

T.C.
Niğde Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

**KROM VE KURŞUN METALİNİN *BACILLUS THURINGIENSIS*'İN
İNSEKTİSİDAL AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Neslihan ÇİÇEK

Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Yrd.Doç.Dr. Ayten ÖZTÜRK

136718

Ağustos 2003

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Doç. Dr. Minever ARISOY

(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (Ankara Ü. Sağlık Eği. Fak.)

Üye

Yrd. Doç. Dr. Gazi GÖRÜR

(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) (Niğde Ü. Fen-Ede. Fak.)

Üye

Yrd. Doç. Dr. Ayten ŞETÜRK (Niğde Ü. Fen-Ede. Fak.)

(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye

.....

(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye

.....

(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

ONAY:

Bu tez, 15.10.2003 tarihinde, Enstitü Yönetim Kurulu'na belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.


08.10.2003

Doç. Dr. Aydın TOPÇU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

KROM VE KURŞUN METALİNİN *BACILLUS THURINGIENSIS*'İN İNSEKTİSİDAL AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Neslihan ÇİÇEK

Niğde Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç. Dr. Ayten Öztürk

Ağustos 2003, 34 Sayfa

Bu çalışmada, Krom ve kurşun metalinin *Bacillus thuringiensis*'in insektisidal aktivitesi üzerine etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla Niğde izolatu bir suş, krom ve kurşun metalleriyle muamele gördükten sonra büyük mum güvesi *Galleria mellonella L.* larvalarına tatbik edilmiştir. Deneme süresi sonunda larva besinine karıştırılan kurşun ve krom metallerinin % 100 oranında ölüme neden olduğu ve pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında krom ve kurşun ile muamele görmüş *B.thuringiensis* 51H2 suşunun insektisidal aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, biyosorpsiyon, toksik metal giderimi

SUMMARY

MASTER THESIS

INFLUENCES OF LEAD AND CHROMIUM METAL ON INSECTICIDAL ACTIVITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Neslihan ÇİÇEK

University of Niğde

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK

August 2003, 34 pages

In this work, the effects of the chromium and lead metals on the insecticidal activity of the *Bacillus thuringiensis* was investigated. For this reason isolate of Niğde was treated with each of chromium and lead and applied to *Galleria mellonella*. The addition of Cr and Pb to larval nutrient showed 100 % death when they compared to the control. *B. thuringiensis* treated with Cr and Pb showed a decrease in the insecticidal activity.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, biosorption, toxic metal removal

TEŞEKKÜR

Bu tezde bana alıŐma olanağı sağlayan, tezim için gerekli madde ve malzemeleri temin eden ve tez yazım aŐamasında yardımlarını esirgemeyen tez hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Ayten ÖZTÜRK'e, Yrd. Doç. Dr. Gazi GÖRÜR'e, Niđe Üniversitesi Fen Edb. Fak. Biyoloji Bölümü Hocalarıma teşekkür ederim.

Tez alıŐması sırasında maddi, manevi her türlü desteğinden dolayı sevgili eŐim Adem ÇİÇEK'e, annem Nimet BOZOK'a, babam Nihat BOZOK'a teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa no

ÖZET.....	iii
SUMMARY.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
BÖLÜM I.....	1
1. GİRİŞ.....	1
BÖLÜM II.....	2
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	2
2.1. Bakteriyel İnsektisitler.....	2
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> Türünün Özellikleri.....	3
2.2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in sınıflandırılması.....	3
2.2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in toksinleri.....	5
2.2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in parasporal kristal (kristal toksin) endotoksini.....	5
2.2.4. Kristal endotoksinin etki mekanizması.....	6
2.2.5. Kristal endotoksin preparatlarının kullanımı ve güvenliği.....	7
2.3. Büyük Balmumu Güvesi (<i>Galleria mellonella</i> L.) ve Zararları.....	9
2.4. <i>Galleria mellonella</i> ile Mücadele Metotları.....	10

2.4.1. Fiziksel metotlar.....	11
2.4.2. Kimyasal metotlar.....	11
2.4.3. Biyolojik metotlar.....	12
BÖLÜM III.....	14
3. MATERYAL VE METOT.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Bakteriler ve balmumu güvesi.....	14
3.1.2. Araç, gereç ve kimyasal maddeler.....	14
3.2. Metot.....	14
3.2.1. Bakterinin üretimi.....	14
3.2.2. <i>Galleria mellonella</i> 'nın üretimi.....	14
3.2.3. Bakteri preparatlarının hazırlanması.....	15
3.2.4. İnsektisidal aktivitenin saptanması.....	16
BÖLÜM IV.....	17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	17
4.1. Bakterilerin İnsektisidal Aktivitelerinin Saptanması.....	17
5. SONUÇ.....	21
6. KAYNAKLAR.....	22

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa no

Şekil 4.1. Kurşun <i>B. thuringiensis</i> 'in insektisidal aktivitesi üzerine etkisi	18
Şekil 4.2. Krom <i>B. thuringiensis</i> 'in insektisidal aktivitesi üzerine etkisi	19
Şekil 4.3. Deney setleri arasında insektisidal aktivitenin karşılaştırılması	19



ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa no</u>
Çizelge 2.1. İnsektisidal <i>Bacillus</i> türlerinin ayırım anahtarı.....	2
Çizelge 2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in sınıflandırılması.....	4
Çizelge 4.1. İnsektisidal aktivite sayısal sonuçları.....	17



BÖLÜM I

1. GİRİŞ

Zararlılarla mücadelede kullanılan kimyasal ilaçların toprakta birikimi ve besin zinciriyle canlılar üzerinde olumsuz etkileri, alternatif olarak biyolojik mücadele yollarının geliştirilmesine neden olmuştur. Bunlardan bazıları içerisinde yer alan mikrobiyel insektisidler geniş bir kullanıma sahiptir.

Biyolojik mücadelede, virüs, bakteri ve funguslar gibi çeşitli mikroorganizmalar da kullanım olanağına sahip olmuştur. Bunlardan özellikle *Bacillus* cinsine dahil olan *Bacillus thuringiensis* (B.t.) ve *Bacillus sphaericus* suşlarının çeşitli zararlı böcek türlerine karşı sporulasyon evrelerinde ürettikleri protoksin sayesinde önemli derecede insektisidal aktivite gösterdikleri bulunmuş ve ticari preparatlar olarak geliştirilmiştir. Laboratuvar ortamında üretimleri kolay ve ekonomik olan mikrobiyel insektisidlerin kullanıldığı çevrede uzun bir süre etkinliklerini devam ettirmeleri de önemli bir özellikleridir.

Bugüne kadar yapılmış araştırmalarda, biyoinektisidlerin çevresel faktörler tarafından etkinlikleri üzerindeki farklılıklar belirlenmeye çalışılmış (Griego and Spence 1978, Van Essen and Hembree 1982), ancak çevredeki kirleticilerin örneğin insektisid, herbisid ve ağır metallerin biyoinektisidlerin aktivitesini nasıl etkilediği konusu çalışılmamıştır. Bu çalışmayla, bu bilgi boşluğunun giderilmesinde bir adım atılması hedeflenmiştir.

BÖLÜM II

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Bakteriyel İnsektisidler

Böcek patojeni çok sayıda bakterinin bulunmasına rağmen, diğer canlıları etkilemeden güvenle kullanılacak az sayıda bakteri bulunmuştur. Bunların çoğu Bacillaceae familyasına ait endospor üreten bakteriler olup bunlardan sadece beş türün biyoinsektisid olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Bunlar *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus popilliae* ve *Bacillus larvae*'dir. İnsektisidal özellikteki bu *Bacillus* türlerini topraktan izole etmek ve diğer türlerden ayırmak mümkündür (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. İnsektisidal *Bacillus* türlerinin ayırım anahtarı (De Barjac 1981)

A. Bakteriler geniş çubuk şeklindedir (Hücrelerin çapı $> 1.0 \mu\text{m}$)

Şişkinlik oluşturmeyen sporangiyumlar içinde eliptik endosporlar bulunur.

Yuvarlak kare şeklinde veya şekli belirsiz parasporal kristaller bulunur.

Lepidoptera ve Diptera ve bazı Coleptera larvalarına patojendirler.

