |
|----------|---------------|-----------|---------------|
| Adana | 19 | Kastamonu | 12 |
| Ankara | 24 | Kayseri | 8 |
| Aydın | 115 | Muğla | 50 |
| Bolu | 9 | Niğde | 4 |
| İzmir | 89 | Sivas | 6 |
| | | Yozgat | 6 |

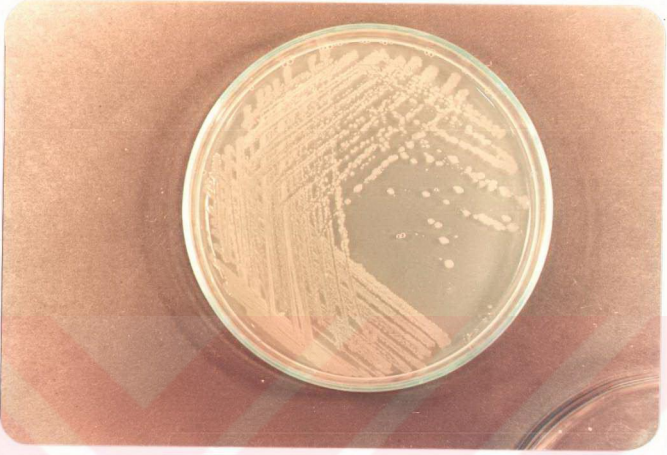
Tablo 3.2. 6, 18, 25 ve 71 Numaralı İzolatların *Culex* sp.'nin İkinci-Üçüncü Devredeki Larvalarına Etkisi

| İzolat No | İzole Edildiği Yer | % Ölüm |
|---------------------------|---------------------------------------|--------|
| 6 | Doğankent Drenaj Kanalı-2(ADANA) | 62 |
| 18 | Çine-Karpuzlu-Göl (AYDIN) | 82 |
| 25 | İncirliova Toprak-4 (AYDIN) | 60 |
| 71 | Karaçoralı Deresi-Toprak-1(KASTAMONU) | 64 |
| <i>B. sphaericus</i> 1593 | | 98 |
| " " | 2362 | 100 |
| " " | 2297 | 100 |
| " " | SSII-1 | 66 |

Laboratuvar biyoesseylerinde patojen olarak bulunan 27, 28, 29, 31 ve 34 numaralı izolatların patojenliklerine ise 3 yıla kadar herhangi bir şey olmamıştır. 31 ve 34 numaralı suşlar patojenliklerini korudukları halde 27, 28 ve 29 numaralı suşlar 3 yıl sonra patojenliklerini kaybetmişlerdir.

3.2. *B. sphaericus* izolatlarının Morfolojik Özellikleri

Seçilen *B. sphaericus* izolatlarının tümü şişkinlik meydana getiren sporangiyumlar içerisinde yuvarlak spora sahiptirler. NYST veya BATS seçici besiyerlerinde NYSM agar ve NA besiyerlerinde kine nazaran daha yavaş bir gelişme gösterirler. Bakteri kolonileri, sarımsı kahverengi, gelişmenin ilk devrelerinde S (Düzgün kenarlı) tipinde, geç devrelerinde ise R (Pürüzlü kenarlı) tipinde morfolojiye sahiptirler. Şekil 3.1'de *B. sphaericus* 1593'ün, Şekil 3.2'de ise *B. sphaericus* 28 numaralı izolatın NYSM agardaki 48 saatlik kolonileri görülmektedir.



Şekil 3.1. NYSM Agar Besiyerinde 48 Saat Geliştirilmiş
B. sphaericus 1593 Kolonileri



Şekil 3.2. NYSM Agar Besiyerinde 48 Saat Geliştirilmiş
B. sphaericus 28 Numaralı İzolatın Kolonileri

3.3. *B. sphaericus* izolatlarının Kültürel ve Biyokimyasal Özellikleri

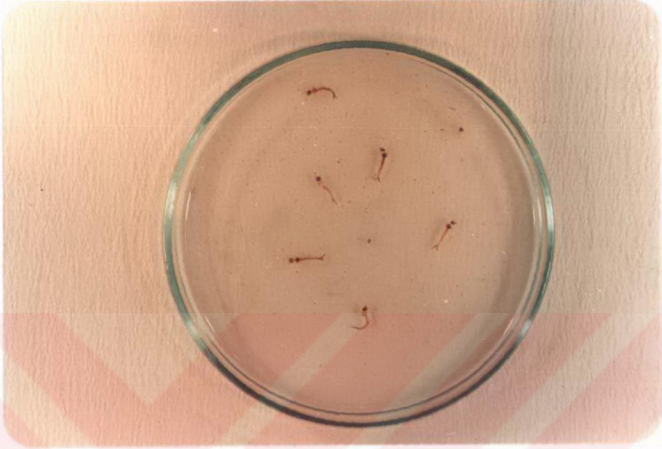
27, 28, 29, 31 ve 34 numaralı *B. sphaericus* izolatlarının kültürel ve biyokimyasal özellikleri Tablo 3.3'de verilmiştir. Katalaz ve plazma koagülaz dışındaki bütün testler negatif bulunurken, sadece jelatinin hidrolizi testinde 31 numaralı izolat diğerlerinden farklı olarak "+" reaksiyon vermiştir.

3.4. *B. sphaericus*'un Patojenizitesi

B. sphaericus'un toksik etkisi sonucu sivrisinek larvalarının hareketlerinde bir yavaşlama, beslenmeye karşı bir isteksizlik ve sonunda da 5-7 saat sonra ilk ölümler meydana gelmektedir. Biyoeseylerde kullanılan *Culex* sp. larvaları Şekil 3.3'de görülmektedir. Buna karşılık *B. sphaericus* 31 numaralı ve 1593 suşunun etkisi ile ölmüş olan larvaların 48 saat sonraki durumları sırasıyla Şekil 3.4. ve 3.5'de görülmektedir. Ölen sivrisinek larvalarında baş ile gövde arasındaki mesafe artmaktadır. Fakat baş ile gövde hiç bir zaman ayrılmamaktadır. Ölen larvalar çoğunlukla sarı-kahverengiye dönüşmekte, bazen de siyahlaşmakta ve dibe çökmektedirler.



Şekil 3.3. Bakteri İnoküle Edilmemiş *Culex* sp. larvaları



Şekil 3.4. *B. sphaericus* 31 Numaralı İzolatın Etkisiyle Ölmüş *Culex* sp. Larvaları



Şekil 3.5. *B. sphaericus* 1593 Süşunun Etkisiyle Ölmüş *Culex* sp. Larvaları

3.5. *B. sphaericus* İzolatlarının Virülensleri

Türkiye'de yapılan biyoesseylerde 27, 28, 29, 31 ve 34 numaralı patojen *B. sphaericus* izolatları 1593 ve SSII-1 suşları ile virülens yönünden mukayese edilmiştir. Tablo 3.4'de 10^{10} cfu/ml'lik, Tablo 3.5' de 10^8 cfu/ml'lik ve Tablo 3.6'da 10^6 cfu/ml'lik bakteri süspansiyonlarının 24 ve 48 saat sonra *Culex* sp. larvalarında meydana getirdiği % ölümler görülmektedir.

Tablo 3.3. *B. sphaericus* izolatlarının Kültürel ve Biyokimyasal Özellikleri

| Testin Adı | <i>B. sphaericus</i> izolatları | | | | |
|----------------------|---------------------------------|----|----|----|----|
| | 27 | 28 | 29 | 31 | 34 |
| NB'da zar teşekkülü | - | - | - | - | - |
| Katalaz | + | + | + | + | + |
| Hidrojen sülfür | - | - | - | - | - |
| İndol teşekkülü | - | - | - | - | - |
| Metil kırmızısı | - | - | - | - | - |
| Voges-proskauer | - | - | - | - | - |
| Sitrat | - | - | - | - | - |
| Plazma koagülaz | + | + | + | + | + |
| Hemoliz | α | α | α | α | α |
| Nişastanın hidrolizi | - | - | - | - | - |
| Jelatinin hidrolizi | - | - | - | + | - |
| Glukoz | - | - | - | - | - |
| Laktoz | - | - | - | - | - |
| Sukroz | - | - | - | - | - |
| Maltoz | - | - | - | - | - |
| Sorboz | - | - | - | - | - |
| Ksiloz | - | - | - | - | - |
| Fruktoz | - | - | - | - | - |
| Galaktoz | - | - | - | - | - |
| Ramnoz | - | - | - | - | - |
| Arabinoz | - | - | - | - | - |
| İnulin | - | - | - | - | - |
| Mannit | - | - | - | - | - |
| Riboz | - | - | - | - | - |
| Trehaloz | - | - | - | - | - |
| Salisin | - | - | - | - | - |

Tablo 3.4. 10^{10} cfu/ml Dozuyla Elde Edilen Biyoessey Sonuçları

| <i>B. sphaericus</i> izolatları | Larvalardaki % Ölüm | |
|------------------------------------|---------------------|---------------|
| | 24 Saat Sonra | 48 Saat Sonra |
| 27 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 |
| 28 | 53.75 ± 3.73 | 96.25 ± 2.39 |
| 29 | 70.00 ± 8.89 | 96.25 ± 1.25 |
| 31 | 83.75 ± 5.15 | 96.25 ± 2.39 |
| 34 | 58.75 ± 3.14 | 91.25 ± 2.39 |
| 1593 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 |
| SSII-1 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 |
| Kontrol | 5.00 ± 2.04 | 22.50 ± 5.20 |

