

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

128934

KURŞUN METALİNİN *Bacillus thuringiensis* ' İN BAZI SUŞLARININ
İNSEKTİSİDAL AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Arzu ARANMIŞ

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Ayten ÖZTÜRK

128934

Eylül 2002

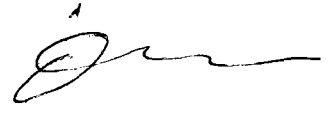


Bu alışma Niğde Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından FEB 2001/ 010 sayılı proje olarak desteklenmiştir.

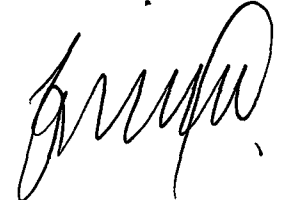
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

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


Başkan

:Yrd. Doç. Dr. Basal ÖZKAR R 
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye

:Yrd. Doç. Dr. Gazi GÖRÜR 
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye

:Yrd. Doç. Dr. Ayte ÖZTÜRK 
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye

:.....
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

Üye

:.....
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite)

ONAY:

Bu tez, 19/08/2002 tarihinde, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.



09/10/2002

Doç. Dr. Aydın TOPÇU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

10 YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
EMKÜMANTASYON MÜHÜRÜ

ÖZET

KURŞUN METALİNİN *Bacillus thuringiensis* 'İN BAZI SUŞLARININ İNSEKTİSİDAL AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

ARANMIŞ, Arzu

Niğde Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Ayten Öztürk

Temmuz 2002, 35 Sayfa

Bu çalışmada, kurşun metalinin *Bacillus thuringiensis* türüne ait bakterilerin insektisidal aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla toplam üç referans bakteri (*B.t. var.morrisoni* T08001, *B.t. var. thuringiensis* T01001, *Bacillus subtilis* 06100) ve 16 adet Niğde yöresinden izole edilmiş *B.t.* suşları kurşun metali ile muamele edildikten sonra, insektisidal aktiviteleri yönünden un güvesi (*Ephestia kuehniella* L.) üzerinde denenmiştir. Denemelerde kurşun ile muamele edilen suşların ilk 7.günde insektisidal aktivitelerinde düşme görülmüş, 14.günde ise insektisidal aktivitenin arttığı tespit edilmiştir. Metal ile muamele edilmiş suşlardaki kristal ve spor yapıları morfolojik olarak elektron mikroskopta incelenmiş ve kurşun ile muamele görmüş spor ve kristal yapının normalden farklı olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca kurşun içeriği bakımından yapılan kimyasal analiz sonuçlarına göre, hem sporların hem de kristal yapının farklı oranlarda kurşun metalini adsorbladığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, kurşun, insektisidal aktivite

SUMMARY

ARANMIŞ, Arzu

INFLUENCE OF LEAD METAL ON INSECTICIDAL ACTIVITY OF SOME STRAINS OF *Bacillus thuringiensis*

University of Niğde
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK

July 2002, 35 pages

In this study, the influence of metal lead on insecticidal activity of of *Bacillus thuringiensis* (B.t.) strains was determined. Three reference bacteria (B.t. var.morrisoni T08001, B.t. var. *thuringiensis* T01001, *Bacillus subtilis* 06100) and 16 *Bacillus thuringiensis* strains isolated Niğde were treated with lead metal and tested on *Ephestia kuehniella* for their insecticidal activity. Strains treated with metal lead showed decrease in activity within the first 7 days but, an increase in activity in 14 days. Examination of the crystal and spore structures under the electron microscope showed that morphological features of crystal and spores treated with lead was any different from the original ones. However, different levels of lead was observed to have been adsorbed in spores.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, lead, insecticidal activity

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında benden yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayten ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca bu tezin yürütülmesinde benden ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Öğretim elemanlarından Sayın Yrd. Doç. Dr. Selçuk AKTÜRK'e (Fizik Bölümü), Sayın Arş. Gör. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU'na (Biyoloji Bölümü), Sayın Arş. Gör. Erdem YAŞAR'a (Fizik Bölümü), Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim elemanlarından Sayın Dr. Rıfat BATTALOĞLU'na ve Dr. İbrahim NARİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bilgi ve deneyimlerini sakınmadan anlatan ve un güvesinin teminini sağlayan Sayın Samet HALICI'ya (Ankara Köy Hizmetleri Müdürlüğü Zirai Mücadele ve Araştırma Laboratuvarı) çok teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında manevi desteklerinden dolayı tüm bölüm hocalarıma ve arkadaşlarıma, özellikle değerli arkadaşım Arş. Gör. Cemil İŞLEK ve Ümit ÖZCAN'a da çok teşekkür ederim.

Tüm bu çalışmalarım esnasında benden maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	III
SUMMARY	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
BÖLÜM I.	1
1.GİRİŞ.....	1
BÖLÜM II.....	2
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	2
2.1. Bakteriyel İnsektisidler.....	2
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> Türünün Özellikleri.....	3
2.2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in sınıflandırılması.....	3
2.2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in toksinleri.....	5
2.2.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in parasporal kristal endotoksini	5
2.2.5. Kristal endotoksinin etki mekanizması	6
2.2.6. Kristal endotoksin preparatlarının kullanımı ve güvenliği.....	7
BÖLÜM III.....	10
3. MATERYAL VE METOT.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.1.1. Bakteriler ve un güvesi.....	10
3.1.2. Araç, gereç ve kimyasal maddeler.....	10
3.2. Metot.....	10
3.2.1. Un güvesinin (<i>Ephesia kuehniella</i> L.) laboratuvarında üretimi.....	10
3.2.2. Bakteri preparatlarının hazırlanması	11
3.2.3. İnsektisidal aktivitenin saptanması.....	12
3.2.4. Bakterilerin kristal ve spor yapılarının elektron mikroskop çalışması.....	12
3.2.5. Bakterilerin kristal ve spor yapılarında kurşun analizi.....	13
BÖLÜM IV.....	14
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	14
4.1. Bakterilerin İnsektisidal Aktivitelerinin Saptanması.....	14

4.2. Kristal ve Sporların Elektron Mikroskop Çalışmaları.....	16
4.3. Kristal ve Sporlarda Kurşun Analizi.....	20
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	21
6. KAYNAKLAR.....	22
7. EKLER	25



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa no:

Çizelge 2.1. İnsektisidal Bacillus türlerinin ayırım anahtarı	2
Çizelge 2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in sınıflandırılması	4
Çizelge 4.1. İnsektisidal aktivite tespitinde sayım sonuçları	14
Çizelge 4.2. Atomik absorpsiyon ölçüm sonuçları	20



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Bakterilerin 7. Günde Larvalar Üzerine Etkileri	15
Şekil 4.2. Bakterilerin 14. Günde Larvalar Üzerine Etkileri	16
Şekil 4.3. <i>B.subtilis</i> 06100 bakterisine ait sporların SEM'de görüntüsü	17
Şekil 4.4. B.t.var. <i>thuringiensis</i> T01001. bakterisine ait sporların SEM'de görüntüsü	18
Şekil 4.5. Kristal toksinin SEM'de görüntüsü.....	19



BÖLÜM I

GİRİŞ

Zararlı böcek türleriyle mücadele de alternatif metotlardan biri biyolojik mücadeledir. Kimyasal ilaçların toprakta birikimi ve diğer zararlı olmayan canlılar üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle uzun yıllardan beri bilim adamları alternatif bir metot olarak biyolojik mücadele yollarını geliştirmektedir. Geliştirilmiş metotlardan bazıları içerisinde mikrobiyel insektisidler geniş bir kullanıma sahiptir.

Biyolojik mücadelede kullanılan canlılar içerisinde virüs, bakteri ve funguslar gibi çeşitli mikroorganizmalar da bulunmaktadır. 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, biyoinsektisidlerin çevresel faktörler tarafından etkinlikleri üzerindeki farklılıklar belirlenmeye çalışılmış, ancak çevredeki kirleticilerin örneğin insektisid, herbisid ve ağır metallerin biyoinsektisidlerin aktivitesini nasıl etkilediği konusu çalışılmamıştır. Bu çalışmayla, bu bilgi boşluğunun giderilmesinde bir adım atılması hedeflenmiştir.

