



**LİMON YETİŞTİRME ALANLARINDAN İNSEKTİSİDAL
BACILLUS THURINGIENSIS İZOLASYONLARI VE TANIMLANMASI**

HALİME BALCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DOÇ. DR. NECİBE CANAN USTA

Temmuz - 2019

Her hakkı saklıdır

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİMON YETİŞTİRME ALANLARINDAN İNSEKTİSİDAL
BACILLUS THURINGIENSIS İZOLASYONLARI VE TANIMLANMASI

HALİME BALCI

TOKAT

Temmuz - 2019

Her hakkı saklıdır

Halime BALCI tarafından hazırlanan “ **Limon Yetiştirme Alanlarından İnsektisidal *Bacillus thuringiensis* İzolasyonları Ve Tanımlanması**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 7 AĞUSTOS 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gazi Osmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOLOJİ ANABİLİM DALI’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

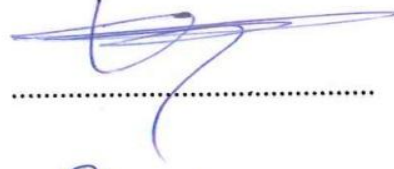
İmza

Danışman

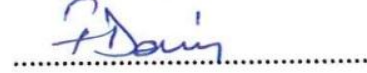
Doç.Dr. Necibe Canan USTA
Gaziosmanpaşa Üniversitesi



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
22.8./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 tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

HALİME BALCI

11 Temmuz 2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİMON YETİŞTİRME ALANLARINDAN İNSEKTİSİDAL *BACILLUS THURINGIENSIS* İZOLASYONLARI VE TANIMLANMASI

HALİME BALCI

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. NECİBE CANAN USTA)

Bu araştırmada, Mersin ili Erdemli ilçesine bağlı olan Kargıpınarı'nda üç farklı mevkide (Çıkacak, Çarkçılı ve Elvanlı) bulunan limon bahçelerinden (çiçek, yaprak, sürgün, toprak, meyve) alınan örneklerden insektisit özellikte bakteri izole edildi. Çalışmada ilk olarak morfolojik ve biyokimyasal testlere göre 84 adet çubuksu ve sporlu bakteri izole edildi. 84 izolatın 19' unda (H₁, H₅, H₇, H₈, H₁₈, H₂₆, H₂₇, H₃₁, H₃₃, H₃₄, H₃₅, H₃₇, H₃₉, H₄₀, H₄₂, H₅₇, H₆₅, H₇₇ ve H₈₀) kristal toksin cry genleri tespit edildi. Kristal toksin genine sahip, potansiyel biyoinspektisit *Bacillus thuringiensis* olanları saptamak için genetik analizler gerçekleştirildi. Bu amaçla, bu türlerde bulunan insektisit cry genlerin, (Cry1, Cry2, Cry3, Cry4), ana domainlerine göre primerler kullanılarak, polimeraz zincir reaksiyonları ve agoroz jel elektroforetik analizleri gerçekleştirildi ve sonuçta ilgili DNA band gözlemleri yapıldı. Bu analizlere göre 19 izolat içerisinde kristal toksin cry genlerin bulunduğu ve aralarından 6 sınıfın 4 ayrı insektisit cry gen bulundurduğu belirlendi, (H₄₂, H₅, H₇, H₇₇, H₅₃, H₃₅). Tez çalışmasında elde edilen bu sonuçlara göre, elde edilen *Bacillus thuringiensis* bakteriyel izolatlarının, 4 insektisit geninin taşınması nedeniyle, biyolojik bakteriyel haşere kontrolünde kullanılma potansiyeli vardır ve yüksek olduğu söylenebilir. Elde edilen bakteriyel izolatlar, potansiyel biyolojik kontrol maddesi olarak önemli bir kaynak olabilecektir. Bu nedenle tez çalışması, özellikle bakteriyel haşere kontrolü için, sonraki in vitro ve in vivo biyoassaylar ve diğer ileri araştırmalar için önemli bir veri kaynağı niteliğindedir.