Tablo 3.5. 10^8 cfu/ml Dozuyla Elde Edilen Biyoessey Sonuçları

| <i>B. sphaericus</i> izolatları | Larvalardaki % Ölüm | |
|------------------------------------|---------------------|---------------|
| | 24 Saat Sonra | 48 Saat Sonra |
| 27 | 62.90 ± 7.48 | 98.85 ± 1.15 |
| 28 | 30.00 ± 3.53 | 80.00 ± 5.40 |
| 29 | 29.27 ± 8.79 | 87.77 ± 4.23 |
| 31 | 30.00 ± 3.53 | 77.50 ± 4.79 |
| 34 | 33.75 ± 6.88 | 67.50 ± 3.23 |
| 1593 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 |
| SSII-1 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 |
| Kontrol | 5.00 ± 2.04 | 22.50 ± 5.20 |

Tablo 3.6. 10^6 cfu/ml Dozuyla Elde Edilen Biyoessey Sonuçları

| <i>B. sphaericus</i> izolatları | Larvalardaki % Ölüm | |
|------------------------------------|---------------------|---------------|
| | 24 Saat Sonra | 48 Saat Sonra |
| 27 | 21.87 ± 2.95 | 68.80 ± 9.82 |
| 28 | 23.75 ± 4.27 | 68.75 ± 7.74 |
| 29 | 25.00 ± 3.53 | 73.75 ± 6.57 |
| 31 | 20.00 ± 7.35 | 63.75 ± 11.95 |
| 34 | 25.00 ± 10.80 | 58.75 ± 3.14 |
| 1593 | 98.75 ± 1.25 | 100.00 ± 0.00 |
| SSII-1 | 76.80 ± 8.25 | 78.05 ± 7.73 |
| Kontrol | 5.00 ± 2.04 | 22.50 ± 5.20 |

Tablo 3.4. değerlendirildiğinde, 24 saat sonra 1593 ve SSII-1 suşlarından başka 27 numaralı izolatin da % 100 ölüm meydana getirdiği görülür. Diğer izolatlara ise % 100'ün altında, değişik oranlarda ölümler meydana getirmişlerdir. Kontrole göre mukayese edildiğinde, bütün izolatlara önemli derecede ölümler meydana getirmişlerdir ($p<0.01$). 24 saatin sonunda 31 numaralı izolatin 28 ve 34 numaralı izolatlara göre daha etkili olduğu görülmüştür ($p<0.01$). 48 saat sonraki sonuçlar değerlendirildiğinde ise, bütün izolatlara etkili olduğu ($p<0.01$), buna karşılık izolatlara arasındaki farkın önemli olmadığını ($p>0.05$).

Tablo 3.5 değerlendirildiğinde, 24 saat sonra sadece 1593 ve SSII-1 suşları % 100 ölüm meydana getirmiş, diğerlerindeki % ölüm değerleri ise 29.27 ± 8.79 ile 62.90 ± 7.48 arasında değişiklik göstermiştir. 27 numaralı izolatin 28, 29, 31 ve 34 numaralı izolatlara göre daha etkili olduğu görülür ($p<0.01$). İzolatlara etkisi kontrole göre değerlendirildiğinde, 27, 29 ve 34 numaralı izolatlara etkisi $p=0.01$ düzeyinde etkili bulunurken 28 ve 31 numaralı izolatlara etkisi ancak $p=0.05$ düzeyinde kalmıştır. 48 saat sonraki sonuçlar incelendiğinde ise, bütün izolatlara $p=0.01$ seviyesinde etkili bulunmuştur. 1593 ve SSII-1 suşlarının etkileri %100 iken Türkiye'den izole edilen bakterilerin % etkileri ise 67.50 ± 3.23 ile 98.85 ± 1.15 arasında değişmiştir. 27 numaralı izolat Türkiye'den elde edilenler arasında en yüksek etkili olarak bulunurken, 28, 29 ve 31 numaralı izolatlara arasında % etki yönünden farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 3.6'yı değerlendirecek olursak, 24 saat sonra 27, 28 ve 31 numaralı suşların etkileri kontrole göre önemsiz bulunurken ($p>0.05$), 29 ve 34 numaralı izolatlara etkileri $p=0.05$ seviyesinde, 1593 ve SSII-1 suşlarının etkileri ise $p=0.01$ seviyesinde önemli bulunmuştur. Ayrıca SSII-1 ve 1593 suşlarının etkileri ile Türkiye'den izole edilenlerin etkileri arasındaki fark $p=0.01$ seviyesinde önemlidir. 1593 ile SSII-1 suşları karşılaştırıldığında ise, 1593'ün SSII-1'e göre daha etkili olduğu görülmektedir ($p<0.01$). 48 saat sonraki sonuçlara göre, bakterilerden sadece 1593 suşu % 100 ölüm meydana getirmiştir. Bütün izolatlara kontrole göre $p=0.01$ seviyesinde etkili bulunurken Türkiye'den elde edilen izolatlara SSII-1

susu ile istatistiki olarak aynı grupta yer almışlardır ($p>0.05$).

Virginia Polytechnic Institute and State University, Biyoloji Bölümü'nde yapılan biyoesseylerde bakteriyofajlarla reaksiyon veren *B. sphaericus* X, Y, 31 ve 34 numaralı izolatlar virülens yönünden test edilmişlerdir. X ve Y izolatları *C. quinquefasciatus*'un ikinci devredeki larvalarına karşı herhangi bir toksisiteye sahip değildirlir. Patojen olan 31 ve 34 numaralı izolatların LC50 değerleri ise ($\mu\text{g/ml}$) sırasıyla 20 $\mu\text{g/ml}$ ve 6 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Biyoesseylerde karşılaştırmak amacıyla test edilen *B. sphaericus* 2362 suşunun LC50 değeri ise 1.3×10^{-4} olarak bulunmuştur.

3.6. *B. sphaericus* Antiserumlarının Özellikleri

B. sphaericus'un 1593, 2297 ve 2362 suşlarına karşı hazırlanan antiserumların spesifik olmadığı, çapraz reaksiyonlar verdiği görülmüştür. Üç antiserum da *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *B. thuringiensis* var. *israelensis*, *B. thuringiensis* 74E-37-14, *B. thuringiensis* 73E-10-16 Ser:10 ve *B. thuringiensis kyushiensis* Ser:11a, 11c ile çapraz reaksiyon verirken sadece *S. typhi* ile reaksiyon vermemiştir. Aglutinasyon partikülleri karşılaştırıldığında, *B. sphaericus* ile yapılan aglutinasyonda küçük kümeler oluşurken *B. thuringiensis* ile yapılan aglutinasyonda büyük kümeler meydana gelmiştir. Bu da bakteri büyüklüğüne bağlı bir farklılıktır.

3.7. *B. sphaericus*'un Faj Tiplendirme Sonuçları

Faj tiplendirme sonuçları Tablo 3.7'de görülmektedir. Tablo 3.7'deki "-" rakamlar 10 üzeri olarak faj seyreltme oranlarını göstermektedir. Test edilen *B. sphaericus* izolatlarından X ve Y 4, 5 ve 14 numaralı fajlarla reaksiyon verdiği halde (4 ve 5 ile zayıf), 31 ve 34 numaralı izolatlar SST fajı hariç bütün fajlarla pozitif reaksiyon vermiştir. Sadece 12 numaralı fajla olan reaksiyon zayıftır. 27, 28 ve 29 numaralı izolatlar ise hiç bir fajla reaksiyon vermemişlerdir.

Tablo 3.7. *B. sphaericus* izolatlarının Faj Tiplendirmesi

| Faj | i z o l a t N o | | | | | | |
|-----|-----------------|---------|----|----|----|---------|---------|
| | X | Y | 27 | 28 | 29 | 31 | 34 |
| 1A | - | - | - | - | - | +(-4) | +(-4) |
| 2 | - | - | - | - | - | +(-4) | +(-4) |
| 3 | - | - | - | - | - | +(-4) | +(-4) |
| 63 | - | - | - | - | - | +(-4) | +(-4) |
| 64 | - | - | - | - | - | +(-4) | +(-4) |
| 4 | +(-5)zf | +(-5)zf | - | - | - | +(-6) | +(-6) |
| 5 | +(-5)zf | +(-5)zf | - | - | - | +(-6) | +(-6) |
| 12 | - | - | - | - | - | +(-4)zf | +(-4)zf |
| SST | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | +(-3) | +(-3) | - | - | - | +(-4) | +(-4) |

zf: Zayıf reaksiyon

3.8. *B. sphaericus* X ve Y ile ilgili Sonuçlar

3.8.1. *B. sphaericus* X ve Y'nin izolasyonu

B. sphaericus X ve Y, topraktan izolasyonlar sırasında bir tesadüf sonucu laboratuvarında meydana gelen kontaminasyondan elde edilmişlerdir. Kontaminasyon sonucunda NYST besiyerinde gelişen bu koloniler NA besiyerine ekilerek tekrar saflaştırılmışlardır.