BÖLÜM II

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Bakteriye İnsektisidler

Böcek patojeni çok sayıda bakterinin bulunmasına karşın, diğer canlıları etkilemeden güvenle kullanılacak az sayıda bakteri bulunmuştur. Bunların çoğu Bacillaceae familyasına ait endospor üreten bakteriler olup bunlardan sadece beş türün biyoinsektisid olarak kullanılabilceği 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 µm)

Şişkinlik oluşturmayan sporangiyumlar içinde eliptik endosporlar bulunur.

Yuvarlak kare şeklinde veya şekli belirsiz parasporal kristaller bulunur.

Lepidoptera ve Diptera larvalarına patojendirler.

= *Bacillus thuringiensis*

B. Bakteriler daha küçük çubuklar şeklindedir (Hücrelerin çapı < 1.0 µm)

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 (A) şişkinlik oluşturmeyen eliptik endospor içeren sporangiyumları bulunan bakteriler (*Bacillus thuringiensis*) oluştururken, ikinci grubu (B) şişkinlik oluşturan oval veya eliptik endosporları içeren sporangiyumları bulunan bakteriler (*B. lentimorbus*, *B. popilliae* ve *B. larvae*) ve şişkinlik oluşturan sporangiyumlu yuvarlak sporlara sahip bakteriler (*B.sphaericus*) oluşturmaktadır.

2.2. *Bacillus thuringiensis* Türünün Özellikleri

B.thuringiensis gram pozitif özellikte, endospor oluşturan, fakültatif anaerob gelişme özelliğine sahip, toprak kökenli bir bakteridir. İlk olarak Ishiwata (1901) 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. *Bacillus 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 kalite ve kantite 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 tanımlayan ve geçerli isim
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, yayınlanmadı
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&İvanomi, 1981
19	tochigiensis	TOC	Ohba, Ono, Aizawai&İvanomi, 1981
20a20b	yunnanensis	YUN	Wan-yu, Qi-fang, Xue-ping & You-wei,1979
20a20c	pondicheriensis	PON	DeBarjac, Frachon, Rajagopalan&Cosmao, yayınlanmadı
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, yayınlanmadı
26	silo	SIL	De Barjac&Lecadet, yayınlanmadı
27	mexicanensis	MEX	Rodriguez-Padilla, Galan-Wong, 1988

2.2.3. *Bacillus thuringiensis*'in toksinleri

B.thuringiensis'e ait suşların 100'den fazla Lepidoptera üyesi böcek larvasına, Diptera ve Coleoptera 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). *Bacillus 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).

2.2.4. *Bacillus thuringiensis*'in parasporal kristal endotoksini

Toksinin bipiramidal kristal 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), Coleoptera 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 (Federici et al 1990, Porter et al 1993).

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).

2.2.5. 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 spesifikliğini 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 fenotipteki 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).

Toksisitede ilk adım, muhtemelen fosfolipid olan ve doymamış yağ asitlerini içeren reseptör bölgelerine toksin proteinin bağlanmasıdır. Buna karşın bağlanma bölgelerinin yapısı tam olarak belirlenememiştir. 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).

2.2.6. Kristal endotoksin preparatlarının kullanımı ve güvenliği

B.thuringiensis'in hayvan ve insan sağlığı açısından güvenilirliğinin test edildiği 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, intraperitonal, damariçi, göziçi ve teneffüs yoluyla yapılan uygulamaları sonucunda, 10^7 - 10^8 bakteri/hayvan düzeyindeki preparasyonların akut veya kronik toksisiteye ya da enfeksiyona neden olmadığı, sadece 10^6 canlı bakteri/fare düzeyinde, fare beynine yapılan bir enjeksiyonun ölüme neden olduğu bulunmuştur. Yapılan diğer çalışmalarda, bu bakterinin kristal toksinlerine maruz kalan balık, kurbağa gibi diğer vertebratların, sivrisinek predatörü olan artropodların (eklembacaklıların), yumuşakçalar ve diğer su canlılarının olumsuz yönde etkilenmediği 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 formulasyon tipinin kullanıldığı yerler

birbirinden farklıdır. Toz preparatların kullandıkları 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).



BÖLÜM III

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteriler ve un güvesi

Niğde Üniversitesi FEB 97-04 kod no'lu proje kapsamında Niğde ve yöresinden izole edilen 16 adet *Bacillus thuringiensis* suşu (A3, B2, B8, B9, D1, D4, F12, F15, F16, F17, G11, H2, J8, W10, X9, Z3) kullanılmıştır.(Çoban, 2000)

Bu çalışma için ayrıca *B.thuringiensis* (B.t.) türüne ait *B.t. var.morrisoni* T08001 ve *B.t.var. thuringiensis* T01001 serotipleri (Pasteur Enstitüsü) Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliğinden, *Bacillus subtilis 06100* suşu Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden alınmıştır.

Denemelerde kullanılacak un güvesi (*Ephestia kuehniella* L.) Ankara Köy Hizmetleri Müdürlüğü Zirai Mücadele ve Araştırma laboratuvarından alınmıştır.

3.1.2. Araç, gereç ve kimyasal maddeler

Niğde Üniversitesi Biyoloji, Kimya Bölümü ve Kırıkkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi elektron mikroskop laboratuvarlarında bulunan araç, gereç ve kimyasal maddeler ve N.Ü.Araştırma Fonu tarafından desteklenen FEB 2001/010 kod nolu proje kapsamında alınan araç, gereç ve kimyasal maddeler kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Un güvesinin (*Ephestia kuehniella* L.) laboratuvarında üretimi

Bu amaçla ince telle beş tarafı kapatılmış 70x110 cm boyutlarında tahta kabin içerisinde nemli ve 25-30°C sıcaklığa sahip bir ortam hazırlanmıştır. Un güvesi için yem olarak 1/4 oranında mısır unu, 1/4 oranında buğday kepeği ve 2/4 oranında buğday unu içeren bir karışım hazırlanmıştır. Bu karışım içerisine *Ephestia kuehniella* L. yumurtaları bırakılmıştır. Yumurtalar birkaç gün içerisinde açılarak I. evre larvalar çıkmıştır (Halıcı, 2001).

3.2.2. Bakteri Preparatlarının Hazırlanması

% 1.0 g kurşun olacak şekilde kurşun nitrat ($Pb(NO_3)_2$) çözeltisi, distile su içerisinde hazırlanmış ve otoklavda sterilize edilmiştir. Daha sonra aseptik koşullarda bu çözeltiden sıvı besiyeri içerisinde dilüsyonları hazırlanmış (1/10, 1/100, 1/1000, 1/ 10 000, 1/ 100 000), aktif bakteri kültürlerinden bu besiyerleri içerisine 100'er µl aktarılmıştır. Ancak bu işlemde hemen sonra kurşun nitrat çözeltisi besiyeri içeriğinin çökmesine neden olmuştur. Aynı amaçla aynı oranlarda kurşun içeren nutrient agar besiyeri hazırlanmış aktif bakteri kültürlerinden bu besiyeri üzerine yayma ekim yapılmıştır. Bir gecelik inkübasyon sonucunda çok düşük kurşun içeren ortamda bile üreme görülmemiştir. Bundan dolayı bakteriler metali ortamda geliştirilmemiş, ancak bakteriler geliştirildikten sonra metal ile muamele edilmiştir.

Çetinkaya ve Çakmakçı'nın (1996) kullandığı yöntem değiştirilerek bakteri preparatları hazırlanmış ve larvalara tatbik edilmiştir. Bu amaçla, 19 adet bakteri nutrient agar besiyeri içeren petri kutuları içerisine yayılarak inoküle edilmiş 35°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, serum fizyolojik (% 0.987 g NaCl çözeltisi) yardımıyla petri kutularından toplanmış ve eppendorf tüplere konularak 5 dakika süreyle 13 000 rpm'de santifrüj edilmiştir. Yaş ağırlığı yaklaşık 0.10 g olacak şekilde bakteri elde edildikten sonra iki defa serum fizyolojik ile yıkanmıştır. Daha sonra 1.0 ml serum fizyolojik içerisinde tekrar çözülmüş, homojen hale getirilmiş bu süspansiyonun yarısı diğer bir eppendorf tüpe aktararak kurşun metali ile muamele edilmiştir.

