



**BAZI DOMATES ALANLARINDAN
İNSEKTİSİDAIL *Bacillus thuringiensis*
İZALASYONU ve TANIMLANMASI**

HAYDAR GÖZÜDOK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Doç.Dr Necibe Canan USTA

AĞUSTOS - 2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI DOMATES ALANLARINDA İNSEKTİSİDAL
BACILLUS THURINGIENSIS İZALASYONU VE TANIMLANMASI

HAYDAR GÖZÜDOK

TOKAT
AĞOSTOS – 2019

Her hakkı saklıdır

Haydar GÖZÜDOK tarafından hazırlanan “ Bazı Domates Alanlarında İnsektisidal *Bacillus thuringiensis* İzolasyonu ve Tanımlanması “ adlı tez çalışmasının savunma sınavı 8 AĞUSTOS 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gazi Osmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

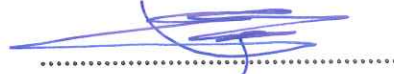
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç.Dr. Necibe Canan USTA
Gaziosmanpaşa Üniversitesi



Üye
Prof..Dr.Köksal Papuçcu
Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi



Üye
Dr. Öğr. Üyesi Filiz DEMİR
Gaziosmanpaşa Üniversitesi



ONAY
Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
09/09/2019



TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahribat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Haydar GÖZÜDOK

08.08.2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI DOMATES ALANLARINDA İNSEKTİSİDAL BACİLLUS THURİNGİENSİS İZALASYONU VE TANIMLANMASI

HAYDAR GÖZÜDOK

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ.DR NECİBE CANAN USTA)

Bu çalışmada; domates bitkisinde zarara neden olan domates güvesi zararları üzerine *Bacillus thuringiensis* bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu için Ankara ilinin farklı domates ekim alanlarından alınan toprak, zarar görmüş dal yaprak ve meyve (domates) örneklerinden gerçekleştirildi. Toplanan örneklerden Nutrient Agar büyüme ortamında sporlanma özelliği olan 11 Gram-pozitif bakteri izolasyonları yapıldı. Kolorimetrik ve mikroskopik identifikasyon neticesinde morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri (Gram +/-, hemoliz, indol, katalaz, oksidaz vb.) tanımlanarak *Bacillus* cinsine ait izolatlar belirlendi. Bakteri tanımlama sonunda 7 *Bt* izolatımızın domates ekim alanlarında güve ile biyolojik mücadelede kullanılabilir entomopatojen *Bacillus* türü izolatlar olabileceği gözlemlendi.

2019, 36 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Entomopatojen *Bacillus*, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), biyolojik mücadele, cry genler, insektisidal, izolasyon, pestisit

ABSTRACT

MASTER THESIS

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SOME INSECTICIDAL BACILLUS SPECIES FROM TOMATO HABITATS

HAYDAR GÖZÜDOK

**TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

DEPARTMENT OF MOLEKULER BIOLOGY

SUPERVISOR: ASST. PROF. DR NECİBE CANAN USTA

In this study; For the isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* bacteria on the damages of tomato moth which caused damage in tomato plant, it was carried out from damaged branch leaves and fruit (tomato) samples such as soil, moth and fly taken from different tomato planting areas of Ankara. 11 Gram-positive bacteria were isolated from the collected samples with nutrient agar growth characteristics. As a result of colorimetric and microscopic identification, morphological, physiological and biochemical properties (Gram +/-, hemolysis, indole, catalase, oxidase, etc.) were identified and isolates belonging to genus *Bacillus* were identified. At the end of bacterial identification, it was observed that our 7 Bt isolates could be entomopathogenic *Bacillus* species which can be used in biological control of moth in tomato cultivation areas.

2019, 36 PAGE

KEYWORDS: Entomopathogenic *Bacillus* sp., *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*), biological control, cry genes, , insecticidal, isolation, pesticide

ÖNSÖZ

Tez çalışma konumun seçimi, yürütme ve laboratuvar çalışmalarının her aşamasındaki yardımları ve yol göstericiliğiyle danışman hocam Doç. Dr. Necibe Canan USTA'ya çok teşekkür ederim.

HAYDAR GÖZÜDOK

08.08.2019

İçindekiler

ÖZET	I
ABSTRACT	II
ÖNSÖZ	III
SİMGELER ve KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
ÇİZELGELER LİSTESİ	VIII
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM	17
3.1 Materyal	17
3.1.1 Bakteri örnekleri	17
3.1.2 Kimyasallar ve çözeltiler	17
3.1.3 Cihazlar	17
3.2 Yöntem.....	18
3.2.1 Alınan örneklerden <i>bacillus</i> cinsine ait bakterilerin izolasyonu.....	18
3.2.2 Bakteri tanımlamalarında kullanılan biyokimyasal ve fizyolojik testler	18
3.2.3 <i>Bacillus</i> Türlerinin Kolorimetrik Tanımlaması	20
4. BULGULAR	21
4.1 Farklı Bölgelerden Alınan Örneklerden Bakteri İzolasyonu	21
4.1.1 İstasyon I.....	21
4.1.2 İstasyon II	21
4.2 İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik ve Mikroskopik Bulguları.....	25
4.3 İzole Edilen Bakterilerin Fizyolojik ve Biyokimyasal Aktivite Testleri	27
4.4 İzole Edilen Bakterilerin Kolorimetrik Tanımlamaları	29

5. TARTIŞMA ve SONUÇ	31
5.1 Tartışma	31
5.2 Sonuç	32
6.KAYNAKLAR	33
7.ÖZGEÇMİŞ	36



SİMGELER ve KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
AGE	Agaroz Jel Elektroforezi
AP	Amonyum per Sülfat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamit Tetra asetikasit
EtBr	Etidyum Bromür
ICP	İnsektisidal Kristal Protein
mRNA	Messenger (Haberci) Ribonükleik Asit
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Buyyon
PCR (PZR)	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
TCA	Triklor Asetik Asit
TEMED	Tetra Etilen Diamit
UV	Ultraviyole
VIP	Vejetatif İnsektisidal Potein

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> bakterisinin renkli görüntüsü (Anonim).....	4
Şekil 1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> faz kontrast mikroskop görüntüleri.....	4
Şekil 1.3. <i>B. Thuringiensis</i> Cry1Aa proteininin yapısı	6
Şekil 1.4.. Cry toksinlerinin etki mekanizması.....	10
Şekil 3.1. Kanlı agarda Beta hemoliz zonlu koloniler.....	22
Şekil 3.2. Gram boyamada kristal viyole aşamasındaki preparatlar.....	22
Şekil 3.3. <i>Bacillus</i> tür tanımlaması yapılacak izolatların VITEK 2 cihazına yüklenmesi.....	35

ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Protoksinlerin ve toksinlerin moleküler büyüklüğü, multijenik yapısı ve etkilediği konakçı grupları.....	8
Çizelge 4.1. İstasyon örneklemeleri.....	25
Çizelge 4.2. İstasyon örneklemeleri.....	26
Çizelge 4.3. İstasyon örneklemeleri.....	27
Çizelge 4.4. İstasyone örneklemeleri.....	27
Çizelge 4.4..Dört İstasyondan alınan örneklemeler sonunda elde edilen izolatlar...	28
Çizelge 4.5. İzolatlara ait makroskobik koloni formasyonlarıve mikroskobik hücre inceleme sonuçları.....	30
Çizelge 4.6. İzolatlara ait biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları.....	32
Çizelge 4.7 <i>Bacillus</i> türü izolatların VITEK 2 cihazı tanımlama sonuçları.....	34

1.GİRİŞ

Domates yetiştiriciliğini sınırlayan etmenler arasında bitki koruma sorunları önemli bir yere sahiptir. Bunlar içerisinde de zararlılar önemli ekonomik kayıplar oluşturmaktadır. Zararlılar içerisinde, 2009 yılında Türkiye'ye bulaşan ve sonrasında hızla yüksek popülasyonlara ulaşan domates güvesi [*Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae)] önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. Bu zararlılara karşı genelde kimyasal mücadele yöntemleri kullanılmaktadır. Kimyasalların çevre ve insan sağlığı üzerindeki yan etkisi ve zararlıların uzun vade de bu kimyasallara karşı direnç geliştirmesi gibi kaygıları da beraberinde getirmektedir. Bu kaygılardan dolayı doğal ortamla daha uyumlu, insan ve çevre sağlığı açısından daha güvenli mücadele tekniklerinin geliştirilmesi her geçen gün daha da önem kazanmaktadır. Bu bakımdan kimyasal mücadeleye alternatif birçok yöntem geliştirilmekte ve bunların optimizasyonuna yönelik ciddi gayretler sarf edilmektedir (Azizoğlu ve ark. 2012). Kimyasal mücadeleye alternatif biyopestisitler kullanılmaktadır. Biyopestisitler hayvanlar, bitkiler, bakteriler ve çeşitli mineraller gibi birçok doğal maddeden elde edilen ve zararlılarla mücadelede kullanılan ürünlerdir. Biyopestisitler; mikroorganizma, yararlı böcekler, yabancı ot patojenleri ve endopatojenik nematodların kullanılması esasına dayanan maddelerdir. Bunlar; patojen mantarlar bakteriler, virüsler ve protozoaları ihtiva ederler. Dünyada global çevre kirliliğinde ve biyoçeşitliliğin azalarak dengesinin bozunmasında sentetik/yarı sentetik kimyasal pestisitlerin önemi fark edildiğinden bugüne biyolojik/mikrobiyolojik pestisitlerin önemi artmıştır. Biyolojik kontrol, zararlı böcekler ile mücadele, kitle üremesi yapan veya yapma yeteneğinde olan böcek popülasyonlarının sayısının artmasını engellemek için gerçekleştirilen mücadele olarak bilinir. Bu amaçla uygulanan çeşitli mücadele yöntemleri vardır. Bu yöntemler; “Biyolojik/doğal mücadele kaynağını biyoloji ve Kimya gibi temel bilimlerden alan biyoteknolojik bir mücadele'dir. Biyolojik mücadele zararlı böcek popülasyonlarını ortadan kaldırmak yerine, zararlarını azaltmak için canlı organizmalar (mikroorganizmalar, predatörler, parazitoid böcekler, omurgasızlar, omurgalılar), feromonlar, böcek büyüme düzenleyicileri, bitkisel maddeler ve genetik kontrollerden faydalanılarak yapılan ekolojik ve ekonomik olmasının yanı sıra,

oluşabilen karşı dirence de genetik rekombinasyon yöntemleri ile yeni alternatif toksin geliştirilebilmektedir (Demirbağ ve ark., 2008; Moar ve ark., 2017; Berry ve ark., 2018).

Biyolojik kontrolde prokaryotik ve ökaryotik birçok mikroorganizma türü kullanılmaktadır. Bunlar; bakteriler, virüsler, protozoa türleri ve nematodlardır. Bakteriyel pestisitler arasında en çok kullanılan biyolojik kontrol ajanları ise toprak grubu bakterileridir. Bu toprak grubu içerisinde yer alan *Bacillus* cinsi bakteriler *Lepidoptera* (kelebekler), *Diptera* (sinekler, sivrisinekler) ve *Coleptera* (kınkanatlılar) takımına ait böcekleri hedef aldıkları için önemli bir yer teşkil ederler (Öztürk, 2007; Azizoğlu ve ark., 2012).