3.8.2. *B. sphaericus* X ve Y'nin morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özellikleri

Bakterilerde yapılan spor ve gram boyama, bu bakterilerin gram (+), çubuk şeklinde, uçta şişkinlik yapan sporangiyumlar içerisinde yuvarlak sporlar bulduklarını göstermiştir. Tablo 3.8'de ise bu bakterilerin kültürel ve biyokimyasal özellikleri görülmektedir. *B. sphaericus* için literatürde bildirilen özelliklerle uygunluk göstermişlerdir. Her iki bakterinin de aynı özelliklere sahip olduğu bulunmuştur.

Tablo 3.8. *B. sphaericus* X ve Y'nin Kültürel ve Biyokimyasal Özellikleri

| Özellik | Sonuç | Özellik | Sonuç |
|-----------------------|---------|----------|-------|
| NYST'de gelişme | + | Fruktoz | - |
| NB'da zar teşekkülü | - | Galaktoz | - |
| Katalaz | + | Ramnoz | - |
| Hidrojen Sülfür | - | Arabinoz | - |
| Jelatinin hidrolizi | + | Salisin | - |
| Niştastanın hidrolizi | - | Sakkaroz | - |
| Plazma koagülaz | - | Maltoz | - |
| Hemoliz | β | Sarboz | - |
| İndol teşekkülü | - | Ksiloz | - |
| Metil Kırmızısı | - | İnulin | - |
| Voges-Proskauer | - | Mannit | - |
| Sitrat | - | Riboz | - |
| Glukoz | - | Trehaloz | - |
| Laktoz | - | | - |

Tablo 3.9. *B. sphaericus* X ve Y'nin Etki Spektrumu

| Mikroorganizma | Etki | Mikroorganizma | Etki |
|-------------------------|------|------------------------------|------|
| <i>B. sphaericus</i> 27 | + | <i>B. thuringiensis</i> var. | |
| " " 28 | + | <i>israelensis</i> | - |
| " " 29 | + | <i>B. subtilis</i> | + |
| " " 31 | + | <i>B. cereus</i> | - |
| " " 34 | + | <i>S. typhimurium</i> | + |
| " " Kellen Q | + | <i>S. aureus</i> | - |
| " " 1881 | + | <i>A. ustus</i> TEM F26 | - |
| " " 1593 | + | <i>Alternaria</i> sp. | - |
| " " SSII-1 | + | | |
| " " ATCC 13805 | + | | |
| " " NRS 592 | + | | |
| " " ATCC 7055 | + | | |
| " " NRS 400 | + | | |
| " " PI | + | | |
| " " ATCC 12300 | - | | |
| " " ATCC 14577 | - | | |
| " " NRS 1198 | - | | |
| " " NTC 9602 | - | | |

3.8.3. *B. sphaericus* X ve Y'nin etki spektrumu

Tablo 3.9.'da *B. sphaericus* X ve Y'nin etki spektrumu görülmektedir. X ve Y bakterileri test edilen 18 *B. sphaericus* izolatından 4'ü hariç 14'üne etki etmişlerdir. Buna karşılık *B. thuringiensis* var. *israelensis*, *B. cereus*, *S. aureus* bakterileri ile *A. ustus* TEM F26 ve *Alternaria* sp. funguslarına etki etmemişlerdir. *B. subtilis* ve *S. typhimurium*'a ise etkili oldukları bulunmuştur.

B. sphaericus X'in NRS 592 ve 31 suşlarına etkisi sırasıyla Şekil 3.6. ve 3.7'de görülmektedir. NYSM agar besiyerinin 5 farklı bölgesine inokule edilerek 48 saat geliştirilen *B. sphaericus* X ürettiği bakteriyosinle indikatör bakterilerin gelişmesini engelleyerek inhibisyon zonları meydana getirmektedir. NRS 592 suşu 31 numaralı suşa nazaran daha fazla etkilenmiş olup inhibisyon zon çapları sırasıyla 3.0 cm ve 2.3 cm olarak bulunmuştur.

3.8.4. Bakteriyosin üretiminin kültür yaşı ile ilişkisi

Bakteriyosin üretiminin zamana bağlılığını gösterebilmek için NYSM agar besiyerinde yapılan deney sonucu Şekil 3.8'de görülmektedir. Petri kutusunun çevresindeki numaralar saat olarak kültür yaşını göstermektedir. Deney tamamlandıktan sonra, bakterinin gelişmesinin sonlandığı nokta ile inhibisyon zonunun sonlandığı nokta ölçülerek Tablo 3.10'daki değerler elde edilmiştir.

Tablo 3.10. Bakteriyosin Üretiminin Kültür Yaşı İle İlişkisi

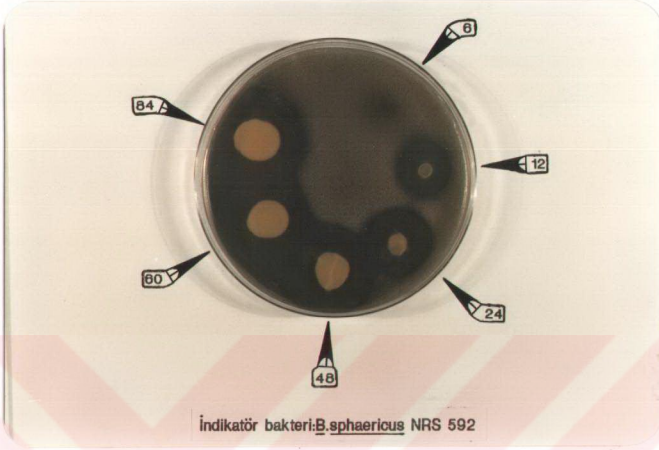
| Kültür yaşı | Inhibisyon zonu |
|-------------|-----------------|
| 6 saat | Yeni başlıyor |
| 12 saat | 7 mm |
| 24 saat | 8 mm |
| 48 saat | 8 mm |
| 60 saat | 8 mm |
| 84 saat | 8 mm |



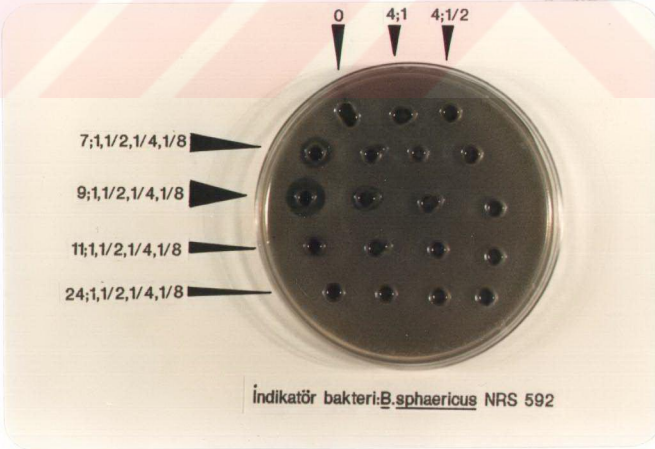
Şekil 3.6. *B. sphaericus* X' in NRS 592 Suşuna Etkisi



Şekil 3.7. *B. sphaericus* X' in 31 Numaralı Suşa Etkisi



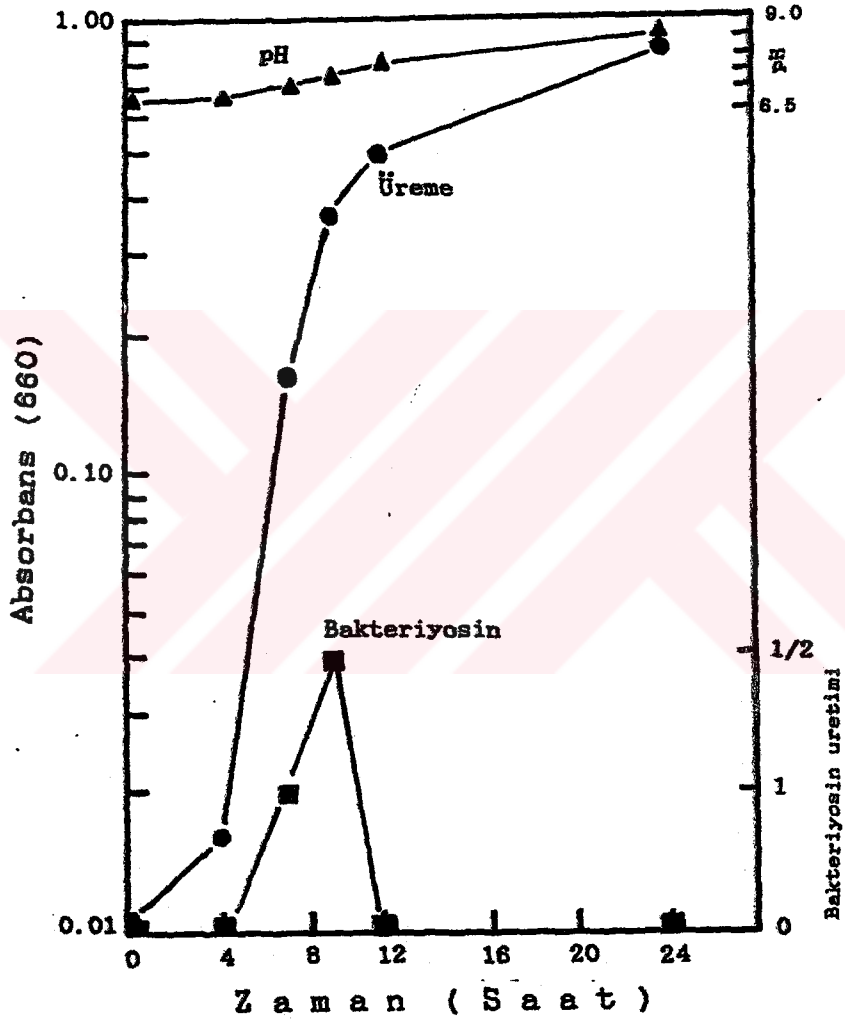
Şekil 3.8. Bakteri Kültür Yaşı İle Bakteriyosin Üretiminin İlişkisi (MYSM Agar Besiyerinde)