Metalle muamele etmek için ayrılan bakteri süspansiyonu tekrar santrifüj edilerek serum fizyolojiktan ayrılmış ve 1.0 ml % 1.0'lik kurşun içeren kurşun nitrat çözeltisinde 20 saat süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda santifrüj edilip sıvı kısım atomik absorpsiyon çalışması için ayrıldıktan sonra, bakteri çökeleği içindeki kurşun metalini uzaklaştırmak üzere iki defa serum fizyolojik ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çökelek 1.0 ml serum fizyolojik ile çözülmüştür.

Kurşun metaliyle muamele edilmiş ve edilmemiş serum fizyolojik içinde çözünmüş bakteri solüsyonları 0.5 g yemle karıştırılarak petri kutuları içerisine yayılmış ve bir gece

bekletilerek kurutulmuştur. Aynı işlem bakteri içermeyen ve kontrol olarak kullanılacak besiyerlerinede uygulanmıştır. Bu besiyerlerine % 1.0'lik kurşun çözeltisinden 1 ml ilave edilmiştir. Daha sonra petri kutularındaki kuru karışım ezilip, öğütülerek larvalara yedirilecek hale getirilmiştir. Ayrıca kontrol olarak sadece besiyeri içeren petri kutuları da hazırlanmıştır.

3.2.3. İnsektisidal aktivitenin saptanması

Bölüm 3.2.2' de hazırlanışları anlatılan toz preparatların bulunduğu her bir petri kutusu içerisine 2. ve 3. evrede 20 adet larva bırakılmıştır. Bu deneme hem metal içermeyen hem de metal ile muamele edilmiş preparatlarla yapılmıştır. Ölü larva sayımları 7. ve 14. günler içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu düzenek üçer paralel olarak yapılmış ve sonuçların ortalamaları alınıp, tam sayı olarak kaydedilmiştir.

3.2.4. Bakterilerin kristal ve spor yapılarının elektron mikroskop çalışması

Metal ile muamele edilen bakteriyel yapıların (spor ve kristallerin) morfolojik olarak değişikliğe uğrayıp uğramadığı elektron mikroskop çalışmayla belirlenmeye çalışılmıştır. Bazı bakteri suşları 3.2.2.'de anlatıldığı şekilde elektron mikroskop için hazırlanmıştır.

500 µl bakteri çözeltisi içerisine 1.0 cm boyunda yuvarlak kesilmiş filtre kağıtları batırılmış ve 1 dakika süreyle beklenmiştir. Daha sonra filtre kağıtları osmium tetraoksit içerisine alınıp 15 dakika süreyle fikse edilmiştir. Süre sonunda tüplerdeki osmium tetraoksit boşaltılıp üzerine sodyum fosfat tamponu konularak 5 dakika süreyle iki kez yıkanmıştır. Daha sonra filtre kağıtları sırayla %50- %60- %70- %80- %90- %96- %99'luk etil alkol serilerinde 5'er dakika dehidrasyona tabi tutulmuş ve bu süre sonunda filtre kağıtları petri kutularına konularak yarım saat süreyle kurutulmuştur (Çavuşoğlu, 2002). Kuruyan filtre kağıtları stamplar üzerine alınarak "Polaron SC500 sputter coater" altın kaplama cihazı ile 2 dakika altın tozuyla kaplanmış ve JSM 5600 SEM'de incelenerek, fotoğraflanmıştır.

3.2.5. Bakterilerin kristal ve spor yapılarında kurşun analizi

Taramalı elektron mikroskopta kurşun analizi içinde 3.2.3' de anlatıldığı şekilde birer örnek daha hazırlanmış, ancak stamplar üzerine alındıktan sonra karbon kaplama cihazı (Polaron CA7615 carbon accessory model) cihazında karbon ile kaplanmıştır Daha sonra JSM 5600 SEM de görüntüleme ve analiz gerçekleştirilmiştir (Ekler).

Elektron Mikroskop çalışması için kullanılan bakteriler; *B.t. var.morrisoni* T08001, *B.t.var.thuringiensis* T01001 ve *B.subtilis* 06100' de kullanılmıştır.

Elektron mikroskop için hazırlanmış örneklerin süpernatantı içerisindeki kurşun miktarının belirlenmesi amacıyla atomik absorpsiyon cihazında (Shimadzu AA-6501 F Atomic Absorbtion Flame Emission Spectrophotometer) *B.subtilis* 06100, *B.t. var.morrisoni* T08001 ve *B.t. var. thuringiensis* T01001'in süpernatantlarında ölçümler yapılmış ve paralel örneklerin ortalamaları alınmıştır.

BÖLÜM IV
BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bakterilerin İnsektisidal aktivitelerinin saptanması

Denemelerde kullanılan 18 adedi Niğde izolatu olmak üzere 20 adet bakterinin insektisidal aktiviteleri 7. gün (Şekil.4.1) ve 14. gün (Şekil 4.2.) olmak üzere ölü larvaların sayımıyla belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Denemeler üç paralelli yapılmış ve ortalamalar tamsayı olarak alınmıştır.

Çizelge 4.1. İnsektisidal aktivite tespitinde sayım sonuçları

Bakteri kod no:	Ö L Ü L A R V A S A Y I S I							
	7. G Ü N				1 4. G Ü N			
	A		B*		A		B*	
	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%
A3	5	25	4	20	10	50	16	80
B2	9	45	8	40	9	45	11	55
B8	7	35	1	5	8	40	9	45
B9	4	20	3	15	5	25	16	80
D1	5	25	3	15	7	35	12	60
D4	4	20	3	15	8	40	12	60
F12	8	40	7	35	10	50	15	75
F14	8	40	2	10	13	65	15	75
F15	7	35	2	10	13	65	17	85
F16	8	40	5	25	9	45	12	60
F17	1	5	0	0	3	15	4	20
G11	3	15	2	10	5	25	13	65
H2	2	10	1	5	5	25	7	35
H10	8	40	5	25	15	75	18	90
J8	4	20	3	15	6	30	9	45
X9	7	35	5	25	8	40	8	40
W10	7	35	4	20	7	35	9	45
Z3	1	5	0	0	2	10	3	15
B.t.t	14	70	12	60	18	90	20	100
B.t.m.	18	90	15	75	18	90	19	95
B.s.	0	0	7	35	0	0	18	90
Bakterisiz besiyeri	0	0	7	35	0	0	16	80
%Toplam etkinlik ⁺	% 32.5		% 21.2		% 44.7		% 61.2	

⁺ : Sadece B.t. suşlarından alınan sonuçlardan hesaplanmıştır

A : Kurşun metali içermeyen bakteri preparatlarından elde edilen sonuçlar

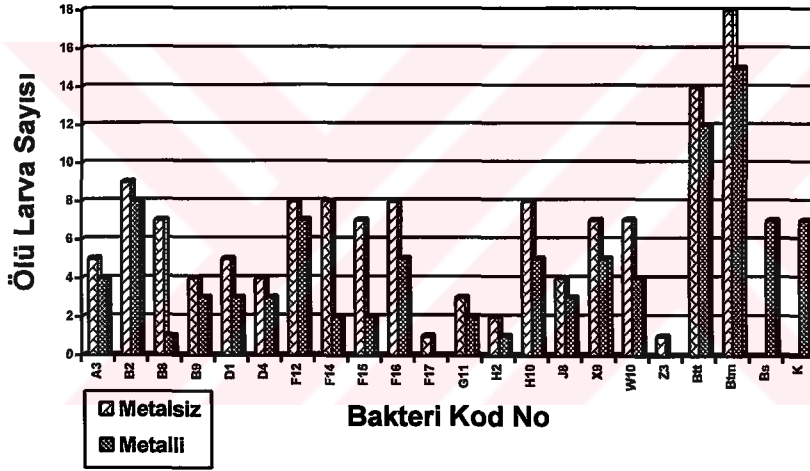
B* : Kurşun metali ile muamele edilen bakteri preparatlarından elde edilen sonuçlar

B.t.t. : *B.t. var. thuringiensis* T01001

B.t.m. : *B.t. var. morrisoni* T08001

B.s. : *Bacillus subtilis* 06100

Çiğgelge 4.1.'de görüldüğü gibi 7. güne kadar yapılan sayımlarda ölü larva sayısı metal ile muamele edilenlerde düşük iken 14. günde ölü larva sayısında artış görülmüştür. Pozitif kontrol olarak kullanılan *B.t.var.thuringiensis* T01001 ve *B.t.var.morrisoni* T08001 suşlarında da durum aynı bulunmuştur. İnsektisidal aktiviteye sahip olmayan *B. subtilis* 06100 suşu negatif kontrol olarak, öldürücü etkinin metalden kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek için kullanılmıştır. Metal ile muamele edilen *B.subtilis*'te 7. günde ölüm oranı % 35 iken 14. günde % 90'lık bir artış göstermiştir. Sadece metal içeren besiyerlerinde de ölüm oranı 7. günde % 35 iken bu oran 14. günde % 80 olarak tespit edilmiştir. 7. Günde yapılan sayım sonuçlarına göre metal, insektisidal aktivite de % 11.3'lük bir azalmaya, buna karşın 14. günde yapılan sayım sonuçlarına göre metalin % 16.5'lik bir artışa neden olduğu saptanmıştır.