2019, 52 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER: Kristal protein, Toksin gen, *Bacillus thuringiensis*, Limon, Mersin

ABSTRACT

MASTER THESIS

INSECTICIDAL *BACILLUS THURINGGIENSIS* ISOLATIONS FROM LEMON GROWING AREAS AND IDENTIFICATION

HALİME BALCI

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOLOGY

(SUPERVISOR:) ASST. PROF. DR NECİBE CANAN USTA)

In this study, bacterial isolations were performed from the samples taken from the lemon orchards (flowers, leaves, shoots, soil, fruit) which are located in three different locations (Çıkacak, Çarkçılı and Elvanlı) of Kargıpınar which is connected to the district of Erdemli, Mersin. Firstly, in morphological and biochemical test, 84 rod and sporulated bacteria were determined. Crystalline toxin cry genes were detected in 19 of 84 isolates (H₁, H₅, H₇, H₈, H₁₈, H₂₆, H₂₇, H₃₁, H₃₃, H₃₄, H₃₅, H₃₇, H₃₉, H₄₀, H₄₂, H₅₇, H₆₅, H₇₇ and H₈₀). Genetic analyzes were conducted to investigate putative bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* bacterial cells with the crystal toxin gene(s). For this purpose, polymerase chain reactions and agarose gel electrophoretic analyzes were performed by using primers according to the main domains of the insecticide cry genes (Cry1, Cry2, Cry3, Cry4) found in these species, and consequently related DNA band observations were performed. Crystal toxin cry genes were observed in the genomes of 19 isolates, and within them, 6 *B. thuringiensis* isolates carrying the four cry genes were obtained. According to these results obtained in the thesis research, it can be said that the obtained *Bacillus thuringiensis* bacterial isolates, due to carrying 4 insecticide genes, have high potential to be used in biological bacterial pest control. The results are important for other biological control studies like in vitro and in vivo bioassay researches and therefore, the bacterial isolates are an important source as a biological control agent, so for other subsequent investigations being conducted. The resulting bacterial isolates may be an important source as the putative biological control agents. Therefore, it is an important data for, specifically bacterial pest control, researches such as the subsequent in vitro and in vivo bioassays and so for further investigations.

2019, 52 PAGE

KEYWORDS: Crystal protein, Toxin gene, *Bacillus thuringiensis*, Lemon, Mersin

ÖNSÖZ

Bu çalışmada Akdeniz bölgesi ve bölge ikliminin hakim olduğu alanlarda yetiştirilen limon bahçelerinde bulunan çiftçilerin biyolojik olarak bilmediği ama tüm bitki döngüsünü etkileyen mikrobiyal yaşamdan bir kesit olan biyoinsektisit bakteriyel varlığına bir mercek bakışı yapılmıştır. Hasat dönemi ve turuncgillerin üretim dönemlerinde verimi etkileyen ve çevresindeki diğer bitkilerin de gelişiminde oldukça önemli rolü olabilecek bakteriler saptanmıştır. Her ne kadar çiftçi bahçesindeki bu bakterileri bilmese de, sentetik kimyasal insektisitler yerine kullanabileceği sadece hedef zararlıya yönelik biyoinsektisitler hakkında farkındalık oluşturmak için bahçe sahiplerine, farklı bitkilerin yetiştirildiği komşu tarla sahiplerine ilaçlama, biyolojik kontrol ve biyolojik mücadele ile ilgili kısa bilgiler tarafımdan verilmiştir. Bitkileri koruma amaçlı ve/veya bitki gelişimini arttırmak için doğal sahada bakteriyel insektisit içerebilecek çiçek, yaprak, toprak ve sürgünler toplanmıştır. Limon çeşitlerini etkileyen ve verimi düşüren her sebebin farklı olabileceğini ve bitki zararlılarına karşı tamamen biyolojik yöntemle ürünlerin daha verimli olabileceği ve ürünlerin zararlı pestisitlerden korunabileceği hakkında çalışmalar çiftçilerle paylaşılmıştır.

Bu araştırma konusunun belirlenmesi, yürütülmesi, başından sonuna kadar gerçekleştirilmesindeki yönlendiriciliği ve laboratuvar çalışmalarında bizzat bulunarak bilimsel destekleri için sayın danışman hocam Doç. Dr. Necibe Canan USTA'ya sonsuz minnetlerimle teşekkür ediyorum. Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü deneysel çalışmalarımın bir bölümünün gerçekleştirilmesinde laboratuvar olanağıyla destek veren, Sayın Prof. Dr. İsmail DEMİR'e, Dr. Dönüş GENÇER'e ve Kübra YILDIRIM'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan ve her daim bana huzur veren aileme sonsuz teşekkürü borç bilerek tezimi ithaf ederim.