Bacillus'ların Taksonomisi

Bacillales takımı içinde *Bacillaceae* ailesi iki ana cinsi olan *Clostridium* ve *Bacillus* ile endospor oluşturan bakterilerin oldukça farklı bir taksonomik grubudur. *Clostridium* cinsi bakteriyle beraber gram pozitif ve anaerobik birkaç tür genellikle insan hastalıkları ile ilişkilidir: Botulizm (*Clostridium botulism*), tetanoz (*C. tetani*), gıda zehirlenmesi ve gazlı kangren (*C. perfringens*) bu hastalıklardan bazılarıdır. *Bacillus* cinsi gram pozitif, aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerden oluşur. *Bacillus mycoides* ve *Bacillus anthracis* hariç, *Bacillus* cinsi genellikle hareketlidir. Özel büyüme koşulları altında birkaç tür: *B. anthracis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, ve *B. megaterium* ayrıca bir koruyucu kapsül (poli D-glutamik asit) üretebilir (Turnbull ve ark., 1995). *Bacillus* türlerinin çoğunluğu *B. cereus* ve *B. subtilis* grupları içinde birkaç istisna dışında, nadiren insan hastalıkları ile ilişkilidir (Öztürk, 2007).

Bacillus thuringiensis ' lerin Genel Özellikleri ve Önemi

Şimdiye kadar 100' den daha fazla bakteri türü böcek patojeni olarak tanımlanmasına rağmen bunlar içerisinde *Bacillus* türleri kontrol ajanı olarak ticari bakımdan tercih edilmektedir. Bu bakteriler tarafından üretilen antibiyotik, enzim, toksinler ve bakteriyosinler gıda, ilaç, deterjan gibi birçok endüstriyel alanda kullanıldığı için büyük öneme sahiptirler. Kolay üretilebilmeleri sebebiyle dikkat çeken mikroorganizmalardır (Rosovitz ve ark., 1998). Ayrıca, spor oluşturma kabiliyetleri ve metabolizma

faaliyetlerinin çeşitliliği nedeniyle çevreye yayılmada önemli avantajlar sağlamaktadır (Wipat ve ark., 1999).

Gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* (Bt) ilk olarak 1901 yılında Ishiwata tarafından ipek böceği (*Bombyx mori*) larvalarında keşfedilmiş ve *Bacillus sotto* olarak adlandırılmıştır. Daha sonra 1911’de bir un güvesi (*Ephetia kuhniella*) popülasyonundan Berlier tarafından yeniden izole edilerek karakterize edilmiştir. Bu bakteriler sporülasyon esnasında insektisidal etki gösteren sınırlı konukçu profiline sahip, delta-endotoksin, Cry toksin veya insektisidal Cry proteinleri (ICP) olarak adlandırılan bazı kristalize yapılar oluşturmaktadır. 1900’lü yılların ilk çeyreğinde keşfedilen *Bt*’nin biyopestisit olarak kullanılmaya başlaması yaklaşık 50 yıl almış ve ilk defa 1961 yılında ABD’de gerçekleşmiştir (Krattiger 2004).

Bacillus thuringiensis spor oluşturm gram pozitif bir bakteridir.(Çomak türünden) Spor oluşumunda zar yapısında parasporal kristal üreten *Bacillus thuringiensis* bio kristal yapı sayesinde böceğin midesinde alfa endotoksin oluşturabilmektedir. Alfa endotoksin böceğin midesindeki proteazları aktifleştirerek kendi mide epitelyumunun parçalanmasına neden olmaktadır. *Bacillus thuringiensis* 1,2 / 0,3-22 mm genellikle hareketli ısıya dayanıklı aerop ortamda yaşayabilen bakteridir. 1916’da K. Aoki ve Y. Chigasaki, *B. thuringiensis*’in spor kültürlerindeki bir toksin yüzünden toksik aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır (Beegle ve Yamamoto, 1992).

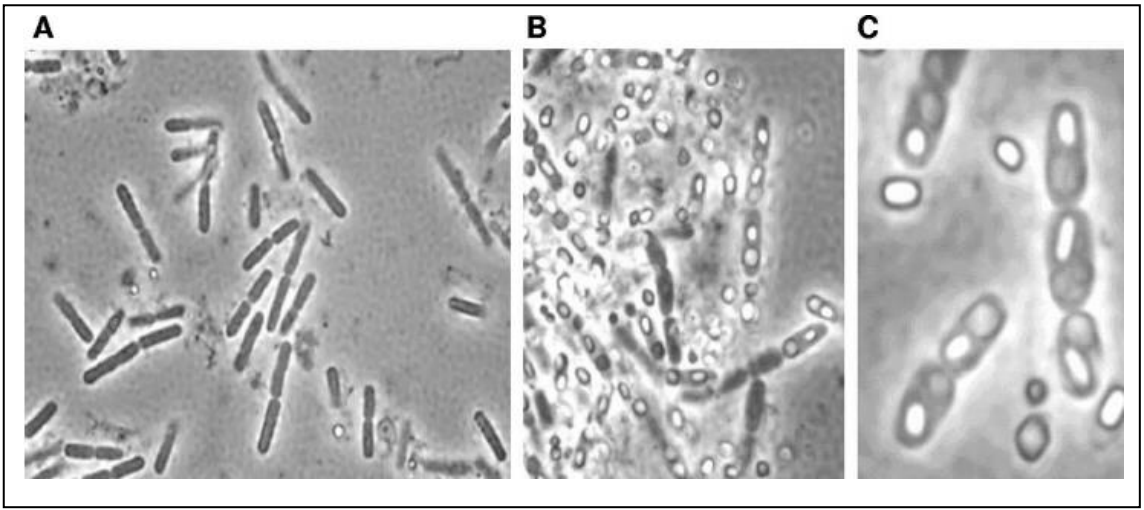
Bacillus thuringiensis böceğin orta bağırsağında kısa bir yarılanma ömrü olan delta endotoksinler üretir. Bu endotoksinler protein yapısında olup biyolojik olarak kolayca parçalanabilme özelliğindedir (Chattopadhyay ve ark., 2004).



Şekil 1.1. *Bacillus thuringiensis* bakterisinin renkli görüntüsü(Anonim)

Bacillus thuringiensis cinsi bakteri böceklere karşı dayanıklılık meydana getirmemektedir. Son yapılan çalışmalarda dayanıklılık süresi üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu özelliği ile kimyasal önlemlerden ve dayanıklılığı az olan pestisitlerden daha çok kullanım alanına sahiptir.

Bugün yaklaşık olarak 30 bitkide 90'dan fazla zararlı böceğe karşı *Bacillus thuringiensis* türleri kullanılmaktadır (Boggle and Yamamoto.,1992).



Şekil 1.2. *Bacillus thuringiensis* faz kontrast mikroskop görüntüleri, 48 saat (A) ve 7. gün (B ve C). (A ve B) x 400. (C) x 1,000. (Swiecicka, I., and P. De Vos. 2003)

Bacillus thuringiensis Türlerinin Genetik Yapısı

Bacillus thuringiensis suşları yaklaşık 2,4 ile 5,7 milyon baz çifti uzunluğunda genoma sahip olup 2-11 arası plazmit içermektedir. Plazmitlerin büyüklükleri 2 ile 272 kb arasında değişerek konjugasyon benzeri mekanizmalar ile bir *B. thuringiensis*'den diğerine kendiliğinden transfer yeteneğine sahiptir. Ayrıca plazmitler üzerinde insektisidal proteini kodlayan genler yer almaktadır (Sanahuja ve ark., 2011).

Bt'nin entomopatojenik aktivitesi, genomik DNA'sı ve plazmitleri üzerinde taşıdığı cry, cyt ve vip genlerinin sporlanma esnasında oluşturduğu Cry, Cyt ve Vip proteinlerinden kaynaklanmaktadır (Sanahuja ve ark., 2011).

Bacillus thuringiensis Habitatları

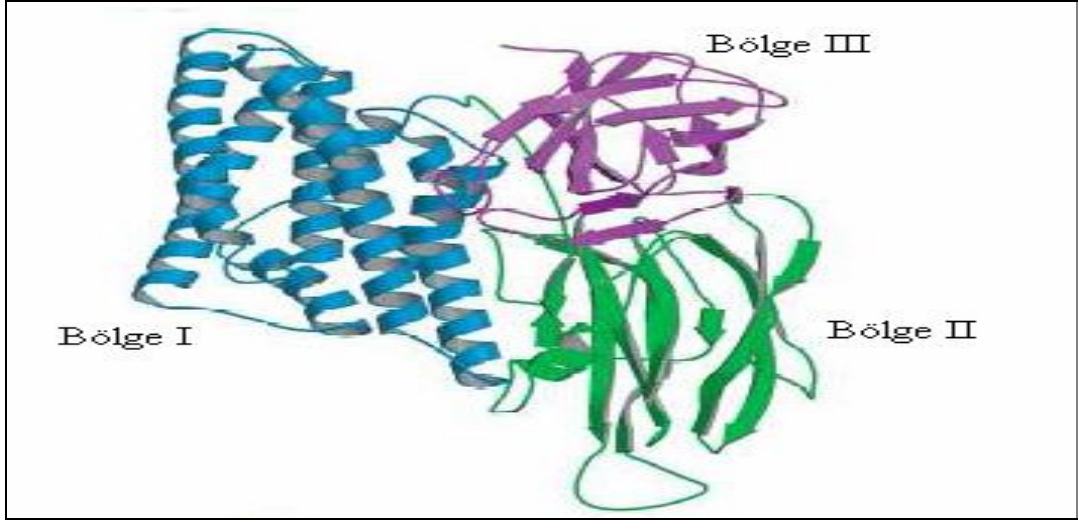
Bacillus thuringiensis suşları genellikle topraktan, böceklerden, depolanmış ürünlerden ve ağaçların yaprak meyve ve dallarından izole edilebilir. Çok sayıda *B. thuringiensis* suşu, ölü böceklerden izole edilmiş ve çoğu durumda da aynı böceğe karşı toksik aktivite göstermiştir. Bu organizmalar, konak böceklerin vücutları içinde çoğalırlar ve böcek larvası öldüğü zaman, ölü böcek vücutları kristal ve spor içerirler. *B. thuringiensis* sporları toprakta da bulunabilirler ancak vejetatif büyüme, bakteri besinleri kullanınca meydana gelir (Bozlağan, 2010).

Bacillus thuringiensis'lerin Alt Türlerinin Sınıflandırılması

B. thuringiensis'in ayırt edilmesinde konak seçiciliği, alt türleri belirleyen H-serovarları ve cry genleri kullanılmaktadır. Son yıllarda alt türleri karakterize etmek için DNA parmak izi yöntemi de kullanılmaktadır (Hansen ve ark., 1998). Kullanılan fenotipik yöntemlerden birisi olan H-serotiplenme, *B. thuringiensis* izolatlarının sınıflandırılmasında önemli bir yöntemdir. Bu yöntem Bonnefoi, A. ve Beguin, S. (1959) tarafından geliştirilmiş ve o zamandan beri kullanılmaktadır. 2004 verilerine göre flagella H-serovarlarına bakılarak yapılan sınıflandırmada 80'den fazla *B. thuringiensis* alttürü tanımlanmıştır. Serovarların mevcut listesi Paris'deki Pasteur Enstitüsü'nden (Unite des Bacteries Entomopathogenes, Institut Pasteur, Paris, Fransa) elde edilebilmektedir (Tatar, 2008).