Şekil 3.9. Bakteri Kültür Yaşı İle Bakteriyosin Üretiminin İlişkisi (NYSM Broth)

B. sphaericus X'in bakteriyosin üretiminin ve stabilitesinin zamana bağımlılığı ise Şekil 3.9'da görülmektedir. Şekildeki "0" ilk başta alınan örneği, ";" işaretinden önceki rakamlar kültür yaşını (saat olarak) ve sonraki rakamlar seyreltme oranlarını göstermektedir. Şekilden de görüleceği gibi, bakteriyosin üretimi 7. saatte başlamakta, 9. saatte maksimuma ulaşmakta ve 11. saatten sonra ise üretilen bakteriyosin ortadan kaldırılmaktadır. 7. saatte sadece seyreltilmemiş örnekte inhibisyon elde edilebildiği halde, 9. saatte ise 1/2'lik seyreltmede de inhibisyon elde edilmiştir. 11. saatte ise yok denecek kadar azdır. 24 saat sonra ise mevcut aktivite ortadan kalkmıştır.

Şekil 3.10'da ise, *B. sphaericus* X'in NYSM Broth'daki gelişme eğrisi, pH değişimi ve bakteriyosin üretimi görülmektedir. pH değeri ilk başlangıçta 6.80 olduğu halde 24 saat sonra 8.56'ya yükselmiştir. Absorbans değeri ise özellikle 4. saatten sonra hızlı bir artış göstermiş olup 11. saatten sonra yavaşlamıştır. Bakteriyosin üretiminin 9. saatte maksimal değere ulaştığı yine şekilden anlaşılmaktadır. İnkübasyonun devamı süresince yapılan mikroskopik incelemelere göre, 11. saate kadar hiç bir spor oluşmamış, 11. saatte bütün hücreler sporlanmış fakat serbest spor henüz teşekkül etmemiş, 24 saat sonra ise kültürde sadece sporların bulunduğu tesbit edilmiştir.



Şekil 3.10. *B. sphaericus* X'in NYSM Broth'daki Gelişimi ve Bakteriyosin Üretimi

T A R T I Ő M A

Gerek toprak ve dip çamuru ve gerekse diğer örneklerden *B. sphaericus*'un izolasyonunda kullanılan metodun başarıyla uygulandığı görülmüştür. Metodda kullanılan pastörizasyonla bütün vejetatif formlar yok edildiği gibi, NYST besiyeri *B. thuringeinsis* var. *israelensis*, *B. subtilis* ve *B. cereus*'un gelişmesini engelliyerek daha fazla seçim sağlanmaktadır.

Elde edilen 342 adet *B. sphaericus* izolatından sadece 9'u insektisidal aktiviteye sahiptir. Patojen izolatların toplam izolatlar içindeki oranı yaklaşık olarak % 2.6 civarındadır. Bu da *B. sphaericus*'un doğada genelde saprofit formda bulunduğunu göstermektedir. Patojenlerden sadece 31 ve 34 numaralı izolatlar insektisidal aktivitelerini devam ettirmiş, diğerleri kaybetmiştir. *B. sphaericus*'taki toksisite genlerinin plazmid/ler üzerinde bulunduğuna dair kesin bir delil ortaya konamamıştır. Çünkü değişik araştırmacılar tarafından birbirine zıt sonuçlar elde edilmiştir (Davidson vd 1982, Abe vd 1983, Singer 1987). Sonuçta, 75 mD (miliDalton)'luk plazmidin yüksek aktiviteye sahip suşlarda ortak olarak bulunduğu görülmektedir (Singer 1987, A.A. Yousten 1989, sözlü görüşme). Bu çalışmada elde edilen 6, 18, 25, 27, 28, 29 ve 71 numaralı *B. sphaericus* suşlarının insektisidal aktivitelerini kaybetmiş olmaları toksin genlerinin bazı suşlarda plazmid/ler üzerinde olabileceğini göstermektedir. Henüz kesinlik kazanmamış olan bu konu, ileride bu yönde yapılacak araştırmalarla daha detaylı olarak incelenecektir.

Türkiye'den elde edilen *B. sphaericus* izolatlarının koloni morfolojileri daha çok *B. sphaericus* 1593, 2297 ve 2362 kolonilerine benzemekte, sadece renkleri biraz daha açık tondadır. SSII-1 suşununkilere göre ise daha koyu renktedirler.

Patojen izolatlar kültürel ve biyokimyasal özellikleri yönünden karşılaştırıldığında, *B. sphaericus* için literatürde verilen sonuçlara uygunluk göstermiştir. Sadece 31 numaralı izolat jelâtini hidrolize ederek diğerlerinden ayrılmıştır. *B. sphaericus*'un şekerleri kullanamaması transport sistemine ve solunum yollarında

yer alan bazı enzimlerin yokluğuna bağlanmıştır (Russel vd 1989). Bakterinin glukoz veya sukrozu kullanamaması şekerlerin hücre içeri-sine alınamamasına dayanmaktadır. Ayrıca Embden-Myerhorf-Parnas, Heksoz Monofosfat ve Entner-Doudoroff yollarında yer alan bazı baş-langıç enzimlerinin bulunmadığı tesbit edilmiştir. Bu durum özel-likle *B. sphaericus*'un büyük ölçekli fermentörlerde ucuz subs-tratlar kullanılarak üretimi yönünden önem taşımaktadır. İleride yapılacak genetik çalışmalarla maliyeti düşük substratları kullana-bilen rekombinantların üretilmesi mümkün olabilir.

Bu çalışmada elde edilen patojen *B. sphaericus* suşlarının virülensleri (% ölüm değerleri olarak) SSII-1 suşu civarında tesbit edilmiş olup 1593 suşuna göre çok düşük bulunmuştur (Tablo 3.4, 3.5, 3.6). Benzer sonuçlar A.B.D., Virginia Polytechnic Institute and State University, Biyoloji Bölümünde yapılan biyoesseylerde de LC50 ($\mu\text{gr/ml}$ dozunda spor) olarak ifade edilmiştir. 31 ve 34 numaralı suşların LC50 değerleri *B. sphaericus* 2362'ninki ile karşılaştırıl-dığında, sırasıyla 1.5×10^6 ve 4.5×10^5 defa daha düşük bulunmuş-tur. SSII-1 suşu ile karşılaştırıldığında ise sırasıyla yaklaşık 70 ve 20 defa daha düşük larvasidal aktiviteye sahiptirler (Tablo 1.2). Buna karşılık 34 numaralı izolat virülens yönünden Filipinlerden izole edilen 2115 ve 2118 numaralı suşlarla benzerlik göstermiştir.

B. sphaericus'un "O" antijenine karşı hazırlanan antiserumun bakterinin teşhisinde kullanılamayacağı görülmüştür. *B. sphaericus*'un gerek serolojik teşhisi gerekse suşların ayrımı için H (flagellar) antijenlerinden faydalanılmaktadır (de Barjac vd 1980).

Dr. Yousten'in izole ettiği fajlarla yapılan faj tiplendirme deneylerinde bazı ilginç ilişkiler bulunmuştur. Bu fajların sadece patojen *B. sphaericus* suşlarıyla reaksiyon verdiği bildirilmiştir (Yousten 1984). Nitekim patojenitesini kaybetmiş olan 27, 28 ve 29 numaralı izolatlar fajlardan hiç birisi ile reaksiyon vermemiştir (Tablo 3.7). Buna karşılık patojen olmadıkları halde *B. sphaericus* X ve Y bakterileri ise 4, 5 ve 14 numaralı fajlarla reaksiyon vererek faj grubu 3'e girmişlerdir. Yousten'a göre (1984) faj grubu 3, *B. sphaericus* 1593 grubu olarak sınıflandırılmış olup 2297, 2362 gibi yüksek virülense sahip suşlar bu grupta yer alırlar. Bu durum, faj-

ların uzun süre saklanması dolaylı karakterlerinin değişmiş olmasından ileri gelebilir (A. A. Yousten 1989, sözlü görüşme). Veya patojen olan ve olmayan bakterilerdeki faj reseptörlerinin ortak olmasından dolayı çapraz reaksiyon ortaya çıkabilir. Bütün bunlar faj süspansiyonlarının saf olduğu düşünülerek söylenebilir. 31 ve 34 numaralı izolatlar ise SST fajı hariç bütün fajlarla reaksiyon vererek Yousten'in (1984) sınıflandırması dışına çıkmıştır.