Ayrıca yüksek lisans eğitimim ve çalışmalarım boyunca benimle birlikte uyumayan, izolasyon için benimle birlikte bahçede gezen, gözlem yapan Kedilerim Lizbon, Stalin, Tito, Chivas, Lozan, Regal ve Halime'ye, Koyunum Vida'ya, Köpeğim Raki'ye benim evlatlarım oldukları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

HALİME BALCI

11 Temmuz 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER.....	vi
KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ	9
2.1. Türkiyede Yapılan Çalışmalar.....	9
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Materyaller.....	13
3.1.1. Bakteri örnekleri.....	13
3.1.2. Kimyasallar ve çözeltiler.....	13
3.1.3. Cihazlar.....	15
3.1.4. Cry gen primerleri	16
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Alınan örneklerden <i>Bacillus</i> cinsine ait bakterilerin izolasyonu.....	16
3.2.2. Bakteriyel izolatların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	17

3.2.3. Bakteriyeel izolatlarnn biyokimyasal aktivite testeri.....	17
3.2.4. <i>Bacillus</i> izolatlarnnda yapılan moleküler testler.....	18
4. BULGULAR	20
4.1. Üç Farklı Bölgeden Alınan Örneklerden Bakteri İzolasyonu.....	20
4.1.1. İstasyon 1 örneklemleri.....	20
4.1.2. İstasyon 2 örneklemleri.....	20
4.1.3. İstasyon 3 örneklemleri.....	21
4.2. Bakteriyeel İzolatlarnn Morfolojik Bulguları.....	25
4.3. Bakteriyeel İzolatlarnn Biyokimyasal Aktivite Bulguları.....	28
4.4. Bakteriyeel İzolatlarnn DNA İzolasyonu Sonrası Ölçülen DNA Yoğunlukları	32
4.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarnnın Cry Gen Agoroz Jel Elektroforez Yürütme Sonuçları.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	41
5.1. Tartışma.....	41
5.2. Sonuç.....	45
6.KAYNAKLAR.....	46
7.ÖZGEÇMİŞ.....	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
λ	Lambda
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
bp	Baz Çifti
cry	Kristal
cyt	Sitolitik
dk	Dakika
gr	Gram
kg	Kilogram
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
L	Litre
McF	Mc Farland
μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
Mbp	Mega baz çifti
mM	Milimolar
Md	Megadalton
M	Molar
N	Normal
rpm	Devir sayısı
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
AGE	Agaroz Jel Elektroforezi
AP	Amonyum per Sülfat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra asetikasit
EtBr	Etidyum Bromür
ICP	İnsektisidal Kristal Protein
mRNA	Messenger (Haberci) Ribonükleik Asit
NA	Nutrient Agar
CBB	Comassie Brilliant Blue
PCR (PZR)	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop
TCA	Triklor Asetik Asit
TEMED	Tetra Etilen Diamin
UV	Ultraviyole
VIP	Vejetatif İnsektisidal Potein
<i>B.t</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil1.1. Karışık kültürden ekimi yapılan bakterilerin morfolojik görüntüsü.....	4
Şekil 1.2. Coomassie Blue R 250 boyama ile görünen <i>Bacillus</i> türü bakteri.....	8
Şekil1.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in sporulasyonu sırasında oluşan kristal proteini.....	8
Şekil 3.1. Amilaz testi sonucu şeffaf görünüm kazanan <i>Bacillus</i> türü bakteriler.....	18
Şekil 4.5.1. (a) 277-300 baz uzunluğu ile görünen Cry1 geni.....	33
Şekil 4.5.1. (b) 277-300 baz uzunluğu ile görünen Cry1 geni.....	34
Şekil 4.5.1. (c) 277-300 baz uzunluğu ile görünen Cry1 geni.....	34
Şekil 4.5.2. (a) 689-701 baz uzunluğu ile görünen Cry2 geni.....	35
Şekil 4.5.2. (b) 689-701 baz uzunluğu ile görünen Cry2 geni.....	35
Şekil 4.5.2. (c) 689-701 baz uzunluğu ile görünen Cry2 geni.....	36
Şekil 4.5.3. (a) 589-609 baz uzunluğu ile görünen Cry3 geni.....	36
Şekil 4.5.3. (b) 589-609 baz uzunluğu ile görünen Cry3 geni.....	37
Şekil 4.5.3. (c) 589-609 baz uzunluğu ile görünen Cry3 geni.....	37
Şekil 4.5.4. (a) 498 baz uzunluğu ile görünen Cry4 geni.....	38
Şekil 4.5.4. (b) 498 baz uzunluğu ile görünen Cry4 geni.....	38
Şekil 4.5.4. (c) 498 baz uzunluğu ile görünen Cry4 geni.....	39