= *Bacillus thuringiensis*

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

1. Şişkinlik yapan sporangiyumlar içinde eliptik sporlar bulundurur ve basit besiyerlerinde üreyemezler.

Bazı koleopterlere patojendirler.

Çeşitli şekillerde parasporal kristaller oluştururlar.

= *Bacillus popilliae*

Parasporal kristaller bulunmaz.

= *Bacillus lentimorbus*

Parasporal kristaller bulunmaz. Balarısı larvalarına patojendir.

= *Bacillus larvae*

2. Şişkinlik yapan sporangiyumlar içinde yuvarlak endosporlar bulunur. pH'sı 6 olan basit besiyerlerinde gelişirler.

Bazı suşları sivrisinek larvalarına patojendir.

= *Bacillus sphaericus*

Birinci grubu şişkinlik oluşturmeyan eliptik endospor içeren sporangiyumları bulunan bakteriler (*Bacillus thuringiensis*) oluştururken, ikinci grubu şişkinlik oluşturmuş oval veya eliptik endosporları içeren sporangiyumları bulunan bakteriler (*B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae* ve *B. larvae*) ve üçüncü grubu ise şişkinlik oluşturan yuvarlak spora sahip sporangiyum oluşturan bakteriler oluşturmaktadır.

2.2. *Bacillus thuringiensis* Türünün Özellikleri

B.thuringiensis Gram pozitif özellikte, endospor oluşturan, fakültatif anaerob gelişme özelliğine sahip, toprak kökenli bir bakteridir. İlk defa 1901 yılında Ishiwata tarafından ölü ipekböceği larvasından izole edilmiştir (Lacey and Undeen 1986).

Bu bakteriler tarafından üretilen protein yapıdaki parasporal kristallerin insektisidal aktivitelerini, böcek larvalarının alkali pH'ya sahip barsak sistemlerinde kazandığı ve bu protein yapının alkali pH'da bir kaç oligopeptide ayrılarak çeşitli barsak proteazları tarafından insektisidal aktivite gösteren toksine dönüştürüldüğü bulunmuştur (Lacey and Undeen 1986, Porter et al 1993).

2.2.1. *B.thuringiensis*'in sınıflandırılması

Şimdiye kadar izole edilen *B.thuringiensis* izolatlarının sınıflandırılmasında biyokimyasal ve serolojik kriterler göz önünde bulundurulmuştur. Bundan başka *B.thuringiensis*'in sınıflandırılması için başka yaklaşımlar da kullanılmış, vejetatif hücrelerinin esteraz tiplerine göre flagella (H) ve kristal antijenlerine uygun olarak sınıflandırılmaya çalışılmıştır. Çoğu kez H serotipi kristal antijen tipiyle karakterize edilmiştir. Ayrıca spesifik bir H antijenine (flagella antijenine) sahip olduğu belirlenen *B.thuringiensis* serotiplerinin, spesifik biyokimyasal reaksiyonlar verdiği ve etkili oldukları böcek türlerinin tipik olduğu ifade edilmiştir (De Barjac 1981). Bu sınıflandırmaya haraketsiz bir alttür de *B.t.wuhanensis* olarak dahil edilmiştir (Çizelge 2.2). Bütün alt türlerin toksisiteleri nitelik ve nicelik açısından suşlara göre farklılık göstermektedir (De Barjac 1990).

Çizelge 2.2. *Bacillus thuringiensis*'in sınıflandırılması (De Barjac and Frachon, 1990)

H antijen	Serovaryete	Kısaltma	İlk kaynak
1	thuringiensis	THU	Berliner, 1915; Heimpel&Angus, 1958
2	finitimus	FIN	Heimpel&Angus, 1958
3a	alesti	ALE	Toumanoff & Vago, 1915; Heimpel&Angus, 1958
3a3b	kurstaki	KUR	De Barjac&Lemille, 1970
4a4b	sotto	SOT	Ishiwata 1905; Heimpel&Angus, 1958
4a4c	kenyae	KEN	Bonnefoi&De Barjac , 1963;
5a5b	galleriae	GAL	Shevetsova, 1959; De Barjac&Bonnefoi, 1962
5a5c	canadensis	CAN	De Barjac&Bonnefoi, 1972
6	entomocidus	ENT	Heimpel&Angus, 1958
7	aizawai	AIZ	De Barjac&Bonnefoi, 1963
8a8b	morrisoni	MOR	De Barjac&Bonnefoi, 1963
8a8c	ostrinae	OST	Gaixin, Ketian, Minghua and Wingmin 1975
8b8d	nigeriensis	NIG	De Barjac, Frachon, Rajagopalan & Cosmao, yayımlanmadı
9	tolworthi	TOL	Norris, 1964; De Barjac&Bonnefoi, 1968
10	darmstadiensis	DAR	Krieg, De Barjac&Bonnefoi, 1968
11a11b	toumanoffoi	TOU	Krieg, 1969
11a11c	kyushuensis	KYU	Ohba&Aizawai, 1979
12	thompsoni	THO	De Barjac & Thomson, 1970
13	pakistani	PAK	De Barjac, Cosmao Shaik& Viviane, 1977
14	israelensis	ISR	De Barjac, 1978
15	dakota	DAK	De Lucca, Simonson&Larson, 1979
16	indiana	IND	De Lucca, Simonson&Larson, 1979
17	tohokuensis	TOH	Ohba, Aizawai&Shiizu, 1981
18	kumamotoensis	KUM	Ohba, Ono, Aizawai&Ivanomi, 1981
19	tochigiensis	TOC	Ohba, Ono, Aizawai&Ivanomi, 1981
20a20b	yunnanensis	YUN	Wan-yu, Qi-fang, Xue-ping & You-wei, 1979
20a20c	pondicheriensis	PON	DeBarjac, Frachon, Rajagopalan&Cosmao, yayımlanmadı
21	colmeri	COL	De Lucca, Palmgren&De Barjac, 1984
22	shandongiensis	SHA	Ying, Jie&Xichang, 1986
23	japonensis	JAP	Ohba&Aizawai, 1986
24	neoleonensis	NEO	Rodriguez-Padilla, Galan-Wong, De Barjac, Dulmage, Tamez-Guerra & Roman Calderon, 1988
25	coreanensis	COR	De Barjac & Lee, yayımlanmadı
26	silo	SIL	De Barjac&Lecadet, yayımlanmadı
27	mexicanensis	MEX	Rodriguez-Padilla, Galan-Wong, 1988

2.2.2. *Bacillus thuringiensis*'in toksinleri

B.thuringiensis'e ait suşların 100'den fazla Lepidoptera üyesi böcek larvasına, Diptera ve Koleoptera üyelerinin çeşitli türlerine karşı patojenik etki gösterdiği belirlenmiştir. *B.thuringiensis* suşlarının alfa ekzotoksin, beta ekzotoksin ve delta endotoksin olmak üzere temelde üç tip toksini sentezlediği ve toksin tiplerinin her birinin biyokimyasal yapısının ve aktivitesinin suştan suşa değişebildiği bulunmuştur. Bununla birlikte şimdiye kadar izole edilen *B.thuringiensis* alttürlerine ait suşların her birinin, farklı böcek türlerine patojen olabildiği de gösterilmiştir (Whiteley and Schnepf 1986). *B.thuringiensis* serotiplerinin toksin bileşimlerinin farklı böcek türlerinde farklı şekilde reaksiyonlar verdiği ve bu durumun böceğin barsak kimyası ile de ilgili olduğu belirlenmiştir. Buna karşın böcek türlerine etki mekanizmalarının benzer olduğu bulunmuştur (Fast 1981).