B.t.t. : *B.t. var. thuringiensis* T01001

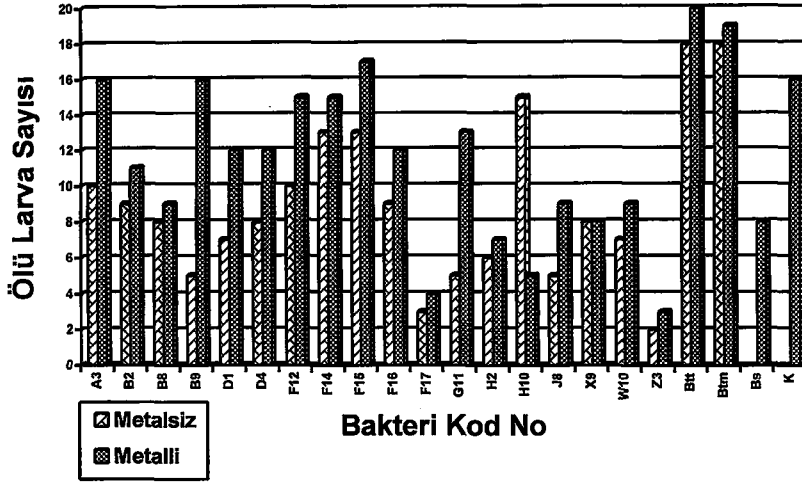
B.t.m. : *B.t. var. morrisoni* T08001

B.s. : *Bacillus subtilis* 06100

K : Bakteri içermeyen besiyerleri

Şekil 4.1. Bakterilerin 7. Günde Larvalar Üzerine Etkileri

Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi insektisidal aktivite de bazı suşlarda belirgin bir düşüş görülürken bazılarında çok fazla fark görülmemektedir. Bütün bu sonuçlar kurşun metalinin kristal protein yapısına girdikten sonra larvanın barsak pH'ında polipeptidlerine ayırlamadığını düşündürmektedir. Yapılan araştırmalar, kristal protein yapının 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).



B.t.t. : *B.t. var. thuringiensis* T01001

B.t.m. : *B.t. var. morrisoni* T08001

B.s. : *Bacillus subtilis* 06100

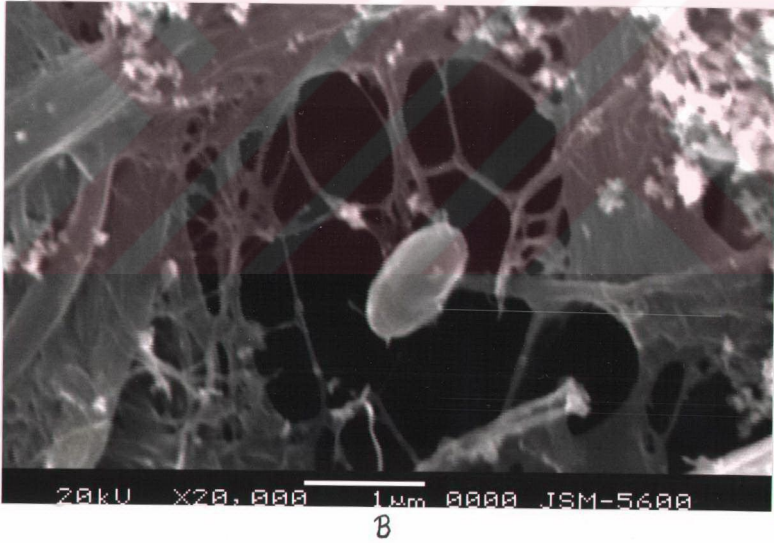
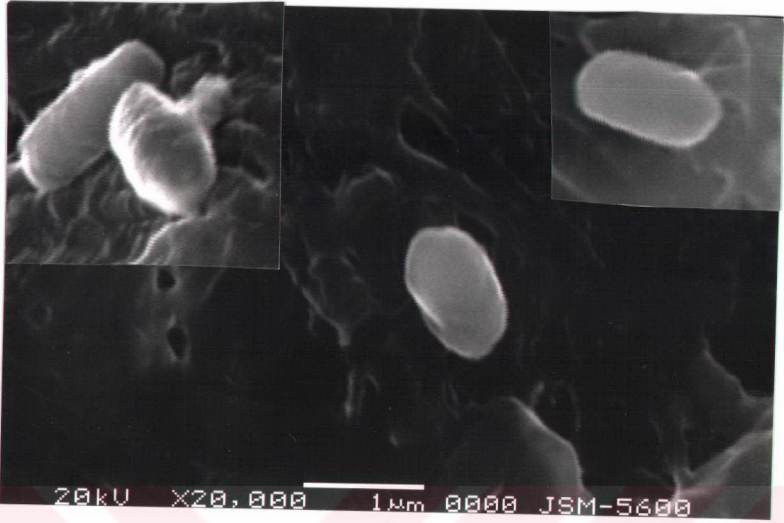
K : Bakteri içermeyen besiyerleri

Şekil 4.2. Bakterilerin 14. Günde Larvalar Üzerine Etkileri

İnsektisidal aktivitenin daha uzun süreler etkisini göstermesini sağlayan yapılar ise 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). Bu süre zarfında spor içerisinde yer alan kurşun metalinin etkili olarak larvaların ölümüne yol açabileceği düşünülmektedir. *Bacillus subtilis*, insektisidal özelliğe sahip olmayan bir bakteri türüdür. Bu bakterinin metal içermeyen preparatı ölümüne neden olmazken, metalle muamele edilen preparatı larvaların ölümüne neden olmuştur. Bu olayın bakterinin larva bünyesine alındıktan sonra vejetatif forma dönüştüğü ve bu esnada içerdiği kurşun metalinin zehirleyici etkisine maruz kaldığı düşünülmektedir.

4.2. Kristal ve Sporların Elektron Mikroskop Çalışmaları

Taramalı elektron mikroskop çalışmasında hem kristal hem de sporda metal ile muamele edilenlerin metal ile muamele edilmeyenleri arasında belirgin bir morfolojik farklılık tespit edilememiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.3. *B. subtilis* 06100 bakterisine ait sporların SEM'de görüntüsü;

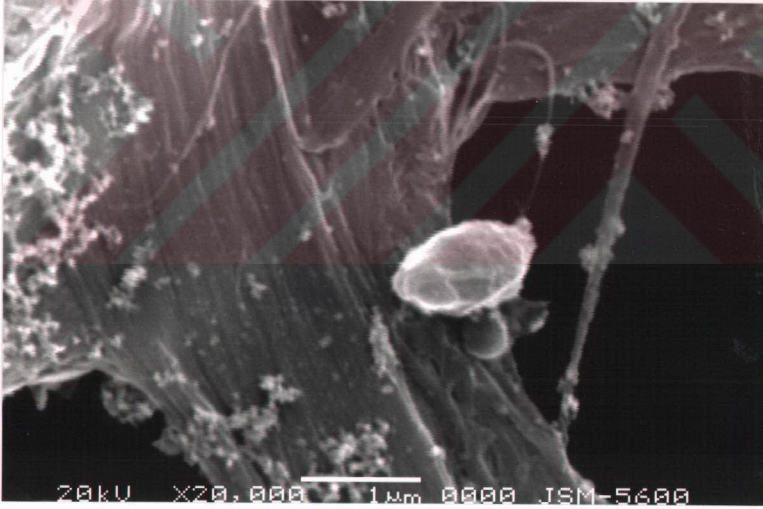
A: metalle muamele edilmiş *B. subtilis* 06100 suşu;

B: metal ile muamele edilmemiş *B. subtilis* 06100 suşu

Bar: 1 µm; Büyütme X20 000.