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda kullanılan çözelti ve tamponlar.....	14
Çizelge 3.2. İzolasyon için kullanılan DNA primer örnekleri.....	16
Çizelge 3.3. PCR uygulama protokolü.....	19
Çizelge 4.1. İstasyon 1 örneklemi.....	20
Çizelge 4.2. İstasyon 2 örneklemi.....	20
Çizelge 4.3. İstasyon 3 örneklemi.....	21
Çizelge 4.4. Üç İstasyon sonunda elde edilen izolatlar.....	21
Çizelge 4.5. İzolatların makroskopik ve mikroskopik inceleme sonuçları.....	24
Çizelge 4.6. İzolatlara ait biyokimyasal sonuçlar.....	28
Çizelge 4.7. İzolatların ölçülen DNA yoğunlukları.....	32
Çizelge 4.8. Cry1, Cry2, Cry3, Cry4 genlerini içeren bakteri izolatları.....	40

1. GİRİŞ

Türkiye’de Limon yetiştiriciliği önemli geçim kaynaklarından biridir. Türkiye’nin Akdeniz iklimine uygun bölgelerinde tarımı yapılmaktadır.

Limon tarımının yapıldığı bölgelere Mersin, Antalya, Hatay, Adana ve İzmir gibi iller örnek gösterilebilir. Limon turunçgil tarımında önemli bir meyve türüdür. Çukurova bölgesinde Türkiye’deki toplam turunçgilin %70’i üretilmektedir(Akgün, 2006). Turunçgil tarımında limonun yanı sıra greyfurt, portakal, mandalina türlerinde üretimi yapılmaktadır. Turunçgil tarımında bahsedilen ürünlerin farklı çeşitleri ürünün kalite ve piyasasını oldukça etkilemektedir.

Mersin ili yaz aylarında sıcak ve nem oranı düşük, kış aylarında ise donma derecesinde soğukluk yaşanmayan(ılıman geçen) yüksek kesimlerinde sıcaklık farkı çok olmayan Akdeniz iklimine sahip bir bölgede yer almaktadır. Sulama için genelde salma su ve damlama yöntemi kullanılmaktadır. Toprak koşulları yönünden ise genelde verimli alanlara sahiptir. Eğimli arazileri düşük sıcaklıklarda ürünlerin yetişmesine izin veren ve genelde kazık kök sistemine sahip bitkilerin yetiştirildiği(elma, üzüm, kiraz vb.) alanlardır(Anonim,2014).

Limon tarımında bir dönemde iki ayrı ürünün hasadı yapılabilmektedir. Örneğin, limon bahçelerinde toprağı garık yöntemiyle çizerek 3 ve/veya 5/6 aylık sürede ürün veren brokoli, karnabahar, patlıcan ve kabak gibi bitkilerin hasadı yapılabilmektedir. Bir yıl içerisinde birden farklı ürünün hasadı çiftçiyi ekonomik yönden rahatlatmaktadır ancak bahçe içerisinde gelişen bakteri, mantar, protista, nematod vb. organizmaların üremesi oldukça artmaktadır. Tarla sınırları birbirlerine yakın olarak yapılan turunçgil tarım alanları verimi etkileyen birçok faktörü de beraberinde getirmektedir. Bu faktörler içerisinde rekabetçi bitkiler, zararlılar(böcek, bakteri, sinek, güve vb.) ve hastalıklar önemli yer tutmaktadır. Zararlılar farklı bitki çeşitlerinde kendine özgü sonuçlar doğurduğu için bu tip alanlarda gelişen canlılar, sınırları yakın olan alanların ekosistemini oldukça etkilemektedir(Anonim,2014).