Bacillus thuringiensis'in İnsektisidal Proteinlerinin Yapısı ve Sınıflandırılması

Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis'in δ -endotoksininin aktif kısmının kristal yapısı X-ışını kristalografisi ile belirlenmiştir (Kunitate, A ve ark., 1989). Cry1Aa aktif toksin üç yapısal bölgeye sahiptir. Birinci bölge hücre zarına giriş ve delik oluşumunda sorumludur. İkinci bölge ve üçüncü bölge reseptörlerin tanınması ve bağlanmadan sorumludur.



Şekil 1.3. *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa proteininin yapısı (Soberon ve ark., 2007).

Cry proteini üretebilen ilk *Bt* geni 1981 yılında Schnepf and Whiteley tarafından klonlandıktan sonra *Bt* geni taşıyan ilk transgenik bitkiler tütün ve domateste 1987 yılında bildirilmiştir. Her ne kadar tam uzunluka ve kesilmiş genler ile güçlü promotorların kullanımı ilk *Bt* geni taşıyan transgenik bitkilerde hedef böcekler karşı belli bir dayanıklılık sağlasa da protein ekspresyon seviyeleri çok düşük düzeylerde kalmıştır. Bunun başlıca nedeni *Bt* genlerinde yüksek olan Adenin/Timin oranının bitkilerde yüksek olan Guanin/Sitozin oranından farklı olmasından dolayı istenmeyen mRNA ikincil yapılarına ve polyadenilasyon sinyalleri olarak belirtilmiştir. İnsektisidal kristal proteinler (ICP) olarak da bilinen Cry proteinler birçok zararlı böcek takımı üzerinde etki göstermektedir. Bugüne kadar *Bt*'nin 700 cry geninin dizisi çıkarılmış ve aminoasit benzerliklerine göre 72 farklı Cry proteini (Cry1, Cry2,...Cry72) belirlenmiştir (Shu ve ark., 2013). Her bir Cry protein grubu, %40'dan daha az aminoasit benzerliğine sahiptir. Aynı protein grubu içinde yer alan ve büyük harflerle belirtilen gruplar (Cry1A, Cry1B vb.) en az %70 aminoasit benzerliği göstermektedir. Küçük harfle belirtilen gruplar ise (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ab vb.) %70'den fazla ancak %95'den daha az amino asit benzerliği göstermektedir (Shu ve ark., 2013). Cry2, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry4B, Cry4C, Cry4D, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19, Cry21, Cry24, Cyt1 ve Cyt2 grubu proteinler Diptera takımı üzerinde etki göstermektedir (Jouzani ve ark., 2008). Üzerinde en çok çalışılan Cry protein grupları ise Cry2, Cry4 ve Cry11'dir (Azizoğlu, 2014).

Bt endotoksin proteinleri, Höfte and Whitely (1989) tarafından yapısal özellikleri ve konukçu profillerine göre 4 farklı grupta kategorize edilmiştir. Buna göre, cryI genleri protoksin halinde 130 kDa büyüklüğündeki proteinler oluşturmakta ve genellikle Lepidoptera larvaları üzerinde, cryII genleri 70 kDa büyüklüğünde protein oluşturmakta Lepidoptera ve Diptera larvaları üzerinde, cryIII genleri yine 70 kDa büyüklüğünde protein oluşturmakta ve *Coloeptra* larvaları üzerinde etki göstermektedir. CryIV genleri ise 70-130 kDa büyüklüğünde protein oluşturmakta ve genellikle diptera larvaları üzerinde etki göstermektedir. Her geçen gün bunlara yapısal özellikleri ve konukçu profilleri farklı yeni gruplar eklenmiştir. Bravo et al. (1998)'a göre bugün 50 alt grupta 200'den fazla Cry proteini bulunmaktadır. Crickmore et al. (1998), Cry proteinlerini aminoasit sekans homolojilerine göre yeniden sınıflandırmışlardır. Eski ve yeni sınıflandırmaya ait bilgilere Crickmore et al. (1998) ve www.biols.susx.ac.uk/home/Neil-Crickmore/Bt/ internet adresinden ulaşılabilir. Yeni sınıflandırmaya göre romen rakamları değişmiştir ve her Cry toksini filogenetik ağaçtaki yerine göre 4 farklı hiyerarşik gruba göre sınıflandırılmıştır (ÖrneğinCry25Aa1)

Cry proteinleri üç yapısal bölgeye sahiptir. Birinci bölge 7 adet alfa sarmala (α -helix) sahip olup, toksinin hücre zarına girişinden sorumlu bölgedir. 2. bölge "Grek anahtarı" yapısında 3 adet antiparalel beta pilden (β -sheets) oluşmaktadır. 3. bölge ise jellyrol yapısında 2 adet antiparalel beta pilden oluşmaktadır. Bu iki bölge reseptörlerin tanınması ve bağlanmadan sorumludur (De Maagd et al. 2001). *Bt* delta-endotoksinleri protoksin halinde farklı büyüklüklerdeki proteinlerden oluşmaktadır. Kristalin proteinler veya protoksinler yüksek pH derecelerinde böcek ortabağırsağında çözündüğü zaman protoksinler parçalanır ve 65-70 kDa büyüklüğündeki aktif toksin formlarına dönüşür (130 kDa büyüklüğündeki protoksininin C- terminalinden yaklaşık 600 amino asit, N-terminalinden 30-50 aminoasit ayrılır böylece 65-70 kDa'luk toksin bölge açığa çıkar. Protoksinin C-terminal ucu ise daha çok kristalizasyondan sorumludur). Toksinin etki mekanizması, aktif haldeki toksinlerin bağırsak epitel hücrelerinde bulunan reseptör bölgelerine bağlanmasını takiben hücre zarı üzerinde delikler meydana getirmesi sonucu, bu hücrelerin patlaması ile oluşmaktadır (Demirbağ ve ark., 2008).

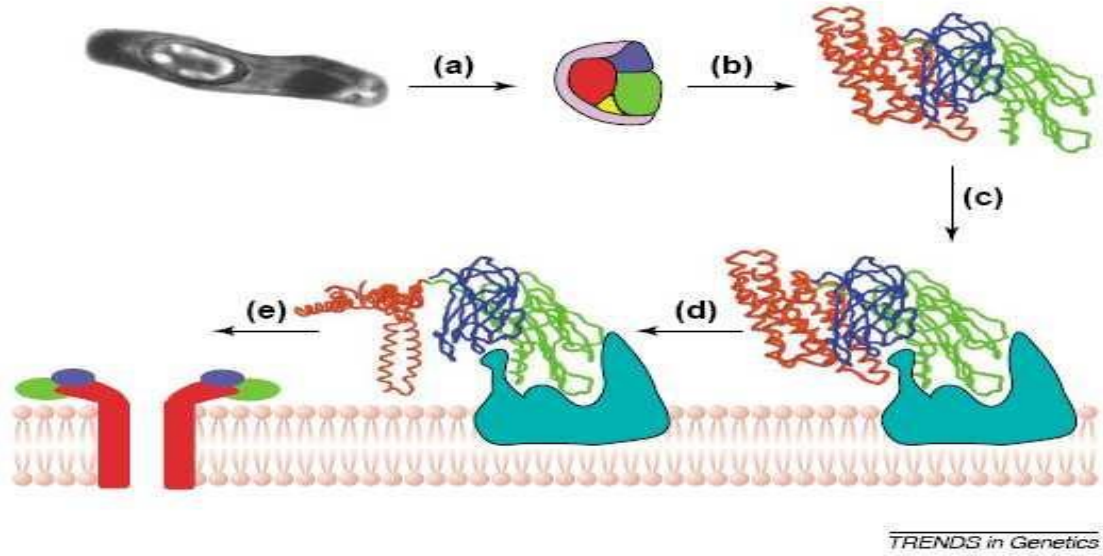
Çizelge 1.1. Protoksinlerin ve toksinlerin moleküler büyüklüğü, multijenik yapısı ve etkilediği konakçı grupları (Demirbağ ve ark., 2008).

Gen	Alt Sınıf	Etkilediği Konakçı Grupları	Protoksin (kDa)	Toksin (kDa)
<i>cry1</i>	1A(a)	Lepidoptera	130-160	60
	1A(b)	Lepidoptera/Diptera	130-160	60
	1A(c)	Lepidoptera	130-160	60
	1B	Lepidoptera	130-160	60
	1C	Lepidoptera	130-160	60
	1D	Lepidoptera	130-160	60
	1E	Lepidoptera	130-160	60
	1F	Lepidoptera	130-160	60
<i>cry2</i>	2A	Lepidoptera/Diptera	70-71	65
	2B	Lepidoptera	70-71	65
	2C	Lepidoptera	70-71	65
<i>cry3</i>	3A	Coleoptera	73	55
	3B	Coleoptera	73	55
	3C	Coleoptera	73	55
	3D	Coleoptera	73	55
<i>cry4</i>	4A	Diptera	134	46-48
	4B	Diptera	128	46-48
	4C	Diptera	78	?
	4D	Diptera	72	30
<i>Cyt</i>	A		27	?
<i>cry5</i>		Lepidoptera	81.2	?
		Coleoptera		

İnsektisidal Kristal Proteinin Hedef Böceklerdeki Etki Mekanizması

ICP'ler normal koşullar altında çözünmeden bulduklarından memeliler ve diğer yüksek organizma grupları için bir risk oluşturmazlar. Buna karşılık pH 9,5'de çözünebilir özellik taşımaları kristal proteinlerine yoğun bir insektisit özelliği kazandırmaktadır. δ -endotoksinler bağırsakta çözünerek protoksine dönüşürler. Sonra bağırsak enzimleri tarafından protoksinler parçalanarak aktif toksinler elde edilir. Aktif toksinler bağırsak epitelyum hücrelerinin reseptörlerine tutunarak böceğin bağırsak duvarını felce uğratar ve burayı tahrip ederek gözenekler oluştururlar. Böylece bağırsakta bulunan besin artıkları böcek vücuduna ve kana karışır. Zehirlenen böcek, toksin aktivitesi sebebiyle hemen ölebileceği gibi 2-3 gün içerisinde kan zehirlenmesi sonucu da ölebilir. *B. thuringiensis*'in larvalar üzerinde sebep olduğu belirtiler; yavaş hareket etme, beslenmeyi bırakma, sıvı halde dışkı çıkarma, kusma ve vücut içeriklerinin kahverengiden siyaha dönüşmesi olarak sayılabilir (Tatar, 2007).

Larvalar tarafından sindirimle alınan insektisidal kristal proteinler bağırsağın alkali ortamında çözülür ve proteazlar tarafından aktif hale getirilir. Aktif hale gelen proteinler daha küçük yapıda toksinlere dönüşür. Toksinler orta bağırsak silindirik epitel hücrelerinin zarlarında bulunan özel reseptörlere bağlanırlar. Epitel hücre zarlarında porlar ve iyon kanalları oluşturularak hücrelerin iyon ve su dengesinin değişmesine neden olurlar. Toksinin yüksek dozlarda uygulanması sonucunda orta bağırsak epiteli parçalanır ve hızlı bir ölüm gerçekleşir. Daha düşük dozlarda ya da daha az duyarlı böceklerde, bağırsak hücrelerinin zarar görmesi normal bağırsak salgısının durmasında etkilidir ve bu olay da sporların açılmasına izin verir. Vejetatif hücreler daha sonra içeri girerek septisemiye neden olur ve ölüm gerçekleşir (Öztürk, 2007).