2.2.3. *Bacillus thuringiensis*'in parasporal kristal endotoksini

Toksinin bipiramidal kristal (kristal toksin) yapısının *B.thuringiensis*'in bütün alt türleri için tipik bir özellik olmadığı yapılan çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur. Lepidoptera larvalarına patojen suşların bipiramidal tipte (Ohba et al 1981a), Diptera larvalarına patojen suşların yuvarlak ve oval tipte (Orduz et al 1992), Koleoptera larvalarına patojen suşların ise rhomboidal (karşılıklı kenar ve açıları eşit, dik açısı bulunmayan paralel kenar) tipte, kristal oluşturduğu belirlenmiş, ancak bu şekilde bir ayırımın da tam olarak yapılamayacağı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Padua et al 1980, Çetinkaya vd 1995a). Diptera larvalarına patojen bulunan *B.t.tohokuensis* kristallerinin rhomboidal (Ohba et al 1981b), lepidopterlere toksik *B.t.japonensis* (serotip 23)'in (Ohba and Aizawai 1986), *B.t.sumiyoshiensis* ve *B.t.fukuokaensis*'in (Ohba and Aizawai 1989), yuvarlak tipte kristal oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca insektisidal aktivite gösteremediği belirlenen *B.t.neoleonensis*'in üçköşeli (triangular) kristal yapıya sahip bir protein ürettiği de tespit edilmiştir (Rodriguez-Padilla et al 1990).

Sivrisinek larvalarına toksik *B.t.israelensis* ve *B.t.morrisoni* PG 14 suşlarının sporulasyon evresinde üç büyük kristal protein ürettiği ve bu kristal proteinlerin, 134, 128, 70, 58 ve 27 kDa'luk ağırlığa sahip, en az beş adet polipeptitten oluştuğu belirlenmiştir. Bu alt üniteler disülfid ve hidrofobik bağlarla bir arada tutulmaktadır. Antijenik özellikleri ve büyüklükleri bakımından *B.sphaericus* toksininden farklı olduğu anlaşılmıştır. 27 kDa'luk

Polipeptidin hemolitik aktiviteye sahip olmasına karşın önemli bir insektisidal aktivite gösteremediği, buna karşın hemolitik olmayan 134, 128 ve 70 kDa'luk polipeptidlerin *Aedes* cinsine ait bütün sivrisinek larvalarına toksik olduğu gösterilmiştir (Porter et al 1993, Federici et al 1990).

B.t.israelensis üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda toksin yapısının % 1.0 oranında nötr şeker içerdiği ve tam bir aktivite gösterebilmesi için N-asetil glukozamin oligosakkaritini içermesi gerektiği ve % 1.7 oranında amino şekerleri içeren bir glikoprotein yapısında olduğu bulunmuştur (Crickmore et al 1990, Federici et al 1990, Porter et al 1993). Çeşitli serotiplere ait kristal toksik proteinlerin amino asit içeriklerinin farklı olduğu, metiyonin oranının düşük, asparajin, glutamik asit, glisin ve lösin oranının fazla olduğu saptanmıştır (Çakmakçı vd 1985).

B.t.israelensis kristal toksik polipeptidlerin hiç birinin tam bir toksin proteini gibi insektisidal aktivite gösteremediği bulunmuştur. Bu durum kristal polipeptidleri arasında bir sinerjizm olduğunu düşündürmüştür. 27 kDa'luk polipeptid ile ya 70 kDa'luk polipeptid arasında ya da 128 ve 134 kDa'lık polipeptidlerin karışımları arasında bir sinerjizm olduğu gösterilmiştir (Crickmore et al 1990, Federici et al 1990, Porter et al 1993). Toksik kristal proteinin, sporulasyonun başladığı ilk üç saat içerisinde sentez edilmeye başlandığı ve beş saat süresince devam ettiği belirlenmiştir (Porter et al 1993).

2.2.4. Kristal endotoksinin etki mekanizması

Insektisidal *B.thuringiensis* toksinlerinin bağlanma bölgelerinin böcek barsağındaki mikrovillus hücre membranları üzerinde olduğu araştırmacılarca ortaya konmuş ve toksik polipeptidlerin böcek duyarlılığı ile ilişkisi incelenmiştir (Schnepf et al 1990, Garczynski et al 1991). Etki mekanizmasının aydınlatılmasıyla ilgili bu tip araştırmalar böceğin barsak mikrovillus hücre zarı ve bunların doku kültürü hazırlanarak yapılmıştır.

Bu çalışmalar sonucunda hangi faktörlerin, *B.thuringiensis*'in kristal toksinlerinin insektisidal özelliğini ve böcek spesifikliğini tayin ettiği bulunmuştur. Toksinlerin konak genişliği üzerinde üç belirgin faktörün etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır:

I. Toksik proteinin çözünürlüğünü etkileyen larva barsaklarındaki farklılıklar ortaya konmuştur. Farklı böcek gruplarında barsak proteaz spektrumunun da, pH'nın da farklı olabildiği ve toksisitedeki potansiyeli ve spesifikliğı etkilediği belirlenmiştir.

II. İşlem görmüş protoksinin etkinliği belirlenmiştir: Toksisitenin toksik proteinin çözünürlüğüne bağlı olmakla birlikte tek bir faktör olmadığı, toksik proteinin

çözünmesinden sonra da böcek spesifikliğinde önemli ölçüde farklılıkların olabileceği ortaya konmuştur.

III. Toksine olan duyarlılık için gerekli olan barsak duvarındaki reseptörlerin mevcudiyeti ve ifadesi (ekspresyonu) de insektisidal aktiviteyi etkilemektedir. Lepidoptera üyesi böceklerin Cry I toksin tipine olan dirençliliğine, toksin proteinin reseptörlere olan affinitesinin azlığı ya da yüksek affinite bölgesinin tümüyle olmayışı neden olarak gösterilmiştir (Porter et al 1993).

Toksistide ilk adım, muhtemelen fosfolipid olan ve doymamış yağ asitlerini içeren reseptör bölgelerine toksin proteinin bağlanmasıdır. Buna karşın bağlanma bölgelerinin yapısı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak toksin spesifikliğınden toksinin şeker kısmının sorumlu olabileceği belirtilmiştir. Toksinin reseptörlere bağlanması, barsak hücrelerinin plazma membranında küçük porların oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum porlardan kesintisiz olarak iyon ve su akışıyla hücrelerin şişmesine neden olup, ozmotik lizise yol açmakta ve paraliz sonucu larvanın ölmesine neden olmaktadır (Lacey and Undeen 1986, Federici et al 1990, Chilcott et al 1990). Travers ve arkadaşları (1976) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bombyx mori* (ipek böceğı)'nin barsak epitelinden izole edilen mitokondride, toksik polipeptidlerin ATP üretimini engellediğı ve oksidatif fosforilasyonun engelleyici (uncoupler) ajanı olarak rol aldıkları saptanmıştır.

2.2.5. Kristal endotoksin preparatlarının kullanımı ve güvenliğı

B.thuringiensis'in hayvan ve insan sağılığı açısından güvenirliliğinin test edildiğı çalışmalarda hedefin dışındaki canlılara toksik olmadığı belirlenmiştir. Fare, sıçan, tavşan ve kobay üzerinde, *B.t.thuringiensis*, *B.t.kurstaki* ve *B.t.israelensis* preparasyonlarının oral, deri, derialtı, intraperitoneal, damariçi, göziçi ve teneffüs yoluyla yapılan uygulamaları sonucunda, 10^7 - 10^8 bakteri/hayvan düzeyindeki preparasyonların akut veya kronik toksisteye ya da enfeksiyona neden olmadığı, sadece 10^6 canlı bakteri/fare düzeyinde, fare beynine yapılan bir enjeksiyonun ölüme neden olduğu bulunmuştur. Yapılan diğler çalışmalarda, bu bakterinin kristal toksinlerine maruz kalan balık, kurbağa gibi diğler vertebratların, sivrisinek predatörü olan artropodların (eklembacaklıların), yumuşakçalar ve diğler su canlılarının olumsuz yönde etkilenmediğı ortaya çıkarılmıştır (Krieg and Miltenburger 1984, Lacey 1985, Lacey and Undeen 1986).