B. sphaericus'taki bakteriyosin üretimi ile ilgili şu ana kadar herhangi bir kayıt yoktur. İlk defa bu çalışmada elde edilen *B. sphaericus* X ve Y izolatlarının bakteriyosin ürettikleri görülmüştür. Bu iki bakteri sadece β -hemoliz yapmalarıyla diğer *B. sphaericus* suşlarından ayrılmaktadırlar (Tablo 3.8). *B. thuringiensis* var. *israelensis*'e etki etmemeleri ile de sivrisinek patojeni olan *B. sphaericus*'u bu bakteriden ayırmada kolaylık sağlayabilirler.

Bakteriyosin üretiminin bakteri kültür yaşıyla ilişkisini tesbit etmek için yapılan deneyde kullanılan besiyerinin önemli olduğu görülmüştür. NYSM Broth besiyerinden tuzlar çıkarıldığı zaman bakteriyosin üretimi ve sporulasyon bloke edilmektedir. Maksimal bakteriyosin üretimi sporulasyondan hemen önce olmaktadır. Aynı zamanda süspansiyonların antibakteriyal etkisini tesbit etmede kullanılan metodun da önemli olduğu görülmüştür. Mayr-Harting vd'nin (1972) metodu kullanıldığında herhangi bir aktivite görülmediği halde, modifiye edilen tek katlı yumuşak agar metodu kullanılarak antibakteriyal etki gözlenebilmiştir (Bölüm 2.2.6.1'de açıklandığı şekilde). Antibakteriyel etkinin 7. saatte ortaya çıkıp, 9. saatte maksimal bir düzeye ulaştıktan sonra ortadan kalkması, hücrelerin parçalanması veya sporulasyona başlamasından dolayı birçok litik enzimin besiyerine karışmasına bağlanabilir. Fakat yapılan bakteriyosin - stabilite deneylerinde bakteriyosini/aktivitesini ortadan kaldıran faktör maksimal aktivitenin görüldüğü 9. saat ekstraktında da mevcuttur. Favret ve Yousten (1989), benzer metodlarla *B. thuringiensis*'teki bakteriyosin üretimini incelemişler ve bakteriyosin üretiminin 6. saatten sonra görülebilir bir düzeye ulaştığını, 18. saatten sonra da bakteriyosin seviyesinin düştüğünü tesbit etmişlerdir. *B. sphaericus*'ta ilk defa tesbit edilen bakteriyosinin yapı, moleküler ağırlık, indüksiyon ve inhibisyon gibi yönlerden

incelenmesi gerekmektedir.

Araştırma sonuçları, Türkiye'nin değişik *B. sphaericus* suşları bulundurduğunu göstermektedir. Ülkemizde henüz yeni sayılan bu konunun sistemli bir şekilde yürütülebilmesi için değişik branşlar arasında koordinasyonların kurulması gerekmektedir. Bir yandan yeni *B. sphaericus* suşlarının izolasyonuna çalışırken, bir yandan da moleküler biyolojide kullanılan teknikler yardımıyla mutantların eldesi, fermentasyonu ve sonuçta arazide uygulanması çalışmalarının bir bütün halinde yürütülmesi bu konunun hızlı bir şekilde ilerlemesini ve aynı zamanda ülke kaynaklarının iyi değerlendirilmesini sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- ABE, K., FAUST, R.M. ve BULLA, L.A., 1983. Plasmid deoxyribonucleic acid in strain of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus moritai* J. Invertebr. Pathol. 41 : 328-335.
- BAUMANN, P., UNTERMAN, B.M., BAUMANN, L., BROADWELL, A.H., ABBENE, S. J. ve BOWDITCH, R.D., 1985. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high molecular weight precursors. J. Bacteriol. 163 : 738-747.
- BAUMANN, P., BROADWELL, A.H., BAUMANN, L., UNTERMAN, B.M. ve BOWDITCH, R. D., 1986. Chemistry of the *Bacillus sphaericus* toxin. In "Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology" (Editors: R.A. SAMSON, J.M. VLAK and D. PETERS). pp. 23-25. Printed by Grafisch bedrijf Ponsen and Looijen, Wageningen, The Netherlands.
- BAUMANN, P., BAUMANN, L., BOWDITCH, R. ve BROADWELL, A., 1987. Cloning of the gene for the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus*; evidence for a family of related sequences. J. Bacteriol. 169: 4061-4067.
- BECKER, N.F. ve METZ, A., 1986. Application of irradiated bacterial insecticides in an integrated mosquito control program in West Germany. In "Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology" (Editors: R.A. SAMSON, J.M. VLAK and D. PETERS). p. 559. Printed by Grafisch bedrijf Ponsen and Looijen, Wageningen, The Netherlands.
- BOŞGELMEZ, A., ÇAKMAKÇI, L., GÜRKAN, B., GÜRKAN, F. ve ÇETİNKAYA, G., 1983. Büyük mum güvesi, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera : Galleriidae) üzerine *Bacillus thuringiensis*'in etkisi. Mikrobiyoloji Bülteni, 17 (4): 233-242.
- BOŞGELMEZ, A., ÇAKMAKÇI, L., GÜRKAN, B., GÜRKAN, F. ve ÇETİNKAYA, G., 1984. *Amorphogynia necessaria* Zell (Lepidoptera: Geometridae) üzerine *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*'in etkisi. TÜBİTAK Ulusal Çevre Simpozyumu, 12-16 Kasım 1984, Adana.
- BOWDITCH, R., BAUMANN, P. ve YOSTEN, A.A., 1989. Cloning and sequencing the gene coding for a 125 kilodalton surface layer protein from *Bacillus sphaericus* 2362 and a related cryptic gene. J. Bacteriol. 171: 4178-4188.
- BROADWELL, A.H., ve BAUMANN, P., 1986. Sporulation-associated activation of *Bacillus sphaericus* larvicide. Appl. Environ. Microbiol. 52 (4): 758-764.
- BROWNBRIDGE, M. ve MARGALIT, J., 1986. Isolation of new *Bacillus sphaericus* strains, toxic to mosquitoes, in Israel. In "Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology" (Editors: R.A. SAMSON, J.M. VLAK and D. PETERS). p.15. Printed by Grafisch

- bedrijf Ponsen and Looijen, Wageningen, The Netherlands.
- BURKE, W.F., McDONALD, K.O. ve DAVIDSON, E.W., 1983. Effect of UV light on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (4): 954-956.
- BURSALIOĞLU, M. ve ÖNER, M., 1987. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ve *Bacillus sphaericus* olarak tanımlanan susların sivrisinek (*Culex sp.*) larvalarına olan etkilerinin karşılaştırılması. VIII. Ulusal Biyoloji Kongresi. 166-177. 3-5 Eylül 1986, İzmir.
- ÇAKMAKÇI, L., BOŞGELMEZ, A., SOYLU, O.Z., BULUT, H. ve GÜRKAN, B., 1985. *Bacillus thuringiensis*'in üretim olanakları ve tarımda önemli zararlara neden olan bazı lepidopter türlerine karşı etkinliklerinin saptanması üzerine araştırmalar. TÜBİTAK, Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu, Tarımsal Mikrobiyoloji Ünitesi; Proje No: TARMİK-3.
- CHARLES, J.F., 1986. Cell development during toxin synthesis by *Bacillus sphaericus*. In "Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology" (Editors: R.A. SAMSON, J.M. VLAK and D. PETERS). pp. 19-22. Printed by Grafisch bedrijf Ponsen and Looijen, Wageningen, The Netherlands.
- COWAN, S.T. ve STELL, K.J., 1966. Manual for the Identification of Medical Bacteria. At the University Press. Cambridge.
- DAVIDSON, E.W., 1982a. Purification and properties of soluble cytoplasmic toxin from the mosquito pathogen *Bacillus sphaericus* strain 1593. *J. Invertebr. Pathol.* 39: 6-9.
- DAVIDSON, E.W., 1982b. *Bacillus sphaericus* as a microbial control agent for mosquito larvae. *Integ. Mosq. Cont. Method.* 2: 213 - 225.
- DAVIDSON, E.W., 1986. Effects of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spore/crystal toxin on cultured mosquito cells. *J. Invertebr. Pathol.* 47: 21-31.
- DAVIDSON, E.W., 1987. In vivo pathology of bacterial pathogens of insects (Abstracts). Society for Invertebrate Pathology XX. Annual Meeting. July 20-24. Florida, U.S.A.
- DAVIDSON, E.W., ve MYERS, P., 1981. Parasporal inclusions in *Bacillus sphaericus*. *FEMS Microbiol. Letters* 10: 261-265.
- DAVIDSON, E.W., SPIZIZEN, J. ve YOSTEN, A.A., 1982. Recent advances in the genetics of *Bacillus sphaericus*. *Proc. Intl. Colloq. Invertebr. Pathol.* Brighton, U.K., p. 14.
- DAVIDSON, E.W., URBINA, M., PAYNE, J., MULLA, M.R., DARWAZEH, H., DULMAGE, H.T. ve CORREA, J.A., 1984. Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1): 125-129.