Şekil 1.4. Cry toksinlerinin etki mekanizması (De Maagd et al. 2001).

- a) Cry toksinleri böcek tarafından alınır ve kristaller bağırsak sıvısında çözünür,
- b) mor ile gösterilen C-terminal ve sarı ile gösterilen N-terminal bölgenin bir kısmı bağırsak proteazları tarafından kesilir,
- c) aktif toksin epitel hücreleri üzerinde bulunan reseptörlere bağlanır,
- d) 1. bölgenin yapısında bulunan 2 heliks saç tokası epitel hücrelerine yerleşir,
- e) toksin hücre zarında delikler oluşturur ancak delik oluşumunun mekanizması tam olarak açıklanamamıştır.

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* uygulanmış sivrisinek larvaları genel olarak işlemiden sonraki bir saat içinde beslenmeyi durdururlar, iki saate kadar aktivite azalır ve genel sindirimden sonra altı saat içinde felç olayı gerçekleşir. Diğer *B. thuringiensis* izolatlarının çoğu *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'in ki kadar hızlı bir etkiye sahip değildir. Beslenmenin durması *B. thuringiensis* sporlarının ve toksinlerinin sindiriminden sonra oluşabilir. Bununla birlikte kınkanatlı böceklerde ve tırtıllarda ölüm yalnızca genç larvalar için hızlıdır (1–2 gün) ve daha büyük larvalar için bir haftadan daha uzun zaman alır (Glare ve O'Callaghan, 2000).

Sporulasyon süresi boyunca, yüksek miktarda insektisidal parasporal kristal protein üretme yeteneğinde olan *B. thuringiensis* (Schnepf ve ark., 1998), zararlı

populasyonlarını önemli ölçüde azaltarak doğal dengenin bozulmasını engellemektedir. Sporlanan hücrede bulunan bu parasporal kristal proteinler *B. thuringiensis*'in biyopestisit ve hedef zararlı için olan özgülüğünden sorumludur (Rie ve ark., 1990).

Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı domates tarlarında güve zararlısına karşı insektisidal *Bacillus thuringiensis* türleri bulabilmek adına, Ankara ilinde farklı istasyonlardan (domates tarlalarından; Çubuk Eğriekin köyü, Ankara Kazan Güvençköprü, Ankara Kazan Kumpınar ve Ankara Kazan Kumpınar mahallesi Güvençköprü Mevkiği) alınan toprak, meyve, dal ve yaprak örneklerinden *Bacillus turingiensis* ait türlerin izolasyonlarını gerçekleştirme sonrasında insektisidal özellikte olanları belirlemektir. Bu amaçla, izolasyon sonrasında morfolojik (koloni, hemoliz), mikroskopik (endospor, basil, gram boyama), fizyolojik (hareket, aerob) ve biyokimyasal (katalaz, oksidaz, indol, kapsül) özellikleri belirlenen *Bacillus* türlerine ait izolatlarda kolorimetrik olarak tür tanımlamaları yapılmıştır. Tür tanımlamaları yapılan *Bacillus* türlerine ait izolatlarda moleküler çalışmalar (PCR, AGE) sonucunda endotoksin ve pestisit geni (cry gen) varlığını tespit etmektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bacillus thuringiensis ilk kez Japon bakteriyolog Shigetane Ishiwata tarafından 1901’ de ipekböceği larvasından izole edilmiş ve bilimsel tanımlaması Almanya’da 1911 yılında Emile Berliner tarafından yapılmıştır. *B. thuringiensis*’in spor kültürlerindeki bir toksin madde yüzünden toksik etkiye sebep olduğu tespit edilmiştir (Beegle ve Yamamoto, 1992).

Çin’de mikrobiyal pestisitleri ve parazitöitleri entegre ederek depolanmış tahıllarda zararlı *Plodia interpunctella* Hübner (*Lepidoptera: Pyralidae*) mücadelesi için laboratuvar testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testlerde *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) ile infekteli larva ve parazitöit *Habrobracon hebetor* Say (*Hymenoptera: Braconidae*) arasındaki etkileşimlerin *Plodia interpunctella*’ye karşı araştırılmıştır. *Bt* veya *H. hebetor* tek başına %41.67 ve %35.35 larval ölüme neden olmaktadır. *Bt*-parazitöit kombine edildiğinde *P. interpunctella*’nın ölümünde önemli bir artış (% 86) gözlenmiştir. *H. hebetor*’un gelişimi *Bt*’ye olan duyarlılığa bağlıdır (Akinkürolere ve ark. 2009).

1980’li yılların sonuna kadar *B. thuringiensis* ’in uzun süredir pestisit amaçlı kullanılmasına rağmen böceklerde dayanıklılık meydana getirmediği düşünülmektedir. Sonrasında bu bakterinin alttürlerinden yapılmış insektisitlerin kullanımı her geçen gün artmıştır. 1990’lı yılların başlarında en geniş çapta kullanılan ve mikrobiyal insektisit olan *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*’den elde edilen spor- protein kristallerinden oluşan bir karışımın lepidopterler üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Beegle ve Yamamoto, 1992).

Bacillus cinsi bakterilerin insektisit olarak kullanımında bir çok avantaj ön plana çıkmaktadır. En önemli olan faktör ise yeni *Bacillus* izolatları elde edilerek insektisidal direncin çeşitli rekombinasyon yöntemleriyle birkaç toksin proteinle birlikte tek toksin olarak elde edilip zararlıya karşı kullanılabilmesidir. Ayrıca *Bacillus thuringiensis* ürünleri, hedef organizmada daha az bir dirence neden olarak ortamda birikip toksik etki oluşturmadıkları için yarılanma ömürleri kısadır. Sadece özgül hedef böcek grupları üzerine etkilidir. Hedef olmayan ve duyarlı olmayan organizmalar üzerinde etkisini

göstermez. *B. thuringiensis* insanda patojen olmadığı için zarar vermez. Kullanılmasının en önemli sebebi çevreyi kirletmeyip ve kullanımının güvenli olması nedeniyle çevresel dengeyi bozmayan alternatif bir mücadele yöntemidir. (Chattopadhyay ve ark., 2004).

B. thuringiensis subsp. *kurstaki*'nin toksin sentezleyen genleri, doğada sadece Bermuda çiminin ksileminde bulunan *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*'e nakledilerek rekombinant *C. xyli* elde edilmiştir. Bu bakterilerin mısır bitkisine inokülasyonu sonucu bitkinin ksilemdeki özsuynunun mililitresinde 1×10^{10} toksin sentezleyen bakteri bulunmuştur. Ancak hedef alınan Mısır kurdu (*Ostrinia nubilalis*)'nun etkili bir kontrolü için bu düzeyin 10 katına gerek olduğu bildirilmiştir (Beegle ve Yamamoto, 1992). *Bacillus* cinsi bakterilerin pestisit kullanımındaki önemli avantajlarından biri uzun süre içinde de olsa direnç kazanıldığında, yeni türler bulunabilmesinin yanı sıra, toksin genlerini birbiri ile rekombinant formda laboratuvarında elde edilebilmesidir.

Domates ve tütün bitkilerine *B. thuringiensis*'in toksin sentezleyen genleri transfer edilerek bitkisel dokularında toksin sentezlenmesi sağlanmıştır (Vaeck ve ark., 1987). Sonraki yıllarda ise yapılan çalışmalarda bu genler lahana, pamuk ve soya fasulyesine de aktarılmışlardır (Beegle ve Yamamoto, 1992).

Türkiye'de biyolojik mücadelede kullanılan en önemli ve güncel örnek *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) olup, yapılan bir çalışmada bağ, meyve, narenciye, depo zararlılarına karşı *B. thuringiensis* bakterisinden hazırlanan preparatlar kullanılmıştır (Demirbağ ve Gündüz, 1998).

Bazı üretici firmalar *B. thuringiensis*'te doğal olarak bulunan plazmit değişim sistemini kullanarak yeni gen kombinasyonları içeren izolatlar meydana getirmişlerdir. Bunlardan Condor adı verilen üründe iki ayrı izolatın etkinliği bir preparatta toplanarak kır tırtılı (*L. dispar*)'na karşı normal bir preparattan 7.5 kat daha yüksek etkinlik sağlanmıştır. Foil adı verilen preparatta ise patatesteki lepidopterler ve coleopterlere ayrı ayrı etkili olan varyeteler aynı yöntemle bir üründe toplanmıştır (Beegle ve Yamamoto, 1992).

Diğer bir üretici firma ise biyolojik olarak kapsüllenmiş iki ürün elde etmiştir. Bunlardan MVP lepidopterlere, M-Trak ise coleopterlere karşı geliştirilmiştir. Bu

yöntemde *Pseudomonas fluorescens*'in patojen olmayan bir ırkına lepidopter ve coleopterlere karşı etkili *B. thuringiensis* toksin genleri ayrı ayrı transfer edilerek, bakteri içinde toksin üretimini takiben *P. fluorescens* hücreleri sıcaklık veya kimyasal maddelerle öldürülmüştür. Böylece bu bakteri kristal toksinlere bir kapsül vazifesi görerek diğer *B. thuringiensis* preparatlarına oranla iki kat daha uzun süre kalıcılığa sahip olduğu saptanmıştır (Beegle ve Yamamoto, 1992).

En önemli fındık zararlılarından biri olan *Melolontha melolontha*'nın (adi mayıs böceği) bakteriyel florası ve virüs infeksiyonunun araştırıldığı çalışmada ise kullanılan insektisitlerin olumsuz etkilerinden dolayı biyolojik mücadele ajanlarının geliştirilmesi amaçlanarak bakteriyel ve viral izolatın insektisidal etkileri test edilmiştir. Bakteriyel izolatların *Pseudomonas* sp., *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus sphaericus*, *Acinetobacter* sp. ve *Bacillus weihenstephanensis* olduğu saptanmıştır. Bakteriyel izolatlar içinde en yüksek etkinin *B. weihenstephanensis* ve *B. thuringiensis* tarafından oluşturulduğu (%80) bulunmuştur ve *M. melolontha*'nın biyolojik mücadelesinde kontrol ajanı olarak kullanılabilmesi ortaya koyulmuştur (Sezen ve ark., 2007).

Entomopatojen bakteri olan *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) ürünleri yıllardır Batı Nil Virüs'ünün başlıca vektörü olan *Culex pipiens* (*Diptera: Culicidae*) kaynaklı hastalıkların mücadelesinde kimyasal pestisit kullanımının azaltılması için etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Azizoğlu yaptığı bir çalışmada 14 farklı yerel *Bt* izolatının hastalıklı *C. pipiens* larvaları üzerindeki biyolojik mücadele potansiyelini araştırmak amacıyla dipteralara özgü Cry gen taşıyan 14 farklı *Bt* izolatının spor-kristal protein karışımı (500 µg ml⁻¹) *C. pipiens*'in son dönem larvalarına uygulanmıştır. Uygulanan izolatlar arasında *BtSY50.4* olarak adlandırılan spor-kristal protein karışımının % 80 larval ölüme sebep olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak *BtSY50.4* izolatının *C. pipiens* üzerindeki etkinliği göz önüne alındığında biyolojik mücadele açısından önemli olduğu belirtilmiştir (Azizoğlu., 2014).