Limon tarımıyla uğraşan çiftçilerin verimi arttırmak adına yaptıkları ilaçlamalar bitişik alanlardaki farklı bitkilerin doğal flora ve faunasında olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir. Bu ilaçlamaların gelişigüzel yapılması durumunda ortamda bulunan bakteriler ve faydalı organizmalar da ortamdaki yok olmaktadır.

Limon yetiştirme alanlarında Tarım İl müdürlüğü tarafından uygulanan biyolojik yöntemler yetkili birimler tarafından bölge halkına belirli gün veya dönemlerde eğitim şeklinde verildiğinde veya verilirse bölge kapsamında yetişen limonların kalite ve verimi büyük oranda artacaktır.

Bu çalışmada esas olan farklı mevkilerde var olan limon bahçelerinden *Bacillus thuringiensis* ve türlerini izole etmektir.

Akdeniz ve Ege bölgesinde pazar amaçlı ve/veya çiftçilerin yemeklik olarak ürettikleri limonlarda yıllardan bu yana dert yanılan nokta zararlılardır (böcek, akar, koşnil, örümcek, bit, sinek vb.)(Anonim,2017). Zararlılar yıllara göre baskınlık göstererek her dönemde etkilerini göstermektedirler. Örneğin; bir dönem Akdeniz Meyve sineği, bir dönem Kırmızı Kabuklu bit, bir dönem Limon Çiçek güvesi gibi zararlılar etkili olmaktadır. Zararlıların yanı sıra hastalıklar da üretimi büyük ölçüde etkilemektedir. Bu hastalıklara örnek olarak ise kurşini küf, turunçgil dal yanıklığı, uçkurutan, kök çürüklüğü, limon tıkanıklık hastalığı gösterilebilir(Anonim,2017). Hastalıklar ve zararlılar bir bahçede aynı dönemde oluşabileceği gibi farklı zamanlarda da etkisini göstermektedir. Dönemden döneme değişkenlik gösteren baskın zararlı ve hastalık çeşidi iklim koşullarının sertlik derecesi ve zararlıların çevreden etkilenme-adaptasyon derecesine bağlı olarak değişmektedir. Bu zararlıların ve hastalıkların limona verdiği etki de haliyle her dönem farklı olmaktadır. Örneğin; yaprak üzerinde zamk-bal oluşması (bu durum zararlının hareket ederken bıraktığı etkidir), yaprak sapında sarı tozların oluşması, gövdenin boydan boya beyaz unlarla kaplı olması, dal ve sürgünde kırmızı, mavi renk oluşması, meyvenin sap ile bulunduğu kısımda beyaz unların olması, yaprakların ateş değmişçesine yeşilden kahverengine dönmesi vb. kalıntılar hastalık ve zararlıların etkileridir. Zararlıların larva ve nimf dönemlerini limonun farklı bölgelerinde (meyve, yaprak sapı, çiçek, yeni sürgün vb.) geçirmesi nedeniyle yerleştiği bölgede delikler açması, bıraktığı salyalar ile farklı takım ve yapıdan canlıların (örneğin; karınca, sülük, arı vb.) ağaca zarar vermesi gibi özellikler zararlıların karakteristik özelliğine bağlı olarak değişmektedir(Anonim, 2014).

Yukarıda kısaca özetlenen limon zararlıları-hastalıkları ve bu zararlıların-hastalıkların bıraktığı etkilere bağlı olarak limon tarımı için yapay ve doğal mücadele yolları geliştirilmiştir. Biyolojik çeşitliliği arttırmak adına limon zararlılarıyla Türkiye’de Tarım Bakanlığına bağlı olarak (limon tarımının yapıldığı tüm alanlarda) biyolojik mücadele kapsamlı olarak gerçekleştirilmektedir(Anonim, 1997).