A



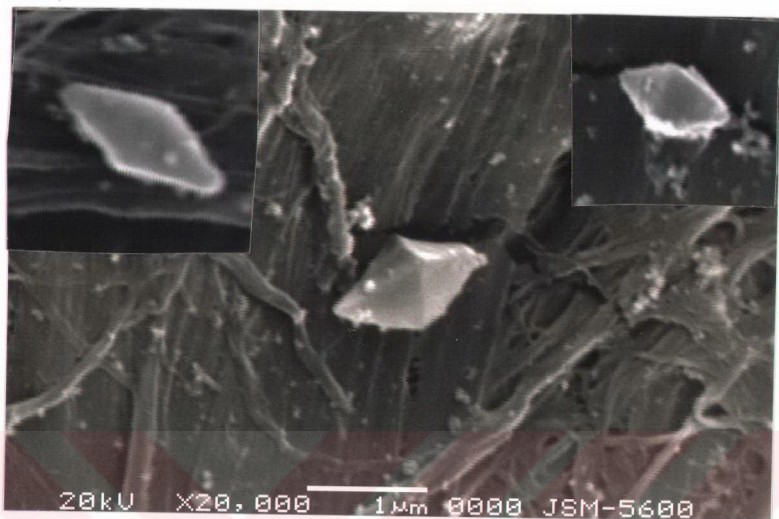
B

Şekil 4.4. *Bt.var. thuringiensis* T01001. bakterisine ait sporların SEM’de görüntüsü ;

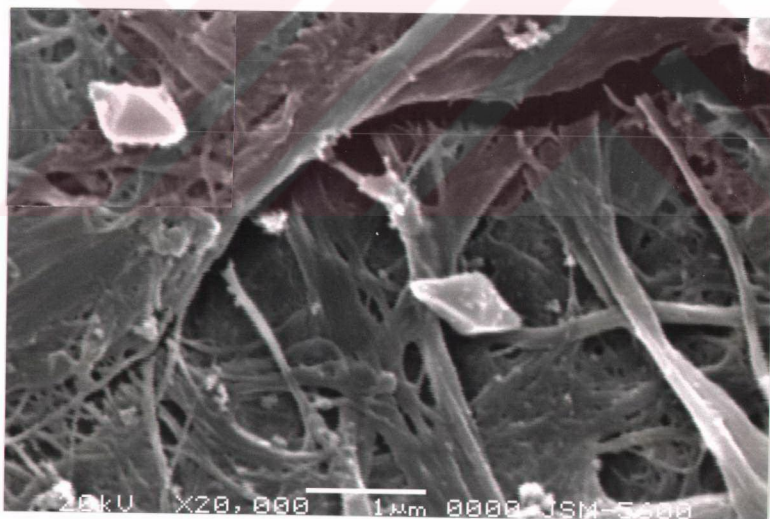
A: metal ile muamele edilmemiş *Bt.var. thuringiensis* T01001. suşu ;

B: metal ile muamele edilmiş *Bt.var. thuringiensis* T01001 suşu ;

Bar: 1 µm; Büyütme X20 000.



A



B

Şekil 4.5. Kristal toksinin SEM'de görüntüsü; A: metalle muamele edilmiş *Bt. var. thuringiensis* T01001 suşu; B: metal ile muamele edilmemiş *Bt. var. thuringiensis* T01001 suşu ; Bar: 1µm ; Büyütme X20 000.

4.3. Kristal ve Sporlarda Kurşun Analizi

Taramalı elektron mikroskopta karbon kaplanmış örneklerden yapılan kurşun analiz sonuçları Ekler kısmında verilmiştir. Buna göre ortalama olarak spor yapılarında kurşunun diğer metaller arasındaki oranı % 25 olarak bulunurken, kristal proteinde diğer metaller arasında kurşun oranı % 27 olarak tespit edilmiştir.

Ayrıca kurşun ile muamele edildikten sonra santrifüjle ayrılan süpernatant kısmından atomik absorpsiyon cihazıyla ölçümler yapılmıştır (Çizelge 4.2). Başlangıçtaki kurşun miktarı 10 mg/ml iken 20 saat sonra yapılan uzaklaştırma sonunda uzaklaştırılan kurşun çözeltisinde ortalama metal miktarları, *B.subtilis* 06100 suşu için 4.6 mg/ml ; *Bt. var.morissoni* T08001 suşu için 4.2 mg/ml, *Bt.var. thuringiensis* T01001 suşu için 5.6 mg/ml, bulunmuştur. Sonuç olarak, her üç bakterinin çözeltideki kurşun miktarının yaklaşık % 50'sini absorbladığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Atomik absorpsiyon ölçüm sonuçları

Bakteri	Başlangıçtaki kurşun miktarı (mg/ml) [#]	Absorpsiyon sonrası ortalama kurşun miktarları (mg/ml) [*]	Absorpsiyon ⁺ (%)
<i>Bacillus subtilis</i> 06100	10	4.6	54
<i>Bt.var.morissoni</i> T08001	10	4.2	58
<i>Bt.var.thuringiensis</i> T01001	10	5.6	44

: Hazırlanan çözeltideki kurşun miktarı

* : 20 saatlik süre sonunda süpernatanttaki kurşun miktarı

+ : 20 saatlik süre sonunda bakterinin absorpladığı kurşun oranı

5. SONUÇ

Bu çalışma sonunda Őu sonuçlar elde edilmiştir:

1. Kurşun metalinin *B. thuringiensis*'in insektisidal aktivitesini etkilediği,
2. Kurşun metalinin *B. thuringiensis*'in spor ve kristal yapılarının morfolojisini deĐiŐtirmedeĐi,
3. *B. thuringiensis*'in spor ve kristal yapılarının kurşun metalini farklı oranlarda absorplayabildiği bulunmuştur.



6. KAYNAKLAR

- CHILCOTT, C.N., KNOWLES, B.H., ELLAR, D.J. and DROBNIIEWSKI, 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*'in üretim olanakları ve tarımda önemli zararlara neden olan bazı lepidopter türlerine karşı etkinliklerinin saptanması üzerine araştırmalar. TÜBİTAK-TOAG, Proje No: TARMİK-3.
- ÇAVUŞOĞLU, K. 2002. Kişisel görüşme. Kırıkkale üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü. Kırıkkale.
- ÇETINKAYA, G., ÖZTÜRK, A. ve ÇAKMAKÇI, M.,L. 1995a. Kristal serolojisi yöntemiyle *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* suşlarının tanısı. *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.
- ÇETINKAYA, G. ve ÇAKMAKÇI, M.,L. 1996. Toprak ve ölü larvalardan izole edilen *Bacillus thuringiensis* izolatlarının patojenitesinin araştırılması. *Tr. J. Agriculture and Forestry* 20, 29-35.
- ÇOBAN, N., 2000. Niğde yöresinden *Bacillus thuringiensis* suşlarının 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.turingiensis* subsp. *israelensis* serovar H-14 in *Aedes aegypti*: Histopathological studies. J. Invertebr. Pathol. 41: 104-116.
- 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.*tochigiensis* (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.
- 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.
- 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.
- 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.