- DAVIDSON, E.W. ve TITUS, M., 1987. Ultrastructural effects of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxin on cultured mosquito cells (Abstracts). Society for Invertebrate Pathology XX. Annual Meeting. July 20-24. Florida, U.S.A.
- DAVIDSON, E.W., BIEBER, A.L., MEYER, M. ve SHELLABARGER, C., 1987a. Enzymatic activation of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxin. J. Invertebr. Pathol. 50: 40-44.
- DAVIDSON, E.W., SHELLABARGER, C., MEYER, M. ve BIEBER, A.L., 1987b. Binding of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxin to cultured insect cells. Canad. J. Microbiol. 33: 982-989.
- de BARJAC, H., 1981. Insects pathogens in the genus *Bacillus*. In "The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. Classification and Identification (Editors: R.C.W. BERKELEY and M. GOODFELLOW). Chapter 10: 241-250. Academic Press. London.
- de BARJAC, H., VERON, M. ve COSMAO-DUMANOIR, V., 1980. Characterisation biochimique et serologique de souches de *Bacillus sphaericus* pathogenes ou non pour les moustiques. Ann. Microbiol (Inst. Pasteur). 131B: 191-201.
- de BARJAC, H., THIERY, I., COSMAO-DUMANOIR, V., FRACHON, E., LAURENT, P., CHARLES, J.F., HAMON, S. ve OFORI, J., 1988. Another *Bacillus sphaericus* serotype harbouring strains very toxic to mosquito larvae : serotype H6. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 139: 363-377.
- DHARMSTHITI, S.C., PANTUWATANA, S. ve BHUMIRATANA, A., 1985. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis and *Bacillus sphaericus* strain 1593 on media using a byproduct from a monosodium glutamate factory. J. Invertebr. Pathol. 46: 231-238.
- FAVRET, M.E. ve YOSTEN, A.A., 1989. Thuricin : The bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 53: 206 - 216.
- GENESAN, S., KAMDAR, H., JAYARAMAN, K. ve SZULMAJTER, J., 1983. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a DNA fragment from *Bacillus sphaericus* coding for biocidal activity against mosquito larvae. Mol. Gen. Genet. 189: 181 - 183.
- GOLDBERG, L.J., FORD, I., TANABE, A.M. ve WATKINS, H.M.S., 1977. Effectiveness of *Bacillus sphaericus* var. *fusiformis* (SSII-1) as a potential mosquito larval control agent: The role of variations in natural microbial flora in the larval environment. Mosq. News 37 (3): 465-470.
- HARRIGAN, W.F. ve McCANCE, M.E., 1966. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, London and New York.
- HERTLINE, B., LEVY, R. ve MILLER, T., 1979. Recycling potential and selective retrieval of *Bacillus sphaericus* from soil in a mosquito habitat. J. Invertebr. Pathol. 33: 217-221.

- KALFON, A., CHARLES, J.F., BOURGOUIN, C. ve de BARJAC, H., 1984. Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297 : An electron microscope study of crystal-like inclusions biogenesis and toxicity to mosquito larvae. *J.Gen. Microbiol.* 130: 893-900.
- KEKESY, D. ve PIQUET, J., 1970. New method for detecting bacteriocin production. *Appl. Microbiol.* 20: 282-283.
- KELLEN, W.R. ve MEYERS, C.M. 1964. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *Proc. Annu. Conf. Calif. Mosq. Contr. Assn.* 32: 37.
- KELLEN, W.R., CLARK, T., LINDEGREN, J., HO, B., ROGOFF, M. ve SINGER, S., 1965. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.*, 7: 442-448.
- KÖŞKER, O. ve ÇAKMAKÇI, L., 1983. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Klavuzu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Teksir No: 111. Ankara.
- KRYCH, V.K., JOHNSON, J.L. ve YOSTEN, A.A., 1980. Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*. *Internat. J. System. Bacteriol.* 30 (2): 476-484.
- LACEY, L.A. ve SINGER, S., 1982. The larvicidal activity of new isolates of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* H-14 against anopheles and culicine mosquitoes. *Mosq. News* 42: 537 - 543.
- LOUIS, J., JAYARAMAN, K. ve SZULMAJISTER, J., 1984. Biocide gene(s) and biocidal activity in different strains of *Bacillus sphaericus*. Expression of the gene(s) in *Escherichia coli* maxicells. *Mol. Gen. Genet.* 195: 23-28.
- LYSENKO, O., DAVIDSON, E.W., LACEY, L.A. ve YOSTEN, A.A., 1985. Five new mosquito larvicidal strains of *Bacillus sphaericus* from nonmosquito origins. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* 1: 369 - 371.
- MASSIE, J., ROBERTS, G. ve WHITE, P.J. 1985. Selective isolation of *Bacillus sphaericus* from soil by use of acetate as the only major source of carbon. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(6): 1478 - 1481.
- MAYR-HARTING, A., HEDGES, A. ve BERKELEY, R., 1972. Methods for studying bacteriocins. In "Methods in Microbiology" (Editors: J. NORRIS and D. RIBBONS), vol. 7A, pp. 315-422. Academic Press, New York.
- MCDONALD, K.O. ve BURKE, W., 1984. Plasmid transformation of *Bacillus sphaericus* 1593. *J.Gen. Microbiol.* 130: 203-208.
- MENON, K.K.R., RAO, A.S. ve AMONKAR, S.V. 1982a. Isolation, Identification and toxicity of a spore-bearing *Bacillus* (ISPC5) from diseased mosquito larvae. *Indian J. Exper. Biol.* 20: 312-315.
- MENON, K.K.R., RAO, A.S. ve AMONKAR, S.V., 1982b. Toxic activity and histopathological effects of *Bacillus sphaericus* (ISPC5) on

- mosquito larvae. Indian J. Exper. Biol. 20: 768-772.
- MIAN, L.S. ve MULLA, M.S., 1983. Effect of proteolytic enzymes on the activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Bull. Soc. Vector Ecol. 8: 122-127.
- MULLA, M.S., 1986. Role of BTI and *Bacillus sphaericus* in mosquito control programs. In "Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology" (Editors: R.A.SAMSON, J.M.VLAK and D.PETERS) pp. 494-496. Printed by Grafisch bedrijf Ponsen and Looijen, Wageningen, The Netherlands.
- MULLIGAN III, F.S., SCHAEFER, C.H. ve MIURA, T., 1978. Laboratory and field evaluation of *Bacillus sphaericus* as a mosquito control agent. J. Econ. Entomol. 71: 774-777.
- MULLIGAN III, F.S., SCHAEFER, C.H. ve WILDER, W.H., 1980. Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* H-14 against mosquitoes under laboratory and field conditions. J. Econ. Entomol. 73: 684-688.
- MYERS, P. ve YOSTEN, A.A., 1978. Toxic activity of *Bacillus sphaericus* SSII-1 for mosquito larvae. Infect. Immun. 19(3): 1047-1053.
- MYERS, P. ve YOSTEN, A.A., 1980. Localization of the mosquito - larval toxin of *Bacillus sphaericus* 1593. Appl. Environ. Microbiol. 39: 1205-1211.
- MYERS, P., YOSTEN, A.A. ve DAVIDSON, E.W., 1979. Comparative studies of the mosquito-larval toxin of *Bacillus sphaericus* SSII-1 and 1593. Canadian J. Microbiol. 25: 1227-1231.
- NICOLAS, L., 1986. Efficacy and fate of *Bacillus sphaericus* 2362 in *Culex quinquefasciatus* breeding sites in West Africa. In "Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology" (Editors: R.A.SAMSON, J.M. VLAK and D.PETERS). p.548. Printed by Grafisch bedrijf Ponsen and Looijen, Wageningen, The Netherlands.
- PAYNE, J.M. ve DAVIDSON, E.W., 1984. Insecticidal activity of the crystalline parasporal inclusions and other components of the *Bacillus sphaericus* 1593 spore complex. J. Invertebr. Pathol. 43: 383-388.
- RAMOSKA, W.A. ve PACEY, C., 1979. Food availability and period of exposure as factors of *Bacillus sphaericus* efficacy on mosquito larvae. J.Econ. Entomol. 72: 523-525.
- RUSSELL, B.L., SCOTT, A.J. ve YOSTEN, A.A., 1989. Carbohydrate metabolism in the mosquito pathogen *Bacillus sphaericus* 2362. Appl. Environ. Microbiol. 55(2): 294-297.
- SINGER, S., 1973. Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. Nature 244: 110-111.
- SINGER, S., 1980. *Bacillus sphaericus* for the control of mosquitoes. Biotechnol. Bioengin. 22: 1335-1355.