Zararlılarla mücadelede sulu konsantrelerinin laboratuvar ve saha koşullarında başarılı bir şekilde kullanıldığı *B.thuringiensis*'in preparatları, sıvı ya da toz halde

hazırlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda sıvı preparatların hazırlanmasındaki kolaylığa karşın, toz preparatların raf ömrünün daha uzun olduğu tespit edilmiştir (Krieg and Miltenburger 1984, Porter et al 1993). Her iki formülasyon tipinin kullanıldığı yerler birbirinden farklıdır. Toz preparatların kulanıldıkları alanlarda yerleşik olma özelliklerinin (adaptasyonlarının) ve devamlılıklarını koruma oranlarının daha düşük olduğu bulunmuştur. Senkronize olmayan sivrisinek türlerinin larvaları genellikle uygulamanın yapıldığı 3. ya da 4. gün içerisinde yeniden görülmektedir. Preparatlarda yer alan kristal endotoksinler uygulamayı takiben zararlılara olan etkisini 6 dakika ile 24 saatlik bir sürede uygulama dozuna bağlı olarak etkisini gösterirken (Lahkim-Tsrör et al 1983, Çetinkaya et al 1995b), spor formundaki *B.thuringiensis* etkisini daha sonra ve daha uzun süreli olarak gösterebilmektedir. Dolayısıyla preparatlardaki spor formlarının, uygulamadan sonra da o bölgelerde devamlılıklarını korumaları bu açıdan son derece önemlidir (Porter et al 1993, Çetinkaya et al 1995b).

B.thuringiensis preparatlarının saha etkinliğinin tespitiyle ilgili çalışmalarda, *B.thuringiensis* suşlarının doğada kalım süresini etkileyen faktörler de araştırılmıştır. Böyle bir araştırmada tuzun (NaCl) ve kısa süreli güneşiğine maruz kalmanın *B.thuringiensis* (H14)'ün aktivitesini etkilemediği belirlenmiştir. Bununla beraber UV radyasyonuna maruz bırakılan *B.thuringiensis* sporlarının ölmesine karşın, kristal toksinlerinin halen aktif olduğu da gösterilmiştir (Lacey 1985).

B.thuringiensis spor ve kristallerinin uygulamadan sonra ne kadar süreyle o bölgede varlığını koruduğu, etkinliği yüksek formülasyonların oluşturulması açısından oldukça önemlidir. Bu konuyla ilgili olarak toprak, su ve diğer habitatlarda kalım süresinin belirlenmesiyle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. *B.thuringiensis*'nin topraktaki kalım süresinin immünofloresan yöntemiyle belirlenmesinin hedeflendiği bir çalışmada, canlı vejetatif hücrelerinin topraktan çok hızlı bir şekilde (ilk 24 saatte % 91'inin) yok olduğu, buna karşın sporların daha uzun süre (25°C'de 91 gün) değişmeden kaldığı belirlenmiştir. Fakat bu süre zarfında bakteri sporlarında herhangi bir şekilde germinasyonun olduğu gözlenmemiştir (West et al 1984).

Ticari olarak üretilen preparatların etkinliği genellikle böcek larvaları üzerinde gerçekleştirilen laboratuvar denemeleri ile ortaya konmaktadır. Ancak biyoinsektisitlerin laboratuvar ve saha denemelerinde etkinliği habitat ve larval faktörlerin dahil olduğu çeşitli faktörler tarafından da etkilenmektedir. Bunlar içerisinde, kullanılan preparat tipi, larva gelişmesinin görüldüğü çeşitli habitatlardaki kirlenme, suyun derinliği, bulanıklığı ve iyonik bileşimi, sıcaklık, mikrofloranın etkisi, larval gıda kaynaklarının bulunması, bitki

örtüsü, larva yaşı, larva yoğunluğu ve larvaların beslenme davranışı gibi parametreler aktiviteyi etkileyen bazı faktörler olarak görülmektedir (Klowden et al 1983, Lacey 1985, Sutherland and Khoo 1987).

Yüzen preparatların, *Anopheles* larvaları gibi suyun yüzeyinden beslenen sivrisinek larvalarına etkili olabilmesi umuduyla geliştirilmesi istenmektedir. Buna karşın yavaş salınan özellikte ve asılı duran preparatların ultraviyole radyasyonu karşısında etkinliğinin azaldığı ve spor sayısının da düştüğü gözönüne alınacak olursa, UV ışığına dirençli ve diğer çevresel faktörlere dayanıklı *B.thuringiensis* suşlarının geliştirilmesi gerektiği açıktır (Porter et al 1993).

2.3. Büyük Balmumu Güvesi (*Galleria mellonella* L.) ve Zararları

Büyük balmumu güvesi, mum güvesi türlerinin en önemlisidir. Bu zararlının uygun koşullar altında larva gelişim süreci, ortalama 40 gün olup, bu sürenin uzaması veya kısılması (33-50 gün), bulunduğu koşullara göre değişim göstermektedir (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

Yumurtalar pembe, krem ve beyazımtırak renkte, kurvozoid (beyzi) bir yapıda, 0,45 mm uzunluğunda ve 0,4 mm çapındadır. Embriyonal gelişim, optimum koşullarda 4,5 gün olduğu halde, bu süre uzayabilmektedir. Yumurtaların açılma süresi, 25°C'de 5-9 gün arasında değişim gösterdiği halde, yaşlı dişi yumurtalarında 8-17 gün olabilir. Yumurtadan yeni çıkan larva, krem renginde ve oldukça hareketlidir. Larvanın gelişmesi için en uygun sıcaklık 30-32°C'dir. Larvalar, 7 evre geçirerek gelişmelerini tamamlar. Tam gelişmiş larvanın boyu, 22-28 mm arasında değişmektedir. Larvalar son dönemde beslenmeden kesilirler. Genellikle olgun larvalar optimum koşullarda son larval dönemin başlangıcından itibaren 5. veya 6. günde ipeğimsi yapıda kozalarını örmeye başlar. Kozalar tamamlandıktan 2 gün sonra prepupa ve daha sonra da pupa haline geçerler. Pupa dönemi, 8-62 gün kadar devam etmektedir. Yeni çıkan erginler, açık kahverengi-gri renktedir. Dişiler, erkek kelebeklerden daha büyüktür. Erginler, iklim koşullarına bağlı olarak, 2-5 hafta arasında değişen ömür uzunluğuna sahiptir. Pupadan çıkan erginlerin bir süre sonra kanatları gelişir. Akşam karanlığı başladığı zaman kelebekler, ağaç veya çalılıklara uçar ve orada çiftleşirler. Çiftleşmeyi tamamlayan dişiler, sabahın erken saatlerinde arıların koloniyi terk etmelerinden hemen sonra, kovana girmeye çalışırlar. Bir dişi yaşadığı süre içinde yaklaşık 300 yumurta bırakabilmektedir; 1600 adet yumurta bırakan dişilere de rastlanmıştır (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

2.4.1. Fiziksel metotlar

Fiziksel metot olarak iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar, sıcaklığı artırma veya düşük sıcaklıkta tutma uygulamasıdır. Her iki mücadele metodu da, bal arılarının yer almadığı depo koşullarında uygulanmaktadır.

Soğutma, en uygun ve en ucuz metottur. Soğutma işleminde, -12 °C'de 3 saat veya -15°C'de 2 saat tutulan balmumu güvesinin bütün dönemleri ölmektedir (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

Yüksek sıcaklık uygulaması 49°C'de 40 dakika da balmumu içine gizlenmemiş halde bulunan olgun yaştaki güveleri öldürmek için yeterli görülmektedir. Bu yöntem, boş petekler, kovanlar veya yapı malzemelerinin zararlıdan temizlenmesinde kullanılmaktadır. Ancak, peteklerde bal varsa, 49°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda balmumunun yumuşayıp akması ve petek gözlerinin bozulması söz konusu olacağından, bu sıcaklıklarda ballı petekleri uzun süre tutmak doğru değildir (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

Ayrıca yurt dışında gamma radyasyonu kullanılan ülkelerde vardır. Kobalt 60 ile yapılan uygulama sonunda, güve larvalarının tüm evrelerinin öldürülmektedir. Uygulama sonunda balın kalitesinde olumsuz bir etki görülmediği bildirilmiştir (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

Büyük balmumu güvesi erginleri, bal arısı kovanlarına girerek onlarla aynı kovana paylaşmakta ve zamanla kovana hakim olmaktadır; ancak sağlıklı ve güçlü bal arısı kolonileri, genellikle bu saldırıya karşı kendilerini koruyabilmektedirler (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

2.4.2. Kimyasal metotlar

Bazı kimyasal ilaçlar, boş kovanlara, balı süzölmüş ve depolanmış çerçevelere uygulanmaktadır.