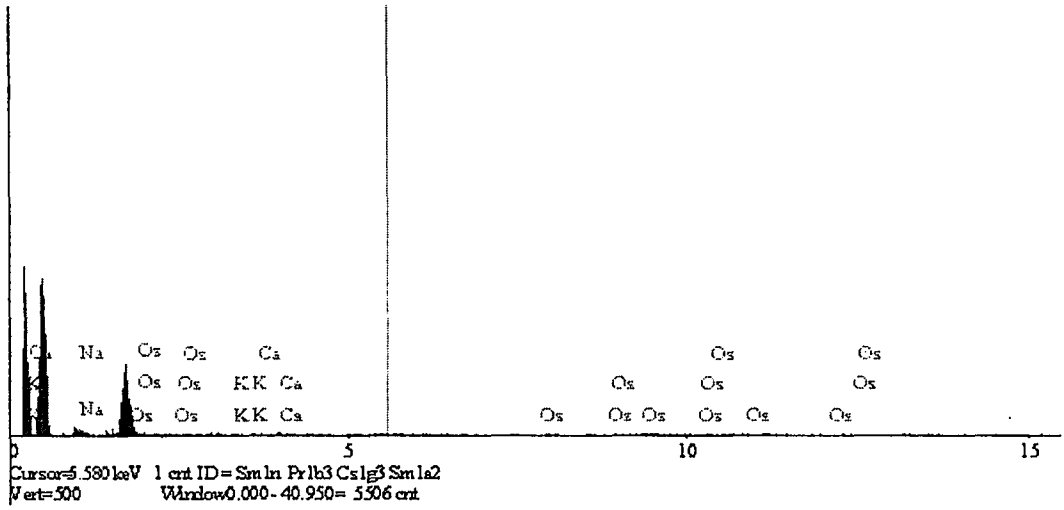
EKLER:

Sayfa No:

Taramalı Elektron Mikroskop Kurşun Analiz Sonuçları

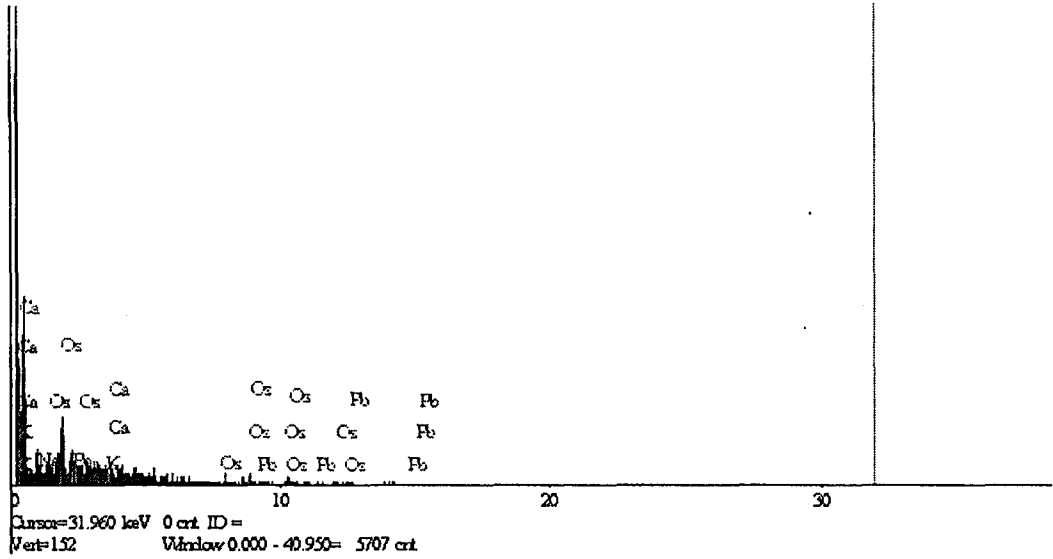
1 : metalle muamele edilmemiş F14 suşunun sporu	26
2 : metalle muamele edilmiş F14 suşunun sporu	27
3 : metalle muamele edilmemiş H10 suşunun sporu	28
4-1 : metalle muamele edilmiş H10 suşunun sporu	29
2 spor : metalle muamele edilmiş B.t.t suşunun sporu	30
2 kristal : metalle muamele edilmiş B.t.t. suşunun kristali	31
4 spor : metalle muamele edilmemiş B.t.t. suşunun sporu	32
4 kristal (metalle muamele edilmemiş B.t.t. kristali)	33
e : metalle muamele edilmemiş B.s. suşunun sporu).....	34
f : metalle muamele edilmiş B.s. suşunun sporu	35

1 (662x553x24b bmp)



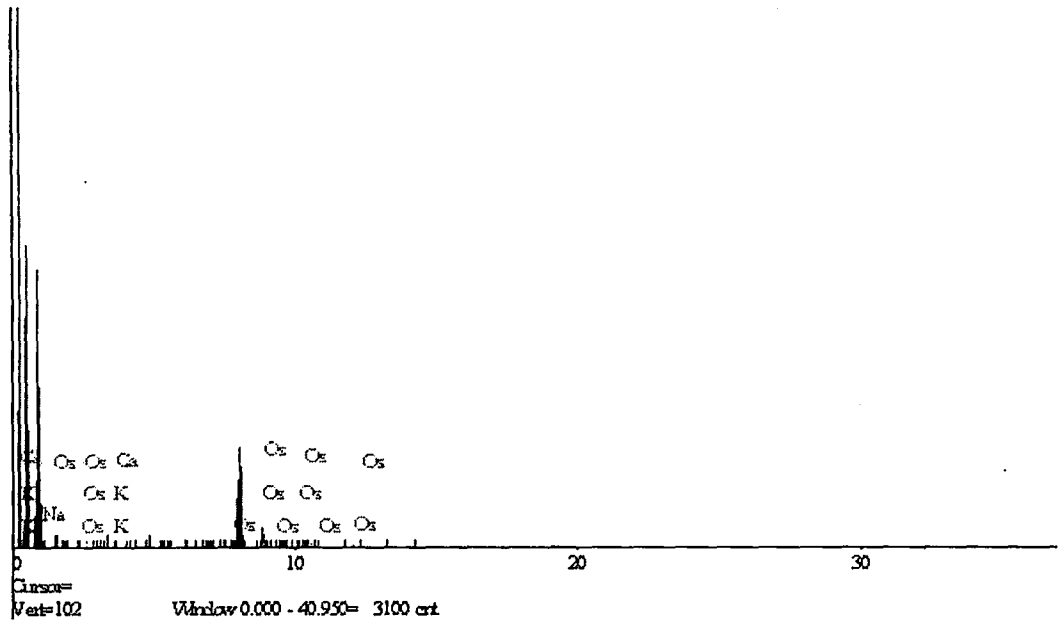
Elt.	Line	Intensity (c/s)	Conc	
Na	Ka	2.76	30.681	wt.%
K	Ka	0.45	6.149	wt.%
Ca	Ka	0.30	4.106	wt.%
Os	La	0.28	59.063	wt.%
			100.000	wt.%
				Total

kV
20.0



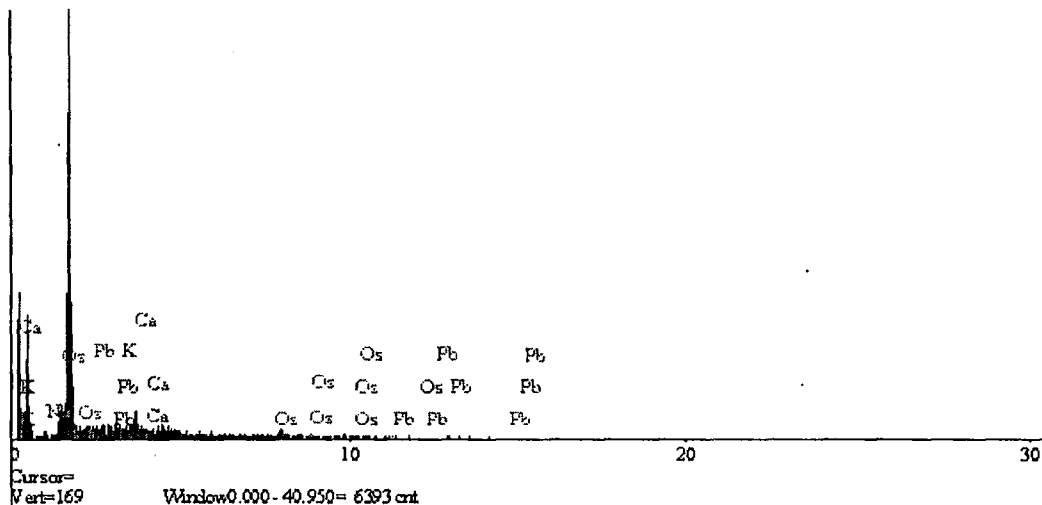
Elt.	Line	Intensity (c/s)	Conc	
Na	Ka	3.87	7.649	wt.%
K	Ka	3.70	7.656	wt.%
Ca	Ka	1.97	4.113	wt.%
Os	La	1.69	50.256	wt.%
Pb	La	0.58	30.326	wt.%
			100.000	wt.%
				Total