Topraktan doğal *Bacillus thuringiensis* suşlarının izolasyonu, karakterizasyonu ve *Ephestia kuehniella* Zeller (*Lepidoptera: Pyralidae*) larvalarına karşı biyolojik aktivitesinin araştırıldığı çalışmada; 5 doğal *Bacillus thuringiensis* izolatları toprak

örneklerinden izole edilerek *E. kuehniella* larvaları için patojen olan F21, F16 ve F19 doğal *Bt* izolatları yaklaşık olarak 130 kDa ve 65 kDa ağırlığında protein bantları oluşturan küresel, baklava dilimli ve yuvarlak yapılı inklüzyonlar üretmekte olduğu görülmüş. LC₅₀ değerleri sırasıyla 1.08, 1.48 ve 2.17 olarak belirlenmiştir. Bulgularda F21 ve F19 izolatları sırasıyla %83 ve %80 ölüm oranları ile *E. kuehniella* larvalarına karşı oldukça yüksek bir toksik etki gösterdiği bulunmuştur. Sonuç olarak *Bacillus thuringiensis* izolatları F21 ve F19 yeni bir insektisit olarak biyopestisitlerin üretimi için kullanılabilirliği önerilmiştir (Öztürk ve ark., 2008).

Fındık zararlısı olan *Xyleborus dispar*'dan izole edilmiş *Bacillus thuringiensis* bakterisinden (BtXd3) elde edilen cry3Aa geninin farklı bir konak olan *Escherichia coli*'ye klonlanması, karakterize edilmesi, ekspresyonu ve insektisidal aktivite testi gerçekleştirilmiştir. Bu bakteriye ait Cry3Aa proteininin literatürdeki *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Morrisoni)'in sahip olduğu Cry3Aa2, Cry3Aa3, Cry3Aa5 ve Cry3Aa6 ile %100 benzer olduğu belirlenmiştir. Cry3Aa geni ekspresyon vektörü olan pET-28a(+)'ya klonlanarak ekspresyon vektöründe ekspres edilen proteinin jel üzerinde cry3Aa genine ait 73 kDa'luk bandı gözlenmiştir. Sonuç olarak Cry3Aa δ -endotoksininin *Alphitobius diaperinus* (coleoptera) larvalarına karşı insektisidal etkilerinin varlığı belirlenmiş olup *E. coli* BL21(DE3)'de ekspres edilen rekombinant proteinin larvalar üzerinde *Bacillus thuringiensis*'teki spor-kristal karışımından daha az etkili olduğu tespit edilmiştir (Tatar, 2008).

Domates güvesi (*Tuta absoluta*) mücadelesinde *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*'nin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada *Bt* (100 g/hl) ve Thiodicarb (60 g/hl) uygulaması yapılmıştır. Bulaşık yaprakçık oranlarına göre *T. absoluta* zararının önlenmesinde *Bt* ortalama %91.92 ve Thiodicarb ise ortalama %90.58 etkili bulunmuştur. Domates yetiştiriciliğinde *T. absoluta* zararının önlenmesinde insan ve çevre sağlığı yönünden güvenli bir biyopestisit olarak *Bt*'nin kullanılabilirliği vurgulanmıştır (Doğanlar ve ark., 2015).

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki*'nin salkım güvesi (*Lobesia botrana*) ve predatörlerine karşı etkilerinin araştırıldığı çalışmada bağlarda faydalı böceklerin popülasyon değişimine bakılmıştır. Bunun sonucunda; arazi çalışmalarında 100

salkımdaki bulaşıklık oranına bakıldığında *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* kullanılan bağ alanında bulaşıklık oranının kontrol alanına göre daha fazla olduğu bu nedenle uygulanan *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* dozunun 100 lt'ye 75g değil de 100g kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Faydalı tür sayısı oldukça az ve popülasyon yoğunluğu en fazla olan predatörler *Chrysoperla carnea* ve *Coccinella septempunctata* olmuştur (Aslan ,2009).

Yapılan çalışmada, *Bacillus thuringiensis* esaslı biyopestisitler ile Azadiractin esaslı biyopestisitlerin tek başlarına ve karışım halinde kullanımlarının *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) üzerine etkisi karşılaştırılmıştır. 5. döneme geçmiş larvalarına biyopestisit olarak da *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* ve *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, yağ bazlı neem ve neem esaslı biyopestisitler kullanılmıştır. Biyopestisitler, 50 ppm ve 100 ppm dozlarında tek başlarına ve yarım dozda karışımlar halinde besin yoluyla uygulanmıştır. Biyopestisitlerin karışım halinde uygulandığı bireylerde tek başlarına uyguladıklarına göre beslenmenin dolayısıyla da gelişmenin ilk günden itibaren yavaşladığı ve erken ölümlerin gerçekleştiği ortaya konulmuştur. En düşük etki *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* etken maddeli Delfin biyopestisitinin tek başına uygulandığı bireylerde gözlenirken, kontrol grubunu oluşturan bireyler ortalama 410 mg'a kadar ulaşmıştır. En yüksek öldürücü etki ise uygulamadan sonraki 7 ve 9 gün sonra yine biyopestisit karışım halinde denedikleri gruplardan elde edilmiştir (Turanlı ve ark., 2012).

Ülkemizde yeni yeni kullanılan entomopatojenlerin bal arıları üzerindeki etkisinin derlendiği makalede *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)'in, ticari süspansiyonlarının ve Cry proteinlerinin bal arıları üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak herhangi bir etkisinin olmadığı belirtilerek *Bt*'nin PS86Q3 suşu ile yapılan çalışmada, iki yaprak arısının bu suşa duyarlı olduğu fakat bal arıları üzerinde zararlı etkilerinin olmadığı bildirilmiştir (Uzuner ve ark., 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri örnekleri

Bu çalışmada kullanılan bakterilerin izolasyonu Ankara ilinin farklı domates ekim alanlarından alınan toprak, güve ve sinek gibi zarar görmüş dal yaprak ve meyve (domates) örneklerinden gerçekleştirildi. Toprak örnekleri toprağın üst yüzeyi temizlendikten sonra steril spatula ile yaklaşık 5-10 cm derinlikten yaklaşık 10 gram alınan toplam 11 adet örnek steril plastik poşetlere konularak +4°C'de laboratuvarında *Bacillus* izolasyonları için saklanmıştır (Kim ve ark., 1998).

3.1.2 Kimyasallar ve çözeltiler

Bakteri izolasyonlarında;

-Nutrient Broth (NB); Gecelik bakteri kültürlerinde distile su içerisinde çözdürülerek kullanıldı.

-Nutrient Agar (NA): Karışık ortamlardan bakteri izolasyonu aşamasında seri seyreltmeyle morfolojik görüntüleri amaçlı ve izolatların stoklanmasında kullanıldı.

-NYSM (Nutrient Yeast Salt Medium) Agar: Bakteri izolatlarının sporlanma gözlemleri amaçlı kullanıldı.

-Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponu (x50) (pH 8.0): 242 gram tris, 57.1 ml glisial asetik asit, 0.5 M 100 ml EDTA (pH 8.0), distile suda çözülerek 1 litreye tamamlandı.

-STE tamponu: 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)

-Lizozim çözeltisi: 10 mg/ml olacak şekilde Tris-EDTA tamponunda hazırlandı.

-Boyama tamponu: 300 ml stok boya çözeltisi, 35 ml 10 N (w/v) KOH, 25 ml %100 (w/v) TCA karıştırılarak hazırlandı.

3.1.3 Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

- Mikroskop (Olimpia ve Leica)

- İnkübatör / Etüv (Nüve)

- Güvenlik kabini (ESCO)

- Ultraviyole (UV) cihazı
- Otoklav (Nüve)
- Bakteri tanımlama cihazı (VITEC2 Compact - BIOMERIUX)
- McFarland (McF) ölçüm cihazı (Densicheck plus - BIOMERIUX)
- Derin dondurucu ve buzdolabı (Arçelik)
- Santrifüj (Nüve - NF120)
- Karıştırıcı / vortex (Nüve)

3.2 Yöntem

3.2.1 Alınan örneklerden *Bacillus* cinsine ait bakterilerin izolasyonu

Bacillus cinsine ait bakteri türlerinin izolasyonu için nutrient agar (NA) besi yeri kullanıldı. Ankara iline ait 11 farklı lokasyonlardan alınan örneklerin 1 gramı, içinde 9 ml steril serum fizyolojik çözeltilisi bulunan deney tüplerine aktarıldı. Vortekste 1 dk karıştırıldı. Örnekler su banyosunda 100 °C' de 20 dk tutularak vejetatif bakteri formlarının ölmesi ve ortamda bakterilerin sporlu formlarının kalması sağlandı. Örneklerden 10⁻¹' den 10⁻⁷'ye kadar seri seyreltmeler hazırlanarak, 10⁻³ seyreltmeden itibaren NA besi yerine yayma plak yöntemiyle 0,1 ml ekimler yapıldı ve 30°C'de 5 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda *Bacillus* morfolojisine benzeyen (büyük, beyaz, opak vb.) tek koloniler seçildi. Seçilen bu koloniler NA besi yerine tek koloni ekim yöntemi ile ekilerek saf kültürler elde edildi. NB sıvı besi yerine aktarıldı. Örnekler kullanılabildiği kadar buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi (Kim ve ark., 1998).

3.2.2 Bakteri tanımlamalarında kullanılan biyokimyasal ve fizyolojik testler

Elde edilen çubuksu bakteri izolatların tanımlaması için; hemoliz, hareket tespiti, indol, katalaz, oksidaz testleri ile spor ve gram boyamaları yapıldı.

Hemoliz Tayini

Bakterilerin hemoliz yeteneği kanlı agar besi yeri kullanılarak test edildi. Hemoliz testi, 18 – 24 saatlik NB ortamındaki bakteri kültüründen hazır kanlı agar büyüme petrilere tek koloni ekim yöntemi öze ile uygulandı ve optimum sıcaklık (36°C)'ta 24-72 saat süre ile inkübe edildi. Besi yerinde gelişen koloniler, etrafında oluşturduğu hemoliz

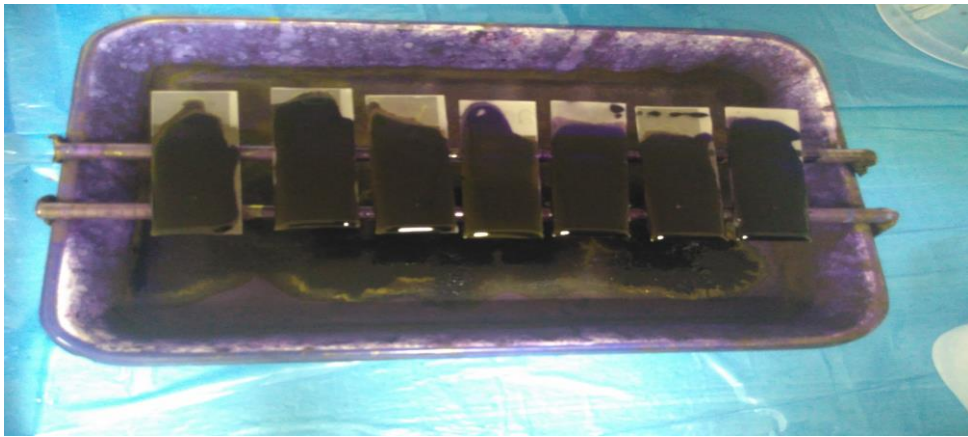
zonu yönünden her gün incelenerek oluşan zonlar Beta hemoliz veya Alfa hemoliz olarak değerlendirildi.