Ülkemizde *G.mellonella*'ya karşı, yasaklanmış olmasına rağmen halen yaygın olarak Naftalin (Paradichlorobenzen) kullanılmaktadır. Fumigasyon için ABD ve Avrupa ülkelerinde Etilen dibromit (EDB), Kükürt dioksit (SO₂) (Ritter et al.1992, Charriere and imdorf 1999), Etilen oksit (C₂H₄O), Karbon dioksit (CO₂), Alüminyum fosfür (AIP) (Lee and Choi 1991), Kalsiyum fosfit (CaP) (Sattigi) et al. 1993), Kalsiyum siyanit (CaCN), Metil bromid (CH₃Br) (Morse 1980) gibi fumigant ilaçlar önerilmekte ise de ülkemizde bu fumigantlar ruhsatsız olduğu için üretici düzeyinde ender olarak kullanılmaktadır.

Fumigasyon yapılırken ortaya çıkan zehirli gazlardan korunmak için gaz sızdırmaz bir ortam hazırlanmalıdır (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

Ülkemizde öneri dışı kullanılan naftalin uygulaması sonunda balda ve balmumunda bakiye kalmakta ve bal dış satımı zaman zaman durma noktasına gelmektedir. Ayrıca ilkbaharda naftalinle kabartılmış boş petekler üzerinde arılar istekle çalışmamakta, hatta kovan terkleri görülmektedir (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

2.4.3. Biyolojik metotlar

G. mellonella'ya karşı biyolojik kontrol metotları oldukça fazladır. Bunlar arasında bakteriler, funguslar, predatör (avcı böcek)'ler sayılabilir.

a) *Galleria mellonella*'ya karşı bakterilerin kullanılması

Bakteriler arasında *Bacillus thuringiensis*'in ayrı bir önemi vardır. *B. thuringiensis*'in balmumu güvesi mücadelesinde önemli potansiyele sahip olduğu, 19602lı yıllarda çeşitli ülkelerde, ortaya konmuştur (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

Ticari olarak üretilen toz formüller ve stabilize edilmiş süspansiyonların her biri, bakteri sporları ve zehirli (toksik) proteinleri içermektedir. Genç lepidoptera larvaları, çok az miktarda bile olsa bu materyali sindirim sistemlerine aldıklarında kristal, zehir etkisi yapmaktadır. Hem bakteri sporu hem de kristalin, insanlara ve bal arılarına olumsuz bir etkisi bulunmamaktadır (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

Peteklere *B. thuringiensis* preparatlarının uygulanmasının, fabrikada petek baskısı sırasında yağlama yapılır gibi seyreltilmiş süspansiyonlar kullanılarak gerçekleştirilmesinin mümkün olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca, spor ve kristal ağırlığının uygulamada 1/100 oranını geçmemesi gerektiği belirtilmiştir (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

Büyük balmumu güvesi larvaları, genç larva dönemlerinde *B. thuringiensis* spor ve kristal karışımına çok hassastır. Örneğin, Boşgelmez ve arkadaşları (1983) tarafından yapılan bir çalışmada, büyük mum güvesi üzerinde laboratuvar koşullarında *B.thuringiensis*'ten hazırlanan toz preparatların etkileri araştırılmıştır. Büyük mum güvesi larvalarına karşı uygulanan preparat dozları sırasıyla 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3 gr şeklinde olmuştur. 1.5-3 gr'lık tüm dozlarda etki elde edilmiş, genç larva evrelerinin ise 0.5 - 1.0 gr'lık dozlara duyarlı oldukları belirlenmiştir (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

B. thuringiensis preparatlarının uygulamasının çeşitli faktörlere bağlı olduğu bilinmektedir. Örneğin, suni besi yerlerine *B. Thuringiensis* preparatlarının karıştırılması ile elde edilen diyetlerde, *G. mellonella* larvalarının yetiştirilmesi sonucu ölüm oranı, konsantrasyona, preparatın kristal içeriğine ve larva yaşına bağlı olarak değişmektedir (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

Cantwell and Shieh (1981), *B. thuringiensis*'in Certan ticari adı ile hazırlanmış bir preparatının, depolanmış petek materyali üzerinde zarar yapan balmumu güvesine karşı mücadelede başarılı olduğunu kaydetmiştir. Ayrıca, bu preparatın arılı kovanlarda işçi arıları ve koloni yaşamını engellemediği, balın özelliğinde bir değişme yapmadığı ve insanlara zararı bulunmadığını belirtmiştir (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

Çakmakçı ve arkadaşları tarafından özel olarak geliştirilen Tarmik-A isimli mikrobiyal preparat da, 40×10^6 gr spor yoğunluğunda hazırlanarak eritilmiş balmumuna toz halinde karıştırılmış ve özel temel petekler elde edilmiştir. Bunların kovanlara verilmesi ile yapılan mücadelede, balmumu güvesinin yaşlı larvalarına karşı %71 oranında başarı sağlanmıştır (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

b) Virüsler

Büyük balmumu güvesi larvalarına etkili virüslerin kullanımı sınırlı olması, etkilerinin sınırlı olması, üretiminin de çok pahalı olması nedeniyle mücadelede virüslerin kullanılması ekonomik değildir (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

c) Funguslar

G. mellonella yumurtalarının *Aspergillus flavus* sporları ile enfekte edildiğinde, yumurtaların üzeri miselyum örtüsü ile kaplanır. Ayrıca, konidiumların sadece sağlıklı yumurtalarda değil, zarar görmüş larvalarda da etkili olmaktadır (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

c) Nematodlar

Agamermis spp. (Strongylida:Mermitoidae) gibi bazı nematod türleri böceklerde asalak olarak yaşamakta, bir kısmı ise konukçusunu bir süre sonra öldürmektedir (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

Son yıllarda, konukçusunu öldüren entomopatojenik nematodların biyolojik mücadelede kullanılması yönündeki araştırmalara yoğun olarak devam edilmektedir (Tutkun ve Boşgelmez 2003).

BÖLÜM III

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteriler ve balmumu güvesi

Bu çalışmada kullanılan *Bacillus thuringiensis* 51H2 suşu Niğde civarından izole edilmiştir (Çoban 2000).

Denemelerde kullanılacak büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella* L.) Ankara Köy Hizmetleri Müdürlüğü Ziraî Mücadele ve Araştırma laboratuvarından alınmıştır.

3.1.2. Araç, gereç ve kimyasal maddeler

Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında bulunan araç, gereç ve kimyasal maddeler kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Bakterinin üretimi

Bakterinin aktifleştirilmesinde, üretiminde ve saklanmasında nutrient sıvı besiyeri ve nutrient agar katı besiyerleri kullanılmıştır.

3.2.2. *Galleria mellonella*'nın üretimi

Galleria mellonella'nın üretimi için 70x110 cm ebatlarında beş tarafı cam ile kapatılmış kabin kullanılmıştır. Kabin için %50-70 arasında nispi nem ve 25-30 °C sıcaklığa sahip bir ortam olarak hazırlanmıştır. Büyük mum güvesinin larva besini (Halıcı 2001) olarak aşağıdaki bileşim hazırlanmıştır.

Süttozu dışında diğer besiyeri bileşimleri otoklavda sterilize edilmiş ve daha sonra aseptik koşullarda karıştırılmıştır. Larva üretimi için gerekli kavanozlar ve larvanın yumurtalarını bırakması için gerekli filtre kağıtları da sterilize edilmiştir.

Büyük mum güvesinin besiyeri bileşimi:

Un	890 g
Kuru maya	222 g
Bal	500 g
Gliserin	500 g
Süttozu	445 g
Buğday kepeği	445 g

Bu karışım içerisine büyük mum güvesi yumurtaları gelişebilmeleri için bırakılmıştır.

3.2.3. Bakteri preparatlarının hazırlanması

% 1.0 g kurşun olacak şekilde kurşun nitrat ($Pb(NO_3)_2$) ve potasyum kromat ($K_2Cr_2O_7$) çözeltisi distile su içerisinde hazırlanmış ve otoklavda sterilize edilmiştir. Bakteri preparatlarının bu metal çözeltiler ile muamelesi 20 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilerek gerçekleştirilmiştir.