- SINGER, S., 1987. Current status of the microbial larvicide *Bacillus sphaericus*. In "Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture" (Editor: K.Maramorosch) pp. 133-163. Academic Press.
- SINGER, S., WILLISTON, B.K. ve COLE, C.L., 1986. An enzymatic analysis using a PAGE system for differentiating strains of *Bacillus sphaericus*. In "Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology" (Editors: R.A.SAMSON, J.M.VLAK and D. PETERS). p. 15 Printed by Grafisch bedrijf Ponsen and Looijen, Wageningen, The Netherlands.
- TAMER, A.U., UÇAR, F., ÜNVER, E., KARABOZ, İ., BURSALIOĞLU, M. ve OGULTEKİN, R., 1986. 3. ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu. İkinci baskı. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Tezsiz Serisi No: 55, İzmir.
- TANDEAU de MARSAC, N., de la TORRE, F. ve SZULMAJSTER, J., 1987. Expression of the larvicidal gene *Bacillus sphaericus* 1593M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. Mol.Gen. Genet., 209: 396-398.
- THIERY, I., 1986. Constraints and value of bioassays for standardization of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. In "Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology" (Editors: R.A.SAMSON, J.M.VLAK and D.PETERS). pp. 677-681. Printed by Grafisch bedrijf Ponsen and Looijen,, Wageningen, The Netherlands.
- TINELLI, R. ve BOURGOUIN, C., 1982. Larvicidal toxin from *Bacillus sphaericus* spores: isolation of toxic components. FEMS Letters 142(1) : 155-158.
- TINELLI, R., de BARJAC, H. ve BOURGOUIN, C., 1980. Isolement d'une fraction de spore de *Bacillus sphaericus* toxique pour les larves d'*Anopheles*. C.R. Acad. Sc. Paris. t. 291 serie D: 537-539.
- TSUCHYAMA, A., 1980. Pathogenicity of *Bacillus sphaericus* to larvae of the mosquito, *Culex pipiens*. Jap. J. Appl. Entomol. Zool. 24: 93-97.
- WEISER, J., 1984. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from Northern Nigeria. Zbl. Mikrobiol. 139: 57-60.
- WRAIGHT, S.P., SINGER, S. ve JAMNBACK, H., 1978. A comparison of the effectiveness of *Bacillus sphaericus*/SSII-1 against *Aedes stimulans* and *Aedes triseriatus* larvae (Diptera: Culicidae) at different temperatures. J. The New York Entomol. Society 86(4): 329.
- WRAIGHT, S.P., MOLLOY, D. ve JAMNBACK, H., 1981a. Efficacy of *Bacillus sphaericus* strain 1593 against the four instars of laboratory reared and field collected *Culex pipiens pipiens* and

- laboratory reared *Culex salinarius*. Can. Entomol. 113: 379-386.
- WRAIGHT, S.P., MOLLOY, D., JAMNBACK, H. ve McCOY, P., 1981b. Effects of temperature and instar on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 against *Aedes stimulans* larvae. J. Invertebr. Pathol. 38: 78-87.
- YAMAMOTO, T. ve IIZUKA, T., 1983. Two types of entomocidal toxins in the parasporal crytals of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Arch. Biochem. Biophys. 227(1): 223-241.
- YOUSTEN, A.A., 1984. Bacteriophage typing of mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. J. Invertebr. Pathol. 43: 124-125.
- YOUSTEN, A.A. ve DAVIDSON, E.W., 1982. Ultrastructural analysis of spores and parasporal crystals formed by *Bacillus sphaericus* 2297. Appl. Environ. Microbiol. 44(6): 1449 - 1455.
- YOUSTEN, A.A. ve HEDRICK, J., 1982. Bacteriophage typing of mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. Proc. Int. Colloq. Invertebr. Pathol. pp. 476-482. Brighton, UK.
- YOUSTEN, A.A., JONES, M.E. ve BENOIT, R.E., 1982. Development of selective/differential bacteriological media for the enumaration of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (H-14) and *Bacillus sphaericus* 1593. WHO Mimeo. Doc. WHO/VBC/82.844.
- YOUSTEN, A.A., MADHEKAR, N. ve WALLIS, D.A., 1984a. Fermentation conditions affecting growth, sporulation, and mosquito larval toxin formation by *Bacillus sphaericus*. Develop. in Indust. Microbiol. 25: 757-762.
- YOUSTEN, A.A., WALLIS, D.A. ve SINGER, S., 1984b. Effect of oxygen on growth, sporulation, and mosquito larval toxin formation by *Bacillus sphaericus* 1593. Current Microbiol. 11: 175-178.
- YOUSTEN, A.A., FRETZ, S.B. ve JELLEY, S.A., 1985. Selective medium for mosquito-pathogenic strains *Bacillus sphaericus*. Appl. Environ. Microbiol. 49(6): 1532-1533.

EKLER**EK-A Besiyerleri ve Hazırlanışları****Nutrient Broth (NB):**

Pepton 5.0 gr

Beef Ekstrakt 3.0 gr

Hazırlanışı : Maddeler damıtık su içerisinde süspanse edilir, hacim 1 litreye tamamlanır , eritilir ve tüplere veya erlenmayerlere taksim edilir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Triptofanlı Nutrient Broth:

Nutrient Broth 8.0 gr

Triptofan 1.0 gr

Hazırlanışı: Maddeler damıtık su içerisinde süspanse edilir, hacim 1 litreye tamamlanır, eritilir ve tüplere taksim edilir. Açık otoklavda 100°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Nutrient Agar (NA):

Nutrient Broth 8.0 gr

Bacto Agar 15.0 gr

Hazırlanışı: Maddeler damıtık su içerisinde süspanse edilir, hacim 1 litreye tamamlanır, eritilir ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Nutrient Jelatin:

Nutrient Broth 8.0 gr

Jelatin 120.0 gr

Hazırlanışı: Maddeler damıtık su içerisinde süspanse edilir, hacim 1 litreye tamamlanır, eritilir ve tüplere 7-8'er ml taksim edilir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyondan sonra tüpler dik vaziyette bırakılarak katılaşmaları sağlanır.

Kanlı Nutrient Agar:

Nutrient agar 23.0 gr

Kan 70.0 ml

Hazırlanışı: Nutrient agar damıtık su içerisinde süspanse edilir,

hacim 930 ml'ye tamamlanır ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. 50°C'lik su banyosunda sabit sıcaklığa getirildikten sonra 70 ml steril, fibrinsiz koyun kanı ile karıştırılır ve petri kutularına dökülür.

Nutrient Broth + Yeast Ekstrakt Medium (NYM Broth):

Nutrient Broth 8.0 gr

Yeast Ekstrakt 0.5 gr

Hazırlanışı : Maddeler damıtık suda süspanse edilir, eritilir, hacim 1 litreye tamamlanır ve tüplere 0.9'ar ml taksim edilir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Nutrient Broth + Yeast Ekstrakt Yumuşak Agar (NYM Yumuşak Agar):

Nutrient Broth 8.0 gr

Yeast Ekstrakt 0.5 gr

Bacto Agar 7.5 gr

Hazırlanışı : Maddeler damıtık suda süspanse edilir, eritilir, hacim 1 litreye tamamlanır ve tüplere 3'er ml taksim edilir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Nutrient Broth + Yeast Ekstrakt + Tuz Medium (NYSM Broth):

Nutrient Broth..... 8.0 gr

Yeast Ekstrakt 0.5 gr

CaCl₂ 7.0x10⁻⁴M

MnCl₂ 5.0x10⁻⁵M

MgCl₂ 1.0x10⁻³M

Hazırlanışı : Maddeler damıtık su içerisinde süspanse edilir, hacim 1 litreye tamamlanır, eritilir ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Nutrient Broth + Yeast Ekstrakt + Tuz Yumuşak Agar Medium (NYSM Yumuşak Agar):

Nutrient Broth 8.0 gr

Yeast Ekstrakt 0.5 gr

CaCl₂..... 7.0x10⁻⁴M

MnCl₂..... 5.0x10⁻⁵M

MgCl₂..... 1.0x10⁻³M

Bacto Agar 7.5 gr

Hazırlanışı : Maddeler damıtık su içerisinde süspanse edilir, hacim 1

litreye tamamlanır, eritilir ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Nutrient Broth + Yeast Ekstrakt + Tuz Agar (NYSM Agar):

| | |
|-------------------------|------------------------|
| Nutrient Agar | 23.0 gr |
| Yeast Ekstrakt | 0.5 gr |
| CaCl ₂ | 7.0x10 ⁻⁴ M |
| MnCl ₂ | 5.0x10 ⁻⁵ M |
| MgCl ₂ | 7.5x10 ⁻³ M |

Hazırlanışı : Maddeler damıtık su içerisinde süspansiyon edilir, hacim 1 litreye tamamlanır, eritilir ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Nutrient Agar + Yeast Ekstrakt + Streptomisin Medium (NYST Agar):

| | |
|------------------------|----------|
| Nutrient Agar | 23.0 gr |
| Yeast Ekstrakt | 0.5 gr |
| Streptomisin Sülfat .. | 100.0 mg |

Nutrient Agar ve Yeast Ekstrakt damıtık suda süspansiyon edilir, hacim 1 litreye tamamlanır ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. 50°C'lik su banyosuna konarak sabit sıcaklığa gelmesi sağlanır. 1-2 ml damıtık suda çözülün streptomisin sülfat 0.2 µm'lik membran filtreden süzülerek sterilize edilir ve besiyeri ile karıştırılarak petri kutularına dökülür.