Şekil 3.1. Kanlı agarda Beta hemoliz zonlu koloniler

Gram Boyama

Temiz lamalar üzerinde 1 damla steril fizyolojik su ile kültürden alınan koloni yayıldı hava da kurutulma sonrasında preparat 1-2 kez bek alevinden geçirilerek sabitlemesi (fiksasyon) yapıldı. Hazırlanmış preparatın üzerine tüm çözeltileri hazır ticari kitleler kullanılarak gram boyama (RTA) prosedürüne göre; lugol çözeltisinde (1 dk) beklemenin ardından distile su ile yıkandı. Preparatın üzerine %96'lık etil alkol damlatılıp (30 sn) bekleme sonrasında distile su ile yıkandı. Son olarak karşıt boya sulu fuksin damlatılarak (40 sn), kurumaya bırakıldı. Isık mikroskopunda incelendi. Pembe renkli bakteriler Gram negative (G^-) olarak değerlendirildi. Mor/koyu mavi renkli bakteriler Gram pozitif (G^+) olup çubuk veya kokobasil şeklindekiler ayırt edildi.



Şekil 3.2. Gram boyamada kristal aşamasındaki preparatlar

Hareket Tespiti

Temiz lam üzerine bir damla serum fizyolojik damlatılıp üzerine bir miktar bakteri koyuldu. Lamel ile kapatılarak çomak şekilli bakterilerin ışık ve faz-kontrast mikroskop incelemeleri ile hareketleri incelendi.

Spor Boyama

Sporların gözlenmesi için Schaffer-Fulton yöntemi uygulandı. Temiz bir lam üzerine 1 damla steril fizyolojik tuz çözeltisi damlatıp buna katı büyüme ortamındaki izolat bakteri kolonisinden özeye alınan örnek lamel büyüklüğünde alana yayıldı. Kuruması için bir süre beklendi ve bunzen alevinden 3- 5 kez geçirilerek üzeri lamel büyüklüğündeki kurutma kâğıdı eklendi ve malachit yeşili solusyonu, ısı aracılığıyla (bunzen alevinde tutularak dökülüp preparat 5 dk. bakterilere) uygulandı. Karşıt boyama için safranin ile 15 sn boyanması sağlandı ve su ile yıkanarak kurutma kâğıdı ile kurutuldu ve mikroskopda (faz kontrast mikroskop,100x) incelendi. Sporlar yeşil cubuksu hücreler pembe/kırmızı olarak gözlemlendi.

İndol Testi

NA'dan öze ile alınan bakteri koloni örneği steril whatman 1 kâğıdı üzerine sürülerek üzerine kovac's ayracı damlatıldı. Kırmızı renk oluşması indol pozitif olarak değerlendirilerek kaydedildi. (Bilgehan, 1995).

Katalaz Testi

İncelenecek bioizolat bakteri örneği temiz bir lam üzerine öze ile uygulanıp üzerine 1-damla H₂O₂ damlatılma sonrası oluşan hava kabarcıklarının tekstürü gözlenerek Katalaz pozitif/negative olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

3.2.3 *Bacillus* türlerinin kolorimetrik tanımlaması

Elde edilen cubuksu bakteriyel izolatların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testler sonrasında *Bacillus* cinsine ait olduğu öngörülen 24 izolatın kolorimetrik olarak tür tanımlamaları. BIOMERIUx prosedür uygulamasına göre cihazda 0.55 McF'de uyarlanan gecelik tek koloni kültürleri VITEK 2 Compact Alert bakteri tanımlama cihazı veri tabanına göre *Bacillus* bakteri cinsi tür tanımlamaları yapıldı.

4. BULGULAR

Bacillus cinsine ait bakteri türlerinin izolasyonu için nutrient agar (NA) besi yeri kullanıldı. Ankara iline ait farklı lokasyonlardan (Çubuk ve Kazan) örneklem yapılarak, bu bölgelerden alınan örnekler belirli bir kodlama ile işaretlendi. Kodlama da ilk harf domates bitkisinin kısaltma 2'nci harf ise araştırmacının baş harfi seçilmiştir.

Karışık örneklem ortamlarından saf kültür olarak elde edilen bakterilere çeşitli tanımlama testleri (morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler) uygulanarak örneklemin yapıldığı bölgelere göre cubuksu bakteri izolatları test sonuçları aşağıdaki çizelgelerde örneklem alanına göre gösterilmiştir.

4.1 Farklı Bölgelerden Alınan Örneklerden Bakteri İzolasyonu

4.1.1 İstasyon I

Bakteri izolasyon örnekleme yaptığımız 1. İstasyonumuz (40°15 41, 33 52-32 58 26. 39 64) Çubuk Eğrikin köyü mevkiisidir. Burada bulunan domates bahçesinde 3 ayrı zarar görmüş lokaliteden örnek alınmış ve bakteri izolasyonu yapılarak sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. 1. İstasyon örneklemleri

Yer No.	Örneklem Türü	Sporlu Bakteri İzolatları
I ₁	Meyve, toprak	DH1 ₁ , DH1 ₂ , DH1 ₃ , DH1 ₄ , DH1 ₅
I ₂	Kuru/yeşil hastalıklı yaprak	DH1 ₆ , DH1 ₇ , DH1 ₈ , DH1 ₉ , DH1 ₁₀ , DH1 ₁₁
I ₃	Toprak, yeşil yaprak	DH1 ₁₂ , DH1 ₁₃ , DH1 ₁

4.1.2 İstasyon II

İstasyon bölgemizin 2.'si (40°18146-32.665 803) Ankara Kazan Güvençköprü mevkiinde 4 ayrı zararlı hasarı görülmüş lokaliteden örnek alınarak bakteri izolasyonları yapılmıştır, sonuçlar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. 2. İstasyon örneklemi

Yer No.	Örneklem Türü	Sporlu Bakteri İzolatları
II ₁	Toprak, yeşil yaprak	DH2 ₁ , DH2 ₂ , DH2 ₃
II ₂	Meyve, yaprak	DH2 ₄ ,
II ₃	Karışık kuru ve yeşil Yaprak	DH2 ₅ , DH2 ₆
II ₄	Toprak, yaprak	DH2 ₇ , DH2 ₈ , DH2 ₉ , DH2 ₁₀

4.1.3 İstasyon III

III. istasyon bölgemiz olan Ankara Kazan Kumpınar mevkinde (40°17 16 35-32675 183) farklı zararlı hasarı görmüş lokaliteden yine farklı tür (toprak, meyve/domates, yaprak) örnekler alındı ve bakteri izolasyonları yapılarak sonuçlar Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. 3. İstasyon örneklemi

Yer No.	Örneklem Türü	Sporlu Bakteri İzolatları
III ₁	Karışık Kuru/yeşil Yaprak	DH3 ₁ , DH3 ₂ , DH3 ₃ ,
III ₂	Toprak, Meyve	DH3 ₄ , DH3 ₅ , DH3 ₆ , DH3 ₇ , DH3 ₈ ,
III ₃	Toprak, Yaprak	DH3 ₉ , DH3 ₁₀ , DH3 ₁₁ , DH3 ₁₂

4.1.4 İstasyon IV

IV. istasyon bölgemiz olan Ankara Kazan Kumpınar mahallesi Güvenköprü mevkisinden (40°17 41 53 -31677 142) 3 farklı zararlı hasarı görmüş lokaliteden farklı tür (toprak, meyve/domates, yaprak) örnekler alındı ve bakteri izolasyonları yapılarak sonuçlar Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. 4. İstasyon örneklemi

Yer No.	Örnekleme Türü	Sporlu Bakteri İzolatları
IV ₁	Karışık Kuru/yeşil Yaprak	DH4 ₁ , DH4 ₂ , DH4 ₃
IV ₂	Toprak, Meyve	DH4 ₄ , DH4 ₅ , DH4 ₆ , DH4 ₇ ,
IV ₃	Toprak, Yaprak	DH4 ₈ , DH4 ₉ , DH4 ₁₀ , DH4 ₁₁

Sonrasında dört farklı istasyondan alınan toplam 13 örneklemden bakteri izolasyonu yapılan mevki örnekleri ile birlikte aşağıdaki tabloda sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Dört İstasyondan alınan örnekler sonunda elde edilen izolatlar

Sayı	İzolat No.	İstasyon No.	Örnek	Yer Mevki
1	DH1 ₁	I	Meyve, toprak	Çubuk Eğriköprü
2	DH1 ₂	I	Meyve, toprak	Çubuk Eğriköprü
3	DH1 ₃	I	Meyve, toprak	Çubuk Eğriköprü
4	DH1 ₄	I	Meyve, toprak	Çubuk Eğriköprü
5	DH1 ₅	I	Meyve, toprak	Çubuk Eğriköprü
6	DH1 ₆	I	Kuru/yeşil hastalıklı yaprak	Çubuk Eğriköprü
7	DH1 ₇	I	Kuru/yeşil hastalıklı yaprak	Çubuk Eğriköprü
8	DH1 ₈	I	Kuru/yeşil hastalıklı yaprak	Çubuk Eğriköprü
9	DH1 ₉	I	Kuru/yeşil hastalıklı yaprak	Çubuk Eğriköprü
10	DH1 ₁₀	I	Kuru/yeşil hastalıklı yaprak	Çubuk Eğriköprü
11	DH1 ₁₁	I	Kuru/yeşil hastalıklı yaprak	Çubuk Eğriköprü
12	DH1 ₁₂	I	Toprak, yeşil yaprak	Çubuk Eğriköprü
13	DH1 ₁₃	I	Toprak, yeşil yaprak	Çubuk Eğriköprü

Çizelge 4.4.(Devamı)Dört İstasyondan alınan örneklerle sonunda elde edilen izolatlar