Aranmış'ın (2002) kullandığı yöntem değiştirilerek bakteri preparatları hazırlanmış ve larvalara tatbik edilmiştir. Bu amaçla, bakteri nutrient agar besiyeri içeren petri kutuları içerisine yayılarak inoküle edilmiş $35^\circ C$ de bir gece inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrasında oda sıcaklığında 15 gün bekletilerek bakterilerin spor oluşturması sağlanmıştır. Daha sonra basit boyama yapılarak spor oluşturup oluşturmadığı kontrol edilmiştir. Spor oluşturduğu saptanan petri kutularındaki bakteriler insektisidal aktivite denemelerinde kullanılmıştır. Bunun için bakteriler, distile su yardımıyla petri kutularından toplanmış ve eppendorf tüplere konularak 5 dakika süreyle 13 000 rpm'de santifriji edilmiştir. Her bir petri kutusu için yaş ağırlığı 0.2 g olacak şekilde bakteri elde edildikten sonra iki defa distile su ile yıkanmıştır.

Metalle muamele etmek için ayrılan bakteri çökelekleri 1.0 ml % 1.0'lik metal içeren çözeltide $25^\circ C$ 'de 20 saat süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda santifriji edilip, bakteri çökeleği içindeki metali uzaklaştırmak üzere iki defa distile su ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çökelek 1.0 ml distile su içinde çözülmüştür.

Metallerle muamele edilmiş ve edilmemiş çözünmüş bakteri solusyonları 1.0 g yemle (un+kepek) karıştırılarak petri kutuları içerisine yayılmış ve bir gece bekletilerek kurutulmuştur. Petri kutularındaki kuru karışım ezilip, öğütülmüş ve 1.0 g bal ile karıştırılarak larvalara yedirilecek hale getirilmiştir.

3.2.4. İnkstisidal aktivitenin saptanması

Bölüm 3.2.2' de hazırlanışları anlatılan preparatların bulunduğu her bir petri kutusu içerisine 3. ve 4. evrede bulunan 10 adet larva bırakılmıştır. Bu deneme hem metal içermeyen hem de metal ile muamele edilmiş preparatlarla yapılmıştır. Ölü larva sayımları birinci günden başlayarak 33 gün içerisinde gerçekleştirilmiştir.



BÖLÜM IV

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bakterilerin İnsektisidal Aktivitelerinin Saptanması

Denemelerde kullanılan bakterinin 1. günden itibaren insektisidal aktivitesi değerlendirilmeye başlanmıştır (şekil.4.1, şekil 4.2., şekil 4.3). Aktivite ölü larvaların sayısıyla belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Denemeler beş paralel olarak yürütüldüğünden bu beş paralel setten alınan sonuçlar toplanmış ve toplam ölü larva sayısı olarak verilmiştir.

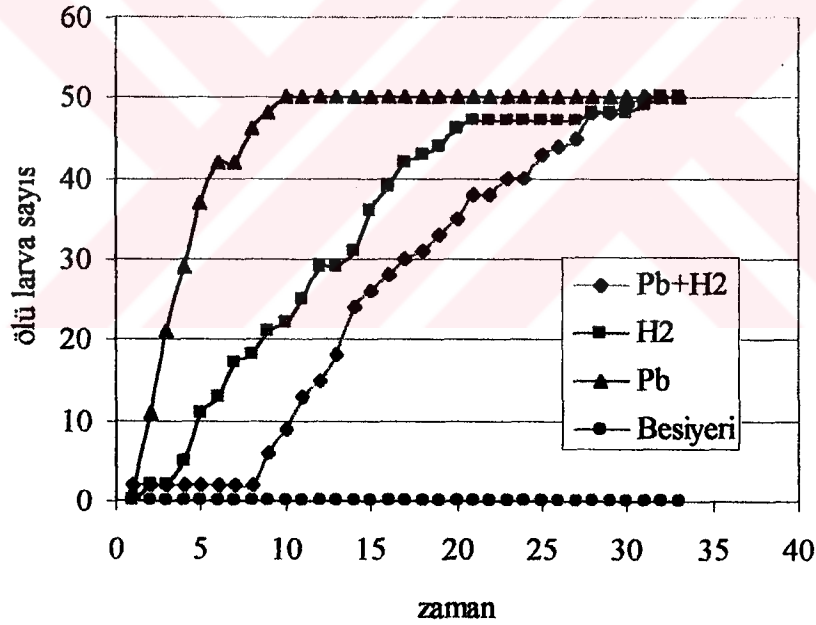
Çizelge 4.1. İnsektisidal aktivite sayısal sonuçları

GÜN	Ö L Ü L A R V A				S A Y I S I	
	Besiyeri	Bakteri	Krom	Kurşun	Kurşun+bakteri	Krom+Bakteri
1	0	0	0	1	2	0
2	0	2	7	11	2	0
3	0	2	16	21	2	0
4	0	5	29	29	2	2
5	0	11	36	37	2	3
6	0	13	41	42	2	5
7	0	17	45	42	2	6
8	0	18	47	46	2	7
9	0	21	47	48	6	13
10	0	22	48	50	9	16
11	0	25	48	50	13	17
12	0	29	48	50	15	17
13	0	29	48	50	18	18
14	0	31	49	50	24	21
15	0	36	50	50	26	22
16	0	39	50	50	28	24
17	0	42	50	50	30	28
18	0	43	50	50	31	31
19	0	44	50	50	33	33
20	0	46	50	50	35	34
21	0	47	50	50	38	35
22	0	47	50	50	38	38
23	0	47	50	50	40	38
24	0	47	50	50	40	42
25	0	47	50	50	43	44
26	0	47	50	50	44	44
27	0	47	50	50	45	44
28	0	48	50	50	48	46
29	0	48	50	50	48	46
30	0	48	50	50	49	46
31	0	49	50	50	50	46
32	0	50	50	50	50	47
33	0	50	50	50	50	50

İnsektisidal aktivite deneylerinde 0.2 g bakteri, 2.0 g yem ile karıştırılarak tatbik edilmiştir. Bu oranın elde edilebilmesi için *Galleria mellonella*'ya karşı etkinliği % 100 olarak tespit edilen ve Niğde izolatu olan *B. thuringiensis* 51H2 şuşunun 0.05, 0.1 ve 0.2 g miktarları kullanılmıştır.

Sonuçlara bakıldığında, ağır metallerin toksik olmasından dolayı krom ve kurşun metalinin daha çabuk larva ölümlerine neden olduğu görülmektedir.

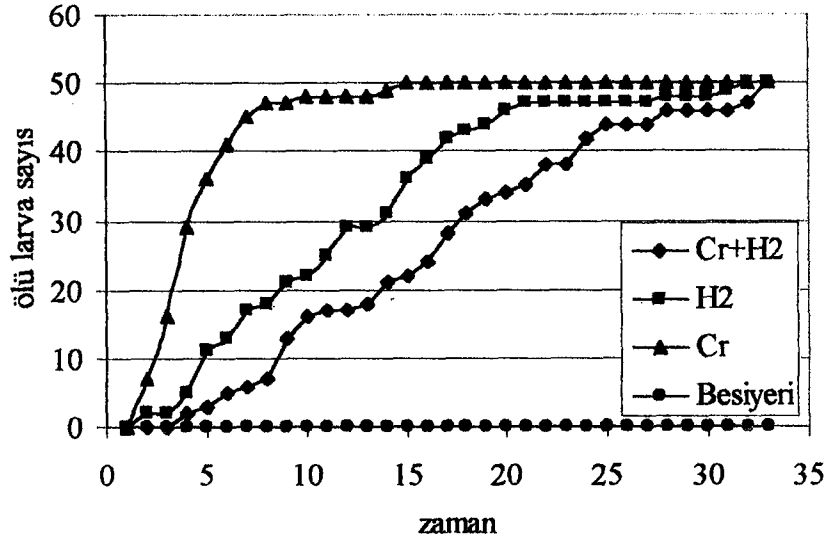
Bununla birlikte kurşun ve krom metali ile muamele görmüş bakterinin insektisidal aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Daha önce yapılmış bir çalışmada kurşun metali ile muamele gören çok sayıda bakterinin insektisidal aktivitesinin ilk yedi günde düştüğü, 14. güne doğru ise arttığı tespit edilmiştir (Aranmış 2002). Bu çalışmada da, bakterinin, metalin ve metallerle muamele edilmiş bakteri preparatlarının benzer sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (şekil 4.1, şekil 4.2, şekil 4.3).