kV
20.0



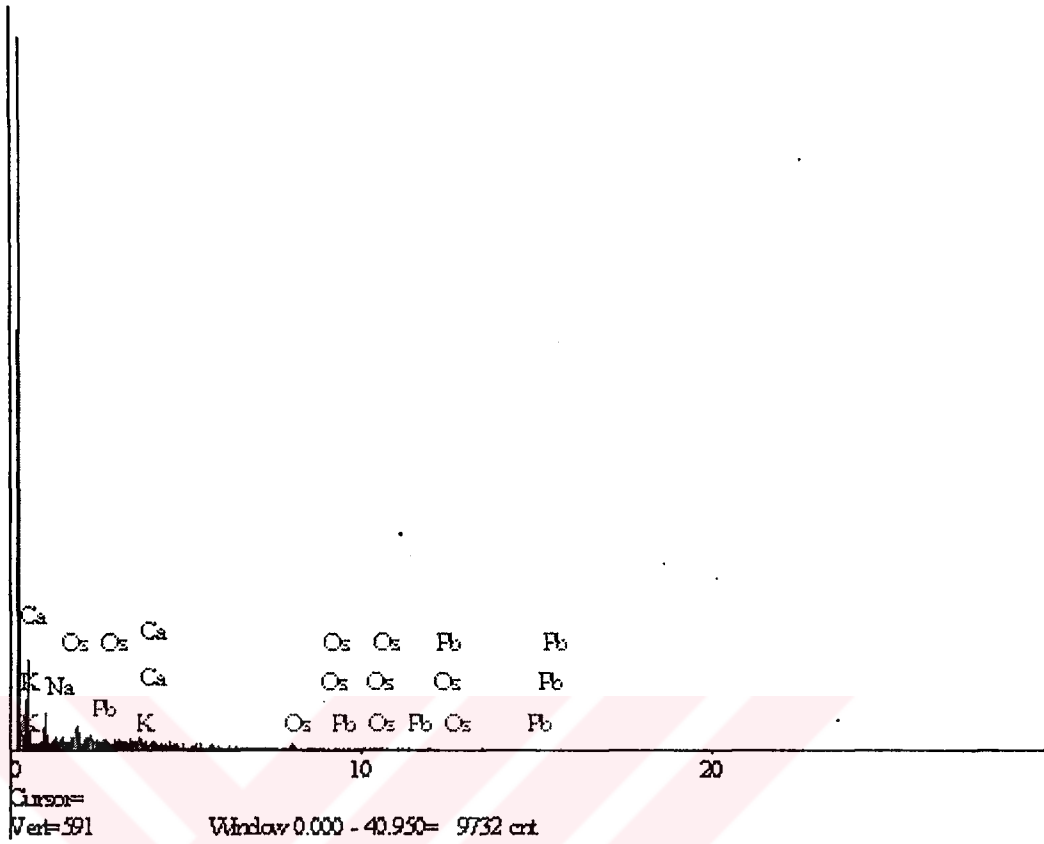
Elt.	Line	Intensity (c/s)	Conc	
Na	Ka	0.60	5.876	wt.%
K	Ka	0.12	1.474	wt.%
Ca	Ka	0.09	1.014	wt.%
Os	La	0.58	91.636	wt.%
			100.000	wt.%
				Total

kV
20.0

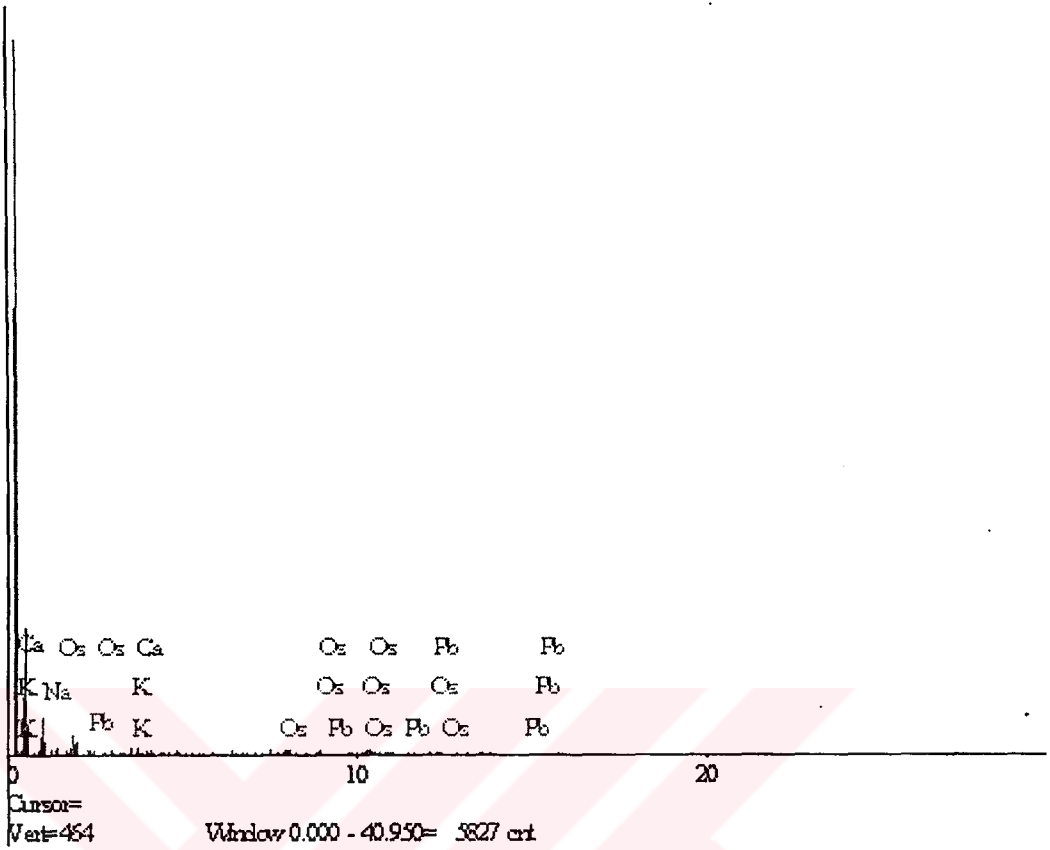


Elt.	Line	Intensity (c/s)	Conc	
Na	Ka	0.77	3.421	wt.%
K	Ka	1.29	5.461	wt.%
Ca	Ka	4.27	18.531	wt.%
Os	La	0.68	44.208	wt.%
Pb	La	0.25	28.379	wt.%
			100.000	wt.%
				Total