Örneğin; Mersin ili Erdemli ilçe tarım müdürlüğünde kendilerine özel olarak tahsis edilen araştırma bahçelerinde limon zararlılarının, hastalıkların, kimyasal ilaçların tespiti gibi biyolojik ajanların kullanımına fırsat veren deneysel üretim ve koruma çalışmaları yapılmaktadır. Ayrıca söz konusu yerde limon ağaçları çiftçilerden önce yetiştirilmekte, zararlı ile mücadele çalışmalarında bu araştırma bahçeleri pilot bahçe olarak kullanılmaktadır.

Sadece limon üretimi için değil bölge içerisinde tarımı yapılan tüm ürünlerin üretim ve biyolojik kontrolü yapılmaktadır. Dönem sonu veya sene sonunda hasadı yapılan ürünler halka arz edilerek uygun fiyatla kapı girişlerinde satılmaktadır.

Limon yetiştirme alanlarının zararlılarıyla yapılan biyolojik mücadelede *Bacillus* cinsine ait olan *Bacillus thuringiensis* pestisiti çok önemli bir entomopatojen ajandır(Tuncer ve Ecevit,1994). Söz konusu bakteri, Bacillaceae familyası içinde yer alan Gram pozitif, çubuk şekilli, endospor oluşturan, aerob veya fakültatif anaerob olan mikroorganizmadır. Parosporal Cry toksin gen üreten bir veya birden fazla çeşitte spor oluşturabilmektedir(Mark ve Byron, 2003).

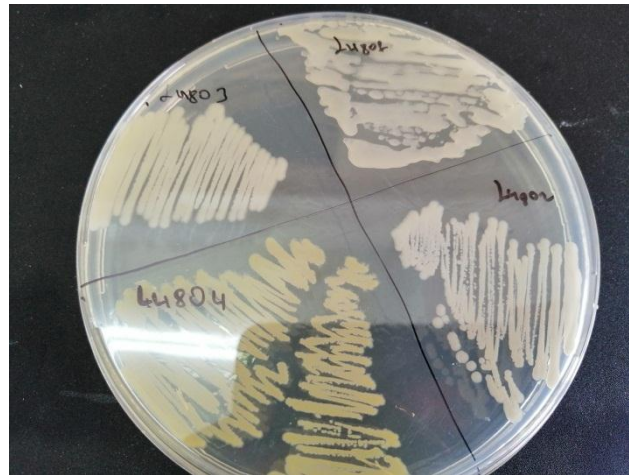
Genellikle aerobik koşullar altında ortamda gıda maddelerinin tam olarak sarf olmadığı veya gıda maddelerinin (mineral maddeler, üreme faktörleri, nitrojen, karbon ve enerji kaynakları) azaldığı ve çevresel koşulların değiştiği durumlarda olgun basiller içerisinde spor oluşmaktadır. Sporulasyon işlemi bakteri üremesinin duraksama fazında gerçekleşmektedir. Sporulasyon boyunca yoğun miktarda insektisit parasporal protein üreten *Bacillus thuringiensis* zararlı tür topluluklarını yoğun olarak azaltarak doğal dengeyi sürdürmektedir(Schnepf ve ark, 1998). Sporlar genellikle oval veya yuvarlak şekilde olup, hücrenin çeşitli yerlerinde bulunabilirler *Bacillus*'ların vejetatif hücreleri tek başına veya zincir şeklinde bulunabilir(Walker ve ark, 2003). 0,5x1,2 µm - 2,5x10 µm büyüklükte olan hücrelerin yuvarlak veya köşeli şekilde görünüşleri vardır (Tunail ve Köşker, 1986).

Normal fiziksel faktörlere (ısı, ışık, donma, kuruma, radyasyon, vb), kimyasal maddelere (dezenfektanlar, vb.) ve mekanik tesirlere karşı vejetatif formlarından çok daha fazla dayanıklıdırlar (Arda, 2000).

Sporlanan bakteride var olan parasporal kristal proteinler her *Bacillus* cinsinde farklılık tayin etmektedir. Bu çeşitlilik büyük miktarda seçilmiş insektisit entomopatojen özelliği bakteriye kazandırmaktadır. *Bacillus* cinsi bakterilerde bulunan bu kristal proteinler izole edildiği bakteriye, çeşidine ve dağılımına göre sayısal sonuçlarda farklılık oluşturmaktadırlar(Kalaylı ve Beyatlı, 2003).