Biotin + Arjinin + Tiamin + Streptomisin + Tuz Besiyeri (BATS):

Tuz Solusyonu :

| | |
|--|----------|
| MgSO ₄ x7H ₂ O | 50.0 mg |
| MnCl ₂ x4H ₂ O | 4.0 mg |
| FeSO ₄ x7H ₂ O | 2.8 mg |
| CaCl ₂ x2H ₂ O | 1.5 mg |
| Damıtık su | 450.0 ml |

Maddeler damıtık su içerisinde eritilir ve bu solusyona %0.03 oranında (hacim/hacim) H₂SO₄ karıştırılarak asitleştirilir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Fosfat Tuzları + Agar Solusyonu :

| | |
|--|----------|
| Na ₂ HPO ₄ | 5.57 gr |
| KH ₂ PO ₄ | 2.40 gr |
| Bacto Agar | 15.00 gr |

Damıtık su 500.00 ml

Maddeler damıtık su içerisinde süspanse edilir, eritilir ve otoklavda 21°C'de 15 dakika sterilize edilir . 50°C'lik su banyosuna konarak sabit sıcaklığa gelmesi sağlanır.

Amino Asit + Streptomisin Sülfat Solusyonu :

L-Arjinin 5.0 gr

Tiamin 20.0 mg

Biotin 2.0 µg

Streptomisin Sülfat .. 100.0 mg

Damıtık su 50.0 ml

Damıtık suda çözülen maddeler 0.2 µm'lik membran filtreden süzülerek sterilize edilirler.

Hazırlanışı : Ayrı ayrı hazırlanıp sterilize edilen 3 solusyon karıştırılır ve petri kutularına dökülür.

Kligler Demirli Agar Besiyeri :

Lab-Lemco 3.0 gr

Yeast Ekstrakt 3.0 gr

Pepton 20.0 gr

NaCl 5.0 gr

Laktoz 10.0 gr

Dekstroz 1.0 gr

Demir sitrat 0.3 gr

Sodyum tiyosülfat 0.3 gr

Fenol kırmızısı 0.05 gr

Agar (Oxoid No:2) 12.0 gr

Hazırlanışı : Yukarıdaki hazır besiyerlerinden 55 gram tartılır, damıtık suda süspanse edilir, hacim 1 litreye tamamlanır, eritilir ve tüplere 10-12'şer ml taksim edilir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyondan sonra tüplerin taban kısmında 3.0-3.5 cm'lik eğilmemiş kısım kalacak şekilde tüpler eğilir ve katılaşmaları sağlanır.

Nişasta Agar Besiyeri :

Nutrient Agar 23.0 gr

Patates nişastası 10.0 gr

Nişasta bir miktar damıtık su içerisinde çözülür, Nutrient Agar ile

karıştırılır, hacim 1 litreye tamamlanır ve otoklavda 115°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Simon Sitrat Agar Besiyeri :

| | |
|---------------------------|---------|
| Magnezyum Sülfat | 0.2 gr |
| Amonyum Hidrojen Fosfat . | 0.2 gr |
| Sodyum Amonyum Fosfat .. | 0.8 gr |
| Sodyum Sitrat | 2.0 gr |
| Sodyum Klorür | 5.0 gr |
| Brom Timol Mavisi | 0.08 gr |
| Bacto Agar | 15.0 gr |

Hazırlanışı : Maddeler damıtık su içerisinde süspansiyon edilir, hacim 1 litreye tamamlanır, eritilir ve tüplere 7-8'er ml taksim edilir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir ve yatık vaziyette bırakılarak katılaşmaları sağlanır.

Brom Timol Mavisi İlaveli Peptonlu Su Besiyeri :

Peptonlu su :

| | |
|------------------|----------|
| Pepton | 10.0 gr |
| NaCl | 5.0 gr |
| Damıtık su | 900.0 ml |

Brom Timol Mavisi İndikatörü :

| | |
|-----------------------|----------|
| Brom Timol Blue | 0.4 gr |
| Damıtık su | 100.0 ml |

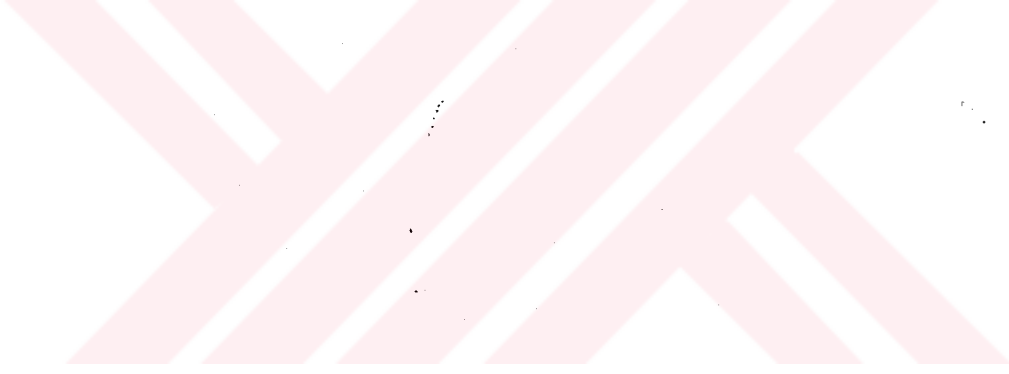
Hazırlanışı : 900 ml peptonlu suya 100 ml boya solusiyonu eklenir, iyice karıştırılır ve pH'ı 7.4'e ayarlanır. İçlerinde dührham tüpleri bulunan tüplere 5-7'şer ml taksim edilir ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Tüplerdeki besiyerlerine filtrasyonla sterilize edilmiş % 10'luk şeker solusiyonlarından son konsantrasyon %1 olacak şekilde ilave edilir

Glukoz - Fosfat Besiyeri :

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Pepton | 5.0 gr |
| K ₂ HPO ₄ | 5.0 gr |

Hazırlanışı : Maddeler damıtık suda çözülür, hacim 1 litreye tamam-

lanır, pH'ı 7,5'a ayarlanır ve 5 gram glukoz ilave edilir. iyice karıştırılır ve tüplere 1.5'ar ml taksim edilerek otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.



EK-B Boyalar, Diğer Solusyonlar ve Hazırlanışları**Amonyum Oksalat-Kristal Viyole Solusyonu :****Solusyon A:**

Kristal Viyole 10.0 gr

Etil Alkol (%95) 100.0 ml

Solusyon B:

Amonyum Oksalat 1.0 gr

Damıtık su 100.0 ml

Hazırlanışı : Solusyon A'dan 20 ml, solusyon B'den 80 ml. alınarak karıştırılır ve bir gece bekletildikten sonra süzülür.

Lugol Solusyonu :

İyot 1.0 gr

Potasyum iyodur 2.0 gr

Damıtık su 300.0 ml

Karbon-Fuksin Solusyonu :**Solusyon A:**

Bazik fuksin 10.0 gr

Etil alkol (%95) 100.0 ml

Boya alkolde çözülür ve 1 gece bekletildikten sonra süzülür.

Solusyon B:

Fenol 5.0 gr

Damıtık su 100.0 ml

Hazırlanışı : 10 ml solusyon A ile 100 ml solusyon B karıştırılır. Bu karışımdan 1 ml alınarak 10-20 hacim damıtık su ile seyreltilir.

Malasit Yeşili Solusyonu :

Malasit yeşili 3.0 gr

Damıtık su 100.0 ml

Sulu Bazik Fuksin Solusyonu :

Bazik fuksin 3.0 gr

Etil alkol (%95) 100.0 ml

Hazırlanışı : Bazik fuksin etil alkol içerisinde çözülür. Bu stoktan 10 ml alınır ve 100 ml damıtık su ile seyreltilir.

Aseton - İyot Solusyonu :

İyot 10.0 gr
 Potasyum iyodur 6.0 gr
 Damıtık su 10.0 ml

Hazırlanışı : İyot ve potasyum iyodur damıtık su içerisinde çözülür ve %95'lik etil alkolle 100 ml'ye tamamlanır. Bu solusyondan 3.5 ml alınır ve 96.5 ml aseton ile karıştırılır.

Kovacs Ayracı :

p-dimetilaminobenzaldehyt.. 5.0 gr
 Amil alkol 75.0 ml
 HCl 25.0 ml

Hazırlanışı : p-dimetilaminobenzaldehyt 50-55°C'lik su banyosunda alkol içerisinde çözülür. Bunun üzerine, soğuduktan sonra asit ilave edilir. Işıktan korunur ve +4°C'de saklanır.

Metil Kırmızısı Solusyonu :

Metil kırmızısı 0.04 gr
 Susuz etil alkol 40.0 ml
 Damıtık su 60.0 ml

Hazırlanışı : Metil kırmızısı önce etil alkolde çözülür ve daha sonra su ile 100 ml'ye tamamlanır.

 α -Naftol Solusyonu :

α -naftol 5.0 gr
 Etil alkol 100.0 ml

Serum Fizyolojik Solusyonu :

NaCl 8.5 gr
 Damıtık su1000.0 ml

Hazırlanışı : NaCl damıtık suda çözülür ve hacim 1000 ml'ye tamamlanır.