Şekil 4.1. Kurşunun *B. thuringiensis*'in insektisidal aktivitesi üzerine etkisi

H2: *B. thuringiensis* 51H2 şuşu

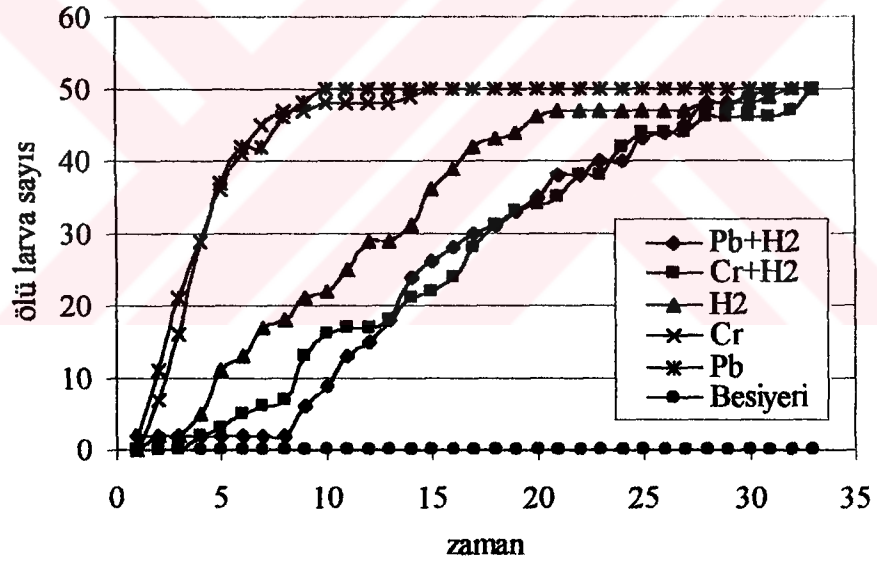
Besiyeri: Metal ve bakteri içermeyen yem



Şekil 4.2. Kromun *B. thuringiensis*'in insektisidal aktivitesi üzerine etkisi

H2: *B. thuringiensis* 51H2 şuşu

Besiyeri: Metal ve bakteri içermeyen yem



Şekil 4.3. Deney setleri arasında insektisidal aktivitenin karşılaştırılması

H2: *B. thuringiensis* 51H2 şuşu

Besiyeri: Metal ve bakteri içermeyen yem

Şekil 4.1 ve şekil 4.2'ye bakıldığında kurşun ve krom ile muamele edilmiş bakteri preparatlarının insektisidal aktivitelerinin azaldığı ve etki süresinin uzadığı tespit edilmiştir.

Aranmış (2002) çeşitli *B.thuringiensis* suşlarıyla yaptığı çalışmada, kurşun metalinin insektisidal aktiviteyi ne şekilde değiştirdiği tespit edilmeye çalışılmış sonuçlar 7. ve 14. günde alınmıştır. 7. güne kadar sayılan larva ölümleri metal ile muamele edilenlerde düşük bulunmuşken, 14. güne kadar larva ölümlerinde metalle muamele edilen bakteri preparatlarını yiyenlerde artış görülmüştür. 7. Günde yapılan sayım sonuçlarına göre metal, insektisidal aktivite de % 7.7.'lik bir azalmaya neden olmuştur. Buna karşın 14. günde yapılan sayım sonuçlarına göre metalin % 18'lik bir artışa neden olduğu saptanmıştır.

İnsektisidal aktivitenin daha uzun süreler etkisini göstermesini sağlayan yapılar sporlardır. Sporlar larva tarafından alındıktan sonra koşulların uygunluğuna göre larva bünyesinde vejetatif forma dönmektedir (Federici et al 1990, Chilcott et al 1990, Porter et al 1993). Deneme süresi zarfında, spor içerisinde yer alan metallerin, kristal toksine oranla daha uzun dönemde etkili olduğu ve larvaların ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. Aranmış'ın (2002) yaptığı çalışmada, insektisidal özelliğe sahip olmayan *Bacillus subtilis* bakterisi de denemelerde kontrol grup olarak metal ile muamele edilerek kullanılmıştır. Bu bakterinin metal içermeyen preparatı ölüme neden olmazken, metalle muamele edilen preparatı larvaların ölümüne neden olmuştur. Bu olay, bakterinin larva bünyesine alındıktan sonra vejetatif forma dönüştüğünden, içerdiği kurşun metalinin zehirleyici etkisine maruz kaldığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi kurşun ve krom metalleri insektisidal aktivite de belirgin bir düşüğe neden olmuştur. Bütün bu sonuçlar kurşun ve krom metallerinin kristal toksin proteininin yapısına girdikten sonra larvanın barsak pH'ında polipeptidlerine ayrılmadığını düşündürmektedir. Yapılan araştırmalar, kristal toksin proteininin barsak pH'ında ve barsak enzimlerince polipeptidlerine ayrıldığını, insektisidal özelliği bu polipeptidlerden birinin gösterdiğini, bu polipeptidin ise barsakta yer alan reseptörlere bağlandığını ortaya çıkarmıştır (Lacey and Undeen 1986, Federici et al 1990, Chilcott et al 1990, Porter et al 1993).

5. SONUÇ

Bu çalışma sonunda, kurşun ve krom metalinin *B. thuringiensis*'in insektisidal aktivitesini etkilediği belirlenmiş ve şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. Kurşun ve krom metalinin insektisidal aktiviteyi düşürdüğü belirlenmiş, ancak bakteri spor yapılarının vejetatif duruma geçerken ne kadar kurşun ve krom metalinin salındığının belirlenmesi gerektiği ortaya çıkarılmıştır.
2. Kurşun ve krom metallerinin *B. thuringiensis*'in spor ve kristal yapılarından daha toksik olduğu, ancak bu metallerle muamele edilerek hazırlanan bakteri preparatlarının toksisitesinin ise en düşük olduğu tespit edilmiştir.
3. İstatistiksel olarak T testi ile değerlendirme yapılmış, kurşunun bakterinin insektisidal aktivitesi üzerindeki etkisinin anlamlı olduğu ($t_{(32)} = 8.25$, $P < 0.0001$), kromunda bakterinin insektisidal aktivitesi üzerindeki etkisinin de anlamlı olduğu ($t_{(32)} = 8.845$, $P < 0.0001$) tespit edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- AKSU, Z. and DÖNMEZ, G. 2000. The use of molasses in copper (II) containing wastewaters: effects on growth and copper (II) bioaccumulation properties of *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, 36, 451-458.
- AMOROSO M.J., CASTRO G.R., DURAN A, PERAUD O., OLIVER G, HILL RT. 2001. Chromium accumulation by two *Streptomyces* spp. Isolated from riverine sediments. *J Industrial Microbiol. Biotech.*, 26, 210-215.
- ANONYMOUS, 2003. Chromium toxicity In: Case studies in Environmental Medicine. U.S.Department of human services. Agency for toxic substances and disease registry division of healt education and promotion. Coures: SS3048, Publication no: ATSDR-HE-CS-2001-0005, 36p.
- ARANMIŞ A., 2000. Kurşun metalini *Bacillus thuringiensis* 'ın bazı şuşlarının insektisidal aktiviteri üzerine etkisi, Niğde Ü. Fen. B. Ens. Yüksek lisans tezi, 35s.
- CHILCOTT, C.N., KNOWLES, B.H., ELLAR, D.J. and DROBNIEWSKI, F.A. 1990. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis israelensis* parasporal body, p. 45-77. In H.de Barjac and D. Sutherland (ed.) Bacterial control of mosquitoes and blackflies: biochemistry, genetics, and applications of *Bacillus thuringiensis* and *B.sphaericus*. Rutgers University Press, New Brunswick, N.J.
- CRICKMORE, N., NICHOLLS, C., EARP, D.J., HODGMAN, C. and ELLAR, D.J. 1990. The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressing novel entomocidal o-endotoxin combinations. *Biochem. J.* 270: 133-136.
- ÇAKMAKÇI, M.L., BOŞGELMEZ, A., SOYLU, O.Z., BULUT, M., GÜRKAN, B. 1985. *Bacillus thuringiensis*'ın üretim olanakları ve tarımda önemli zararlara neden olan bazı lepidopter türlerine karşı etkinliklerinin saptanması üzerine araştırmalar. TÜBİTAK-TOAG, Proje No: TARMİK-3.
- ÇETINKAYA, G., ÖZTÜRK, A. ve ÇAKMAKÇI, M.L. 1995a. Kristal serolojisi yöntemiyle *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* şuşlarının tanıtısı. Doğa, Türk Biyoloji Dergisi 19 (1): 29-35.
- ÇETINKAYA, G., ÖZTÜRK, A. and ÇAKMAKÇI, M.L. 1995b. The persistence time of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals on the leaf surfaces. *Acta Microbiologica Polonica* 44 (1): 91-97.
- ÇOBAN, N., 2000. Niğde yöresinden *Bacillus thuringiensis* şuşlarının izolasyonu ve faj duyarlılıklarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi Niğde Üniversitesi, Niğde, 35s.