Bacillus türlerini izole ettikten sonra karışık kültürlerle (sıvı veya katı) ekimi yapılır. Karışık kültürlerden öze ile (öze önce alevlenir ve farklı mikroorganizmalardan arınır) tek koloni düşmüş ise üzerine hafif değdirilir eğer dallanarak ekim göstermişse öze ile yayılarak kültürden bakteri alınır. Ekimi yapılan bakteri koloni morfolojisine göre kişiyi yönlendirebilmektedir. *Bacillus* izolatlarının koloni morfolojileri kendi içerisinde varyete oluşturabilmektedir.

Alt türlerinin de morfolojik bakımdan çıplak gözle ayırt edilebilir oluşma biçimleri bulunmaktadır ancak bu koloni morfolojileri bakterinin türünü net olarak ortaya koyma konusunda yetersizdir(Bağcı ve ark, 1991).Örneğin; ekimi yapılmış bir bakterinin *Bacillus thuringiensis* yada farklı alt tür taksonomilerinden bir çeşidinin olduğunu anlamak için bej, parlak beyaz, mat beyaz, parlak sarı, mat sarı pigment oluşturanlar bunun yanı sıra bu pigmentlerin petri kabı içerisinde iç içe halkalar, kalın bir çizgiden ince bir çizgiye doğru azalan yoğunlukta koloni, kenarları pütürlü koloni gibi değişik morfolojileri bulunmaktadır(Yılmaz, 2003).



Şekil 1.1. Karışık kültürden çapraz ekimi yapılan bakterilerin koloni morfolojisi

Sporlanan *Bacillus* ve sporlanmayan yani endotoksin oluşturmeyen *Bacillus* cinsleri de ekim alanına düşmektedir. Bunun yanı sıra spor oluşturma evresinde olmamış, spor oluşturmamış, kontamine olmuş veya spor oluşturabiliyorken mutant türleriyle karışık farklı bir görünüm vermiş olabilirler. Örneğin; aynı cinse ait bakteride morfolojik olarak parlak pigmentli ve mat pigmentli koloni oluşturmuş bakteriler ortaya çıkabilmektedir(Maniatis ve ark, 1989).

Bacillus bakterilerinin hücrelerinde genelde sitoplazmik membran üzerinde bir veya birkaç anyonik polimer ve birkaç peptidoglikan tabaka ile sarılmış hücre duvarı bulunmaktadır. Bazı *Bacillus* türleri hücre duvarından ayrı olarak ve hücre duvarının dışında jelatinöz, viskoz, elastik veya mukoid karakterde olan kapsül içermektedirler. *Bacillus anthracis*'de bulunan kapsül virülens etkiye sebep olmaktadır (Sneath, 1986). Kapsül bakteriye ortam şartları altında dayanıklılık adına güç vermektedir ve bu güç bakteriyi ekstrem koşullarda endospor oluşturma özelliği kazandırmışçasına ortamdaki soyutlayabilmektedir.

Bacillus bakterileri çubuk içerisinde spor oluşturma özelliği gösteriyor olsa da (çubuk şeklindeki olan bakterilerde toksin geni oluşumu bakterinin türüne göre değişmektedir) bakterinin yaşadığı iklim, bulunduğu alan ve etkilendiği canlılar gibi etmenlerden dolayı kazandığı spor oluşturma özelliği bakteriye özgüllük kazandırmaktadır. Kazanılan bu özgüllük bakteriyi analiz etme sırasında çok sayıda varyete oluşturmaya neden olmaktadır(Taubman, 1992).

Bacillus bakteri türlerinin termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunmaktadır. Aşırı ortam şartlarında (yüksek/düşük ısı ve kuraklıklarda) canlı kalabilirler. Genellikle 30-40°C' de ve pH 7 civarında ürerler. *Bacillus* bakterileri karbon kaynağı olarak organik asit, şeker, alkol ve nitrojen kaynağı olarak amonyum içeren besi yerlerinde iyi gelişirler. Gelişimleri sıvı ve katı besi yerlerinin üst kısımlarında olmaktadır. Katı besi yerlerinde kenarları ve üzeri pürüzlü, granüller yapıda olan koloniler meydana getirirler (Taubman,1992). Bakterilerin koloni getirme fonksiyonları farklılık göstermektedir. Bu farklılık *