14	DH1 ₁₄	I	Toprak, yeşil yaprak	Çubuk Eğriköprü
15	DH2 ₁	II	Toprak	Kazan Güvençköprü
16	DH2 ₂	II	Toprak, yaprak	Kazan Güvençköprü
17	DH2 ₃	II	Toprak	Kazan Güvençköprü
18	DH2 ₄	II	Toprak	Kazan Güvençköprü
19	DH2 ₅	II	Karışık kuru/yeşil yaprak	Kazan Güvençköprü
20	DH2 ₆	II	Karışık kuru/yeşil yaprak	Kazan Güvençköprü
21	DH2 ₇	II	Toprak, yaprak	Kazan Güvençköprü
22	DH2 ₈	II	Toprak, yaprak	Kazan Güvençköprü
23	DH2 ₉	II	Toprak, yaprak	Kazan Güvençköprü
24	DH2 ₁₀	II	Toprak, yaprak	Kazan Güvençköprü
25	DH3 ₁	III	Toprak, yeşil yaprak	Kumpınar
26	DH3 ₂	III	Toprak, yeşil yaprak	Kumpınar
27	DH2 ₃	III	Toprak, yeşil yaprak	Kumpınar
28	DH3 ₄	III	Toprak, Meyve	Kumpınar
29	DH3 ₅	III	Toprak, Meyve	Kumpınar
30	DH3 ₆	III	Toprak, Meyve	Kumpınar
31	DH3 ₇	III	Toprak, Meyve	Kumpınar
32	DH3 ₈	III	Toprak, Meyve	Kumpınar
33	DH3 ₉	III	Toprak, Yaprak	Kumpınar
34	DH3 ₁₀	III	Toprak, Yaprak	Kumpınar
35	DH3 ₁₁	III	Toprak, Yaprak	Kumpınar
36	DH3 ₁₂	III	Toprak, Yaprak	Kumpınar
37	DH4 ₁	IV	Karışık Kuru/yeşil Yaprak	Kumpınar/Güvençköprü
38	DH4 ₂	IV	Karışık Kuru/yeşil Yaprak	Kumpınar/Güvençköprü

Çizelge 4.4.(Devamı)Dört İstasyondan alınan örneklerlemler sonunda elde edilen izolatlal

39	DH4 ₃	IV	Karışık Kuru/yeşil Yaprak	Kumpınar/Güvençköprü
40	DH4 ₄	IV	Toprak, Meyve	Kumpınar/Güvençköprü
41	DH4 ₅	IV	Toprak, Meyve	Kumpınar/Güvençköprü
42	DH4 ₆	IV	Toprak, Meyve	Kumpınar/Güvençköprü
43	DH4 ₇	IV	Toprak, Meyve	Kumpınar/Güvençköprü
44	DH4 ₈	IV	Toprak, Yaprak	Kumpınar/Güvençköprü
45	DH4 ₉	IV	Toprak, Yaprak	Kumpınar/Güvençköprü
46	DH4 ₁₀	IV	Toprak, Yaprak	Kumpınar/Güvençköprü
47	DH4 ₁₁	IV	Toprak, Yaprak	Kumpınar/Güvençköprü

4.2 İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik ve Mikroskobik Bulguları

Bakteri üremesi olan örneklerden farklı mevkilere ait 29 farklı izolatin morfolojik ve mikroskobik yönden incelenmesi sonucunda Çizelge 4.5’deki gibi belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. İzolatlara ait makroskobik koloni formasyonları ve mikroskobik hücre inceleme sonuçları

İzolat No.	Yer No.	NA kolonileri	Gram Boyama	Mikroskobik Şekil	Endospor
1	I	Püsküllü Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
2	I	Parlak Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
3	I	Mat Kaplamalı	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
4	I	Mat Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
5	I	Nemli Beyaz	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
6	I	Püsküllü Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
7	I	Parlak Beyaz	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
8	I	Mat Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
9	I	Mat Kaplamalı	Pozitif	Çubuksu	-

Çizelge 4.5. (Devamı) İzolatlara ait makroskopik koloni formasyonları ve mikroskopik hücre inceleme sonuçları

10	I	Parlak beyaz	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
11	I	Parlak Küçük	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
12	I	Mat Büyük	Pozitif	Çubuksu	-
13	I	Parlak Ortaboy	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
14	I	Püsküllü Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
15	II	Mat Kaplamalı	Pozitif	Kokobasil	Sporlu
16	II	Mat Büyük	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
17	II	Nemli Büyük	Pozitif	Çubuksu	-
18	II	Küçük Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
19	II	Ortaboy Beyaz	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
20	II	Büyük Beyaz	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
21	II	Küçük Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
22	II	Büyük Beyaz	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
23	II	Mat/ Büyük	Pozitif	Çubuksu	-
24	II	Nemli/Büyük	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
25	III	Mat/ Ortaboy	Pozitif	Çubuksu	-
26	III	Mat/ Büyük	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
27	III	Nemli Büyük	Pozitif	Çubuksu	-
28	III	Küçük Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
29	III	Ortaboy Beyaz	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
30	III	Büyük Beyaz	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
31	III	Küçük Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
32	III	Büyük Beyaz	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
33	III	Mat Kaplamalı	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
34	III	Mat Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-

Çizelge 4.5. (Devamı)İzolatlara ait makroskopik koloni formasyonları ve mikroskopik hücre inceleme sonuçları

35	III	Nemli Beyaz	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
36	III	Püsküllü Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
37	IV	Parlak Beyaz	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
38	IV	Mat Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
39	IV	Mat Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
40	IV	Mat/ Büyük	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
41	IV	Nemli Büyük	Pozitif	Çubuksu	-
42	IV	Küçük Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
43	IV	Mat Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
44	IV	Büyük Beyaz	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
45	IV	Küçük Beyaz	Pozitif	Çubuksu	-
46	IV	Nemli/ Ortaboy	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
47	V	Nemli/ Ortaboy	Pozitif	Çubuksu	Sporlu

4.3 İzole Edilen Bakterilerin Fizyolojik ve Biyokimyasal Aktivite Testleri

Morfolojik ve yapısal yönden incelenen 29 farklı izolat biyokimyasal ve serolojik aktivite testlerine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6’de verilmiştir.

Çizelge 4.6. İzolatlara ait biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları

İzolat No.	Yer No.	Oksijen	Hareket	Hemoliz	Koagülaz	Katalaz	Oksidaz	Amilaz
1	I	+	+	-		+	+	Pozitif
2	I	+	+	Alfa		+	+	Pozitif
3	I	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
4	I	+	+	-		+	+	Pozitif
5	I	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
6	I	+	+	Beta?		+	+	Pozitif
7	I	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
8	I	+	+	Beta		+	+	Pozitif
9	I	+	+	Beta		+	+	Pozitif
10	I	+	+	Alfa	yok	+	+	Pozitif

Çizelge 4.6.(Devamı) İzolatlara ait biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları

11	I	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
12	I	+	+	Beta ?		+	+	Pozitif
13	I	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
14	I	+	+	Beta		+	+	Pozitif
15	II	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
16	II	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
17	II	+	+	Beta		+	+	Pozitif
18	II	+	+	Beta		+	+	Pozitif
19	II			Beta		+	+	Pozitif
20	II			Beta		+	+	Pozitif
21	II			Beta		+	+	Pozitif
22	II			Beta		+	+	Pozitif
23	II			Beta		+	+	Pozitif
24	II			Beta		+	+	Pozitif
25	III			-		+	+	Pozitif
26	III			Beta		+	+	Pozitif
27	III			Beta		+	+	Pozitif
28	III			Beta		+	+	Pozitif
29	III			Beta		+	+	Pozitif
30	III			Beta		+	+	Pozitif
31	III			Beta		+	+	Pozitif
32	III			Beta		+	+	Pozitif
33	III			Beta		+	+	Pozitif
34	III			-		+	+	Pozitif
35	III			Beta		+	+	Pozitif
36	III			Beta		+	+	Pozitif
37	IV	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
38	IV	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
39	IV	+	+	Beta		+	+	Pozitif
40	IV	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
41	IV	+	+	Beta		+	+	Pozitif
42	IV	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
43	IV	+	+	-		+	+	Pozitif
44	IV	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
45	IV	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
46	IV	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif
47	V	+	+	Beta	yok	+	+	Pozitif

4.4 İzole Edilen Bakterilerin Kolorimetrik Tanımlamaları

Elde ettiğimiz izolatlardan biyokimyasal ve fizyolojik testleri sonucunda net çubuksu ve sporlu bakteri olarak *Bacillus* cinsine ait olduğu kanısına varılan 27 farklı izolatın Vitek 2 Compact (Biomeriux) cihazında tanımlamaları yapılarak *Bacillus thuringiensis* olma olasılığında 7 bakteri izolatu belirlendi.

Çizelge 4.7 *Bacillus* türü izolatların VITEK 2 cihazı tanımlama sonuçları

İzolat no.	Mevki	VITEK2 %'si	Kolorimetrik Tanımlama Sonucu (VITEK 2 COMPACT)
DH4 ₅	A5	0,95	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides?</i>
DH3 ₁₁	A2	0,98	<i>B. pumilus</i>
DH2 ₁₂	A2	0,96	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides?</i>
DH2 ₆	A2	0,94	<i>B. subtilis</i>
DH3 ₈	B2	0,99	<i>B. pumilus</i>
DH4 ₂	B2	0,99	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides ?</i>
DH4 ₁₃	B4	0,99	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides ?</i>
DH2 ₇	D6	0,95	<i>B. lentus</i>
DH1 ₂	D6	0,99	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides ?</i>
DH3 ₅	D6	0,96	<i>B. licheniformis</i>
DH1 ₁	A1	0,99	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides ?</i>
DH2 ₉	A1	0,99	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides ?</i>



Şekil 3.3. *Bacillus* tür tanımlaması yapılacak izolatların VITEK 2 ile incelenmesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1 Tartışma

Bacillus izolatların gram boyama ve fiziksel ve biokimyasal testler ile literatürde yer alan *B. thuringiensis* morfolojisine ve biokimyasal karakteristiği ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak morfolojik karakterizasyonun çok güvenilir bir yöntem olmadığı genelde bilinmekle birlikte, ana gruplara ayırmada önemlidir (İriarte ve ark., 2000). *B. thuringiensis* izolatlarının birbirlerinden farklı morfolojik ve yapısal özelliklere sahip olduğu yaptığımız çalışma ile gözlenebilmektedir.

İzole edilen birçok suşun birbiriyle karıştırılması, suşlar arasında ayırım geliştirmek ve suşların teşhisinin doğruluğunu ispatlamak zorunluluğunu gündeme getirmiştir. Ancak, sınıflandırma için geliştirilen morfolojik ve biyokimyasal testler ve fenotipik özellikler suşların ayırımı için yeterli olmadığından değişik yöntemler geliştirilmiştir (Shareef ve ark., 1991).

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde tarım alanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olan zararlı böcekler ile mücadele kullanılan kimyasal ilaçların ekosistemde meydana getirmiş olduğu zararlı etkiler nedeniyle alternatif yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerin en önemlisi de “biyolojik mücadele”dir. Biyolojik mücadelede bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar ve protozoa grubuna ait organizmalar biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır.

Entomopatojenik bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış ve hala yapılmaktadır. Tarım alanlarında ve ormanlarda zarara yol açan böcekler etkisiz hale getirme cabaları günümüzde farklı ülkelerde yeni mikrobiyal ticari ürünler elde edebilme yolunda devam etmektedir. Bu anlamda *B. thuringiensis* bakterisinin ve bakteride bulunan kristal yapıda toksin üreten cry genlerinin moleküler düzeyde aydınlatılması büyük önem taşımaktadır (Tatar, 2007).