- DE BARJAC, H., 1981. Insect pathogens in the genus *Bacillus* p. 241-250. In R.C.W. Berkeley and M. Goodfellow (ed.) *The aerobic endospore-forming bacteria: classification and identification*. Academic Press, New York.
- DE BARJAC, H., 1990. Characterization and prospective view of *Bacillus thuringiensis israelensis*, p.2-15. In H.de Barjac and D. Sutherland (ed.) *Bacterial control of mosquitoes and blackflies: biochemistry, genetics, and applications of Bacillus thuringiensis and B.sphaericus*. Rutgers University Press, New Brunswick, N.J.
- DE BARJAC, H. and FRACHON, E. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* *Entomophaga*, 35: 2, 233-240.
- DÖNMEZ, G., AKSU, Z., ÖZTÜRK, A., KUTSAL, T.1999. A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochemistry*, 34, 885-92.
- FAST, P.G., 1981. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: Microbial control of pests and plant diseases H.D. Burges (ed.), Academic Press, 223-248, London.
- FEDERICI, B.A., LÜTHY, P. and IBARRA, J.E. 1990. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis*, structure, protein composition, and toxicity, p. 16-44. In H.de Barjac and D. Sutherland (ed.) *Bacterial control of mosquitoes and blackflies: biochemistry, genetics, and applications of Bacillus thuringiensis and B. sphaericus* Rutgers University Press, New Brunswick, N.J.
- FRANCIS, C. A. and TEBO, B. M. 2002. Enzymatic manganese (II) oxidation by metabolically dormant spores of diverse *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(10): 2816-2820.
- GARCZYNSKI, S.F., CRIM, J.W. and ADANG, M.J. 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* o-endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (10): 2816-2820.
- GRIEGO, V.M. and SPENCE, K.D. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 5, 906-910.
- HALICI S., 2001. Kişisel görüşme
- KLOWDEN, M.J., HELD, A.G. and BULLA, L.A. 1983. Toxicity of *B.thuringiensis* subsp. *israelensis* to adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 312-315.
- KRATOCHVIL, D. and VOLESKY, B. 1998. Advances in the biosorption of heavy metals. *Tibtech*, 16, 291-300.

- KRIEG, A. and MILTENBURGER, H.G., 1984. Bioinsecticides: I. *Bacillus thuringiensis*. Adv. Biotech. Proc. 3: 273-290.
- LACEY, L.A., 1985. *Bacillus thuringiensis* serotype H-14, p.132-158 In H.C. Chapman (ed.) Biological control of mosquitoes. Bull. Am. Mosq. Control. Assoc. 218.
- LACEY, L.A. and UNDEEN, A.H. 1986. Microbial control of black flies and mosquitoes. Ann. Rev. Entomol. 31: 265-296.
- LAHKIM-TSROR, L., PASCAR-GLUZMAN, C., MARGALIT, J. and BARAK, Z. 1983. Larvicidal activity of *B.thuringiensis* subsp. *israelensis* serovar H-14 in *Aedes aegypti*: Histopathological studies. J. Invertebr. Pathol. 41: 104-116.
- LLOYD, J. R. and LOVLEY, D. R. 2001. Microbial detoxification of metals and radionuclides. Current Opinion in Biotechnology, 12, 248-253.
- OHBA, M., ONO, K., AIZAWA, K. and IWANAMI, S., 1981a. Two new subspecies of *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* (serotype 18) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochiensis* (serotype 19). J. Inver. Pathol. 38: 184-190.
- OHBA, M., AIZAWA, K. and SHIMIZU, S. 1981b. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan: *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis* (serotype 17). J. Inver. Pathol. 38: 307-309.
- OHBA, M. and AIZAWA, K., 1986. *Bacillus thuringiensis* subsp. *japonensis* (flagellar serotype 23): a new subspecies of *Bacillus thuringiensis* with a novel flagellar antigen. J. Inver. Pathol. 48: 129-130.
- OHBA, M. and AIZAWA, K. 1989. New flagellar (H) antigenic subfactors in *Bacillus thuringiensis* H serotype 3 with description of two new subspecies, *Bacillus thuringiensis* subsp. *sumiyoshiensis* (H serotype 3a:3d) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* (H serotype 3a:3d:3e). J. Inver. Pathol. 54: 208-212.
- ORDUZ, S., ROJAS, W., CORREA, M.M., MONTOYA, A.E. and DE BARJAC, H. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. J. Inver. Pathol. 59: 99-103.
- ÖZER, D., AKSU, Z., KUTSAL, T., ÇAĞLAR, A. 1994. Adsorption isotherms of lead (II) and chromium (VI) on *Cladophora crispata*. Environ. Technol., 15, 439-448.
- PADUA, L.E., OHBA, M. and AIZAWA, K. 1980. The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. J. Inver. Pathol. 36: 180-186.

- PORTER, A.G., DAVIDSON, E.W. and LIU, J.W., 1993. Mosquitocidal toxins of *Bacilli* and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol. Rev.* 57 (4): 838-861.
- ROANE, T.M. and KELLOGG, S.T. 1996. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can. J. Microbiol.*, 42, 593-603.
- RODRIGUEZ-PADILLA, C., GALAN-WONG, L., DE BARJAC, H., ROMAN-CALDERON, E., TAMEZ-GUERRA, R. and DULMAGE, H. 1990. *Bacillus thuringiensis* subspecies *neoleonensis* serotype H-24, a new subspecies which produces a triangular crystal. *J. Inver. Pathol.* 56: 280-282.
- SCHNEPF, H.E., TOMEZAK, K., ORTEGA, J.P. and WHITELEY, H.R. 1990. Specificity-determining regions of a Lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 265 (34):20923-20930.
- SUTHERLAND, D.J. and KHOO, B.K. 1987. The biopesticides *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* in the control of mosquitoes. *Dev. Indust. Microbiol.* 28: 55-61.
- TRAVERS, R. S., FAUST, R. M. and REICHELDERFER, C. F. 1976. Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* o-endotoxin on isolated Lepidopteran mitochondria. *J. Inverteb. Pathol.* 28: 351-356.
- TSEZOS, M. and VOLESKY, B. 1981. Biosorption of uranium and thorium. *Biotech. Bioeng.*, 23, 583-604.
- TUTKUN E., BOŞGELMEZ A. 2003. Balarısı zararlıları ve hastalıkları teşhis ve tedavi yöntemleri, Bizim Büro Basımevi, Ankara, 365s.
- VAN ESSEN, F.W. and HEMBREE, S.C. 1982. Simulated field studies with formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquitoes: residual activity and effect of soil constituents. *Mosquito News*, 42,1, 66-72.
- WEST, A.W., CROOK, N.E. and BURGESS, H.D. 1984. Detection of *Bacillus thuringiensis* in soil by immunofluorescence. *J. Inverteb. Pathol.* 43: 150-155.
- WHITELEY, H.R. and SCHNEPF, H.E. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 549-576.