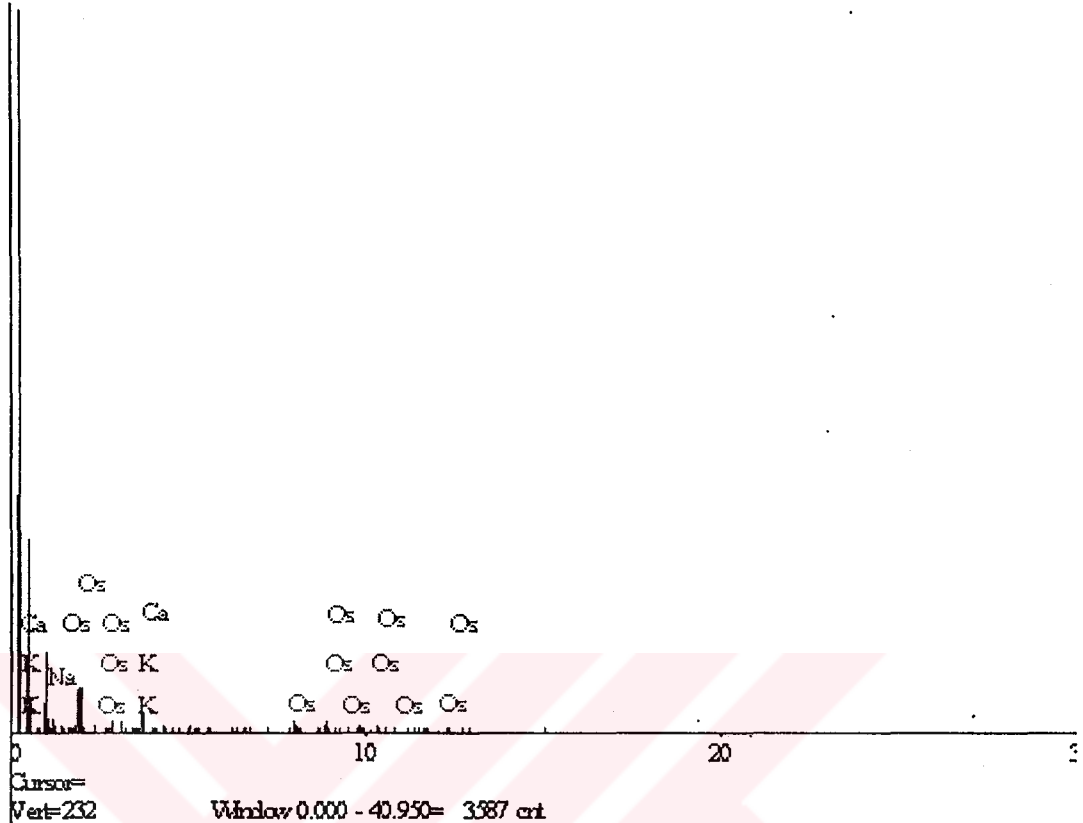
kV
20.0



Elt.	Line	Intensity (c/s)	Conc	
Na	Ka	4.35	27.750	wt.%
K	Ka	0.18	1.282	wt.%
Ca	Ka	1.06	7.609	wt.%
Os	La	0.40	44.853	wt.%
Pb	La	0.09	18.506	wt.%
			100.000	wt.%
				Total



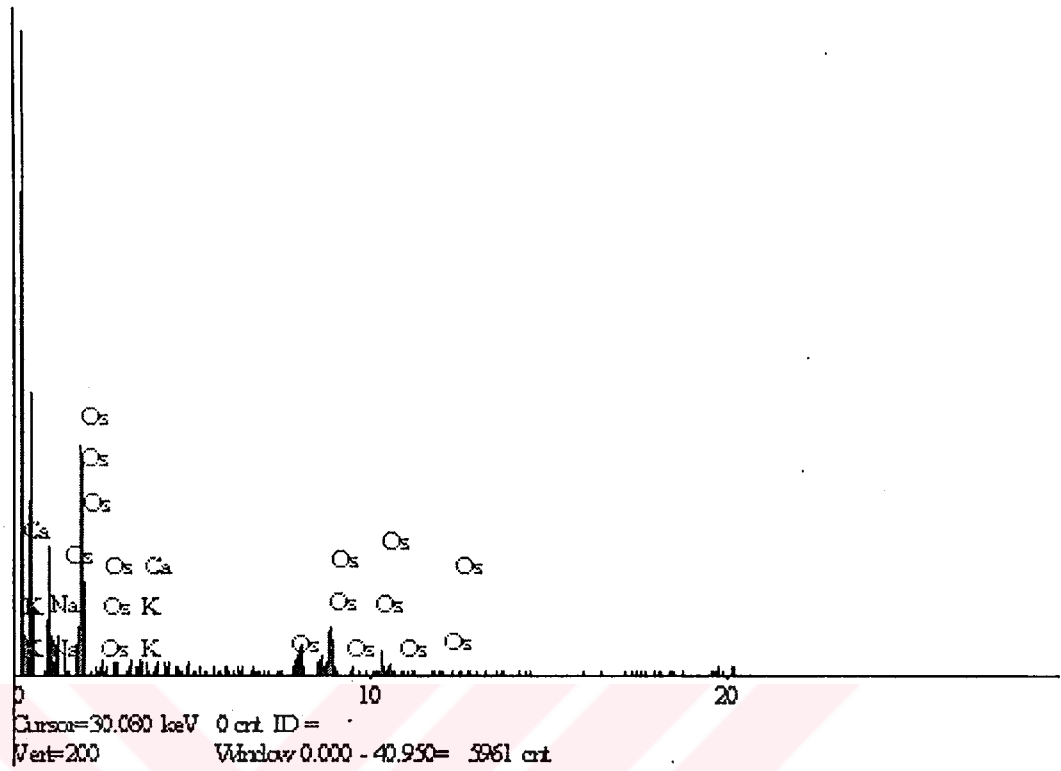
Elt.	Line	Intensity (c/s)	Conc	
Na	Ka	4.98	18.824	wt.%
K	Ka	0.32	1.357	wt.%
Ca	Ka	0.54	2.265	wt.%
Os	La	0.82	50.554	wt.%
Pb	La	0.25	26.999	wt.%
			100.000	wt.%
				Total



Elt.	Line	Intensity (c/s)	Conc	
Na	Ka	4.41	18.929	wt.%
K	Ka	0.18	0.892	wt.%
Ca	Ka	1.78	8.818	wt.%
Os	La	0.95	71.360	wt.%
			100.000	wt.%
				Total

kV

20.0

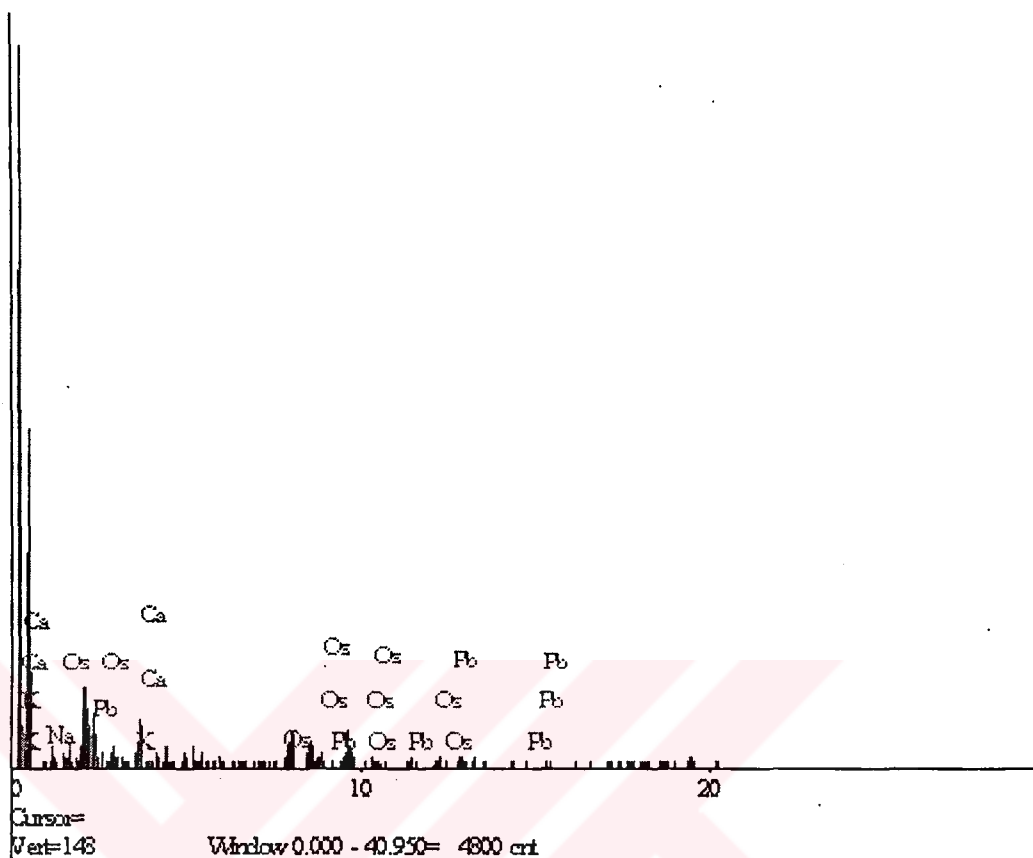


Cursor=30.060 keV 0 crt ID=
 Vert=200 Window 0.000 - 40.950= 5961 crt

Elt.	Line	Intensity (c/s)	Conc	
Na	Ka	7.09	24.570	wt.%
K	Ka	0.72	2.336	wt.%
Ca	Ka	0.86	2.531	wt.%
Os	La	3.49	70.563	wt.%
			100.000	wt.%
				Total

kV

30.0



Elt.	Line	Intensity (c/s)	Conc	
Na	Ka	0.37	4.939	wt.%
K	Ka	0.44	3.757	wt.%
Ca	Ka	2.87	23.827	wt.%
Os	La	0.70	41.225	wt.%
Pb	La	0.35	26.251	wt.%
			100.000	wt.%
				Total