Entomopatojen bakteriler *Bacillus* grubu bakteriler önemli bir yer teşkil ederler. Çalışmamızda elde ettiğimiz *B. thuringiensis* izolatların (DH4₅, DH212, DH42, DH413, DH12, DH11 ve DH29) potansiyel bakteriyel pestisit olabileceği yapılan Vitek 2 cihaz

analizlerle gözlenmiştir. Bu nedenle ülkemiz potansiyel bakteriyel biyopestisit izolasyonlarına katkı sağlanmıştır.

5.2 Sonuç

Bu çalışmada Ankara iline ait farklı lokalitelerden alınan toprak, meyve, yaprak örneklerinden bakteri izolasyonu sonrası biyokimyasal ve serolojik testlere tabi tutularak sınıflandırılması yapılmıştır. Bunu takiben Vitek 2 Compact (Biomeriux) kolorimetrik tanımlama cihazı ile tür tanımlamaları yapıldı. Neticede; “*B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pumilus*, *B. megatorium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*” türlerine ait izolatlar elde edildi. .

Sonuç olarak :

- a) 3 farklı bölgeden toplanan 4 örnekten yapılan ekimler sonrası morfolojik özellikler göz önüne alınarak *Bacillus* cinsine ait olabileceği düşünülen 27 izolat elde edilmiştir. Elde ettiğimiz izolatlardan biyokimyasal ve fizyolojik testleri sonucunda net çubuksu ve sporlu bakteri olarak *Bacillus* cinsine ait olduğu kanısına varılan 27 farklı izolatın Vitek 2 Compact (Biomeriux) cihazında tanımlamaları yapılarak *Bacillus thuringiensis* olduğu kanıtlanmış 7 (DH45, DH212, DH42, DH413, DH12, DH11 ve DH29) bakteri izolatı belirlendi. Tür teşhisi için kolorimetrik tanımlamaya tabii tutulan 27 izolatın 7'unun *Bacillus* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. .

6.KAYNAKLAR

- Akinkurolere, O.R., Rao, Q., Wang, X.Q ve Zhang, H.Y. 2009. Effect of *Bacillus thuringiensis* on *Habrobracon hebetor* during combined biological control of *Plodia interpunctella*. Insect Science, 16, 409–416.
- Aslan M, 2009.*Bacillus thuringiensis* var. kurstaki'nin Salkım Güvesi (*Lobesia botrana* (Den. & Schiff.)) (*Lepidoptera: Tortricidae*) ve yararlılara karşı etkilerinin araştırılması KSÜ Doğa Bil. Derg., 12(2), 44-52
- Azizoğlu U, Bulut S, Yılmaz S, 2012. Organik tarımda biyolojik mücadele; Entomopatojen biyoinsektisitler. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 28: 375–381.
- Azizoğlu U, 2014. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 suşuna ait cry1 ve cry2 genlerinin klonlanması, ifadesi ve böcek öldürücü etkilerinin belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji, 157s.
- Beegle, C. C. ve T. Yamamoto, 1992. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *B. thuringiensis* Berliner research and development. Can. Ent., 124: 587-616.
- Bilgehan, H., 1995 *Bacillus* genusu: Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Barış Yayınları 2. Basım, 529-532, İzmir
- Bone LW, 1989. Activity of Commercial *Bacillus thuringiensis* preparations against *Trichostrogylus colubriformis* and *Nippostrrogylus brasiliensis*, Journal of Invertebrate Pathology, 53: 276–277.
- Bonnefoi, A. A ve Beguin, S. 1959. “Resherces sur l’action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* Souche,”Entomophaga. Vol. 4, pp. 193-199.
- Bozlağan, İ., A. Ayvaz, F. Öztürk, L. Açıık, M. Akbulut ve S. Yılmaz, 2010. Detection of cry1 gene in *Bacillus thuringiensis* isolates from agricultural fields and their bioactivity against two stored product moth larvae. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 34: 145-154.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina,L., Villalobos, V., Pena, G., Nunez-Valdez, M., Soberon, M. ve Quintero, R.1998. “Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain Collection,”Applied and Environmental Microbiology. Vol. 64, No.2, pp. 4965-4972.
- Chai, Y., C. Frances., Kolter, R. and Losick, R., “Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*”, Molecular Microbiology 2007.
- Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK.,2004 Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. Current Science, 87,44-53.
- De Maagd, R.A., Bravo, A. and Crickmore, N. 2001. “How *Bacillus thuringiensis* has Evolved Specific Toxins to Colonize the Insect World,” Trends in Genetics, Vol.17, pp.193-199.
- Demirdağ S., Gündüz L., "Strength properties of volcanic slag aggregate lightweight concrete for high performance masonry units", CONSTRUCTION AND BUILDING MATERIALS, vol.22, pp.135-142, 2008
- Doğanlar, M., Yıldırım,A,E., Yiğit, A.,2015. Domates güvesi, Tuta absoluta (Meyrick) (*Lepidoptera, Gelechiidae*) Mücadelesinde *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki ve bazı çevre dostu pestisitlerin etkileri. Türk.Biyo. Müc.Derg.,6(1):13-24.

- E Schnepf, NV Crickmore, J Van Rie, D Lereclus, J Baum, J Feitelson, ...1998
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (3), 775-806
- Glare, T.R. and O'Callaghan M. 2000. "Bacillus thuringiensis", in Biology, Ecology and Safety (John Wiley, Chichester), p. 423
- Hansen, B.M., Damgaard, P.H., Eilenberg, J. and Pedersen, J.C. 1998. "Molecular and Phenotypic Characterization of Bacillus thuringiensis Isolated from Leaves and Insects," Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 71, pp. 106-114
- Höfte, H. and Whiteley, H.R. 1989. "Insecticidal Crystal Proteins of Bacillus thuringiensis," Microbiology Reviews. Vol. 53, pp. 242-255.
- Kalaylı, E., Beyatlı, Y., 2003. Bacillus cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA'ları. Ortaokul On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 01(12):24-35.
- Katı, H., Karaca, B., Hazal, Ş, G., 2016. Topraktan İzole Edilen Bacillus Türlerinin Tanımlanması ve Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 20(2):281-290.
- Kedici, R., Melan, K., Bulut, H., Ünal, G., Has, A., 1998. Bacillus Thuringiensis'li Preperatların Tarla Ve Laboratuvar Şartlarında Patates Böceği [Leptinotarsa decemlineata (Say)] Larvalarına Etkileri Üzerine Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 38(3-4):135-153.
- Kim S, et al. (1998) Folding in vivo of a newly translated yeast cytosolic enzyme is mediated by the SSA class of cytosolic yeast Hsp70 proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 95(22):12860-5
- Krattiger, F., 2004 Insect Resistance in Crops: A Case Study of Bacillus thuringiensis (Bt) and its Transfer to Developing Countries Executive Director of ISAAA .
- Kunitate, A., Okamoto, M. and Ohmori, I., "Purification and characterization of a thermostable serine protease from Bacillus thuringiensis", Agric. Biol. Chem., 53:3251- 3256 (1989).xx
- Iriarte, J., Porcar, M., Lecadet, M.-M., Caballero, P. (2000): Isolation and characterization of Bacillus thuringiensis strains from aquatic environments in Spain. Curr. Microbiol. 40, 402–408.
- Öztemiz, S., 2012. Domates Güvesi [(Tuta absoluta Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae)] ve Biyolojik Mücadelesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi, 15(4).
- Öztürk, A., 2007. Removal of nickel from aqueous solution by the bacterium Bacillus thuringiensis Journal of Hazardous Materials,
- Öztürk F, Acik L, Ayvaz A, Bozdoğan B, 2008. Suludere Z. Isolation and characterization of native Bacillus thuringiensis strains from soil and testing the bioactivity of isolates against Ephestia kuehniella zeller (Lepidoptera: Pyralidae) larve. Turk Biochem. 2008;33:202-208.
- Uzuner, Gonca ve Yaman., 2017 Biyolojik Mücadelede Kullanılan Endopatojenlerin Arılar Üzerinde Etkileri Arıcılık Araştırma Dergisi, Cilt: 9, Sayı: 1, Sayfa: 9-19
- Rosovitz MJ, Voskuil MI, Chambliss GH. 1998. Bacillus, Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. Bacillus thuringiensis: a century of research development and commercial applications. Plant Biotechnol J. 2011;9:283–300

- Schnepf, H.E. and Whiteley, H.R. 1981. "Cloning and Expression of the Bacillus thuringiensis Crystal Protein Gene Escherichia coli," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 78, pp. 2893-2897.
- Sezen K, Demir İ, Demirbağ Z (2004). Study of the bacterial flora as a biological control agent of *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biologia* 59: 327–331.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, Vol 2, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA, 1986.
- Soberon, M., Pardo-Lopez, L., Lopez, I., Gomez, I., Tabashnik, B, et al. (2007) Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance, *Science* 318, 1640-4642.
- Swiecicka, I., and P. De Vos. 2003. Properties of *Bacillus thuringiensis* iso-lated from bank voles. *J. Appl. Microbiol.* 94:60–64
- Tatar, S., 2007. Termofil Moderately Halofilik *Bacillus*.sp. Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü .
- Tuncer, C., Ecevit, O., 1994. *Bacillus thuringiensis* Ürünleri ve Böceklerde Dayanıklılığın Önemi. *Türkiye Entomoloji Dergisi* , 18(2):119-128.
- Turanlı, F., 2012. Salkım Güvesi *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae)'nın Savaşımında Bazı Biyopestisitler ve Karışımlarının Etkinliklerinin İncelenmesi. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 2012, 49 (2): 119-125, ISSN 1018 – 8851.
- Turanlı, F., E. Gümüş ve B. Güzel, 2012. Biopestisitlerde yeni bir yaklaşım *Bacillus thuringiensis* ile Neem ekstraktlarının karışımlarının etkililikleri üzerinde incelemeler. *Türkiye Entomoloji dergisi*, 2012, 36 (3): 433-439, ISSN 1010-6960
- Uzuner ,Gonca ve Yaman., 2017 *Biyolojik Mücadelede Kullanılan Endopatojenlerin Arılar Üzerinde Etkileri Arıcılık Araştırma Dergisi*, Cilt: 9, Sayı:1, Sayfa:9-19
- Vaeck, M., Reybnaerts, A., Hofte, J., Jansens, S., DeBeuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M. and Leemans, J. 1987. "Transgenic Plants Protected from Insect Attack," *Nature*. Vol. 328, pp. 33-37.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. and Van Mellaert, H. 1990. "Receptors on the Brush Border Membrane of the Insect Midgut as Determinants of the Specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxins," *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 57, pp. 1650-1655.
- Warren, G. W. • N. B. Carozzi. N. Desai and M. G. Koziel. 1992. Field evaluation of transgenic tobacco containing a *B. thuringiensis* insecticidal protein gene. *J. Econ. Entomol.*, 85 (5): 1651-1659.
- Wipat, A. and Harwood, C.R., 1999 "The *Bacillus* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium", *FEMS Microbiology Ecology*, 28: 1-9

7.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	HAYDAR GÖZÜDOK
TC Kimlik No	39892858710
Doğum Tarihi ve Yeri	04.02.199 – ZİLE/TOKAT
Yabancı Dili	İngilizce
E-mail	fbhaydar06@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

DERECE	EĞİTİM BİRİMİ	BÖLÜM	MEZUNİYET
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi, TOKAT	Biyoloji	2014
Lise	Anıttepe Anadolu Lisesi	Fen Bilimleri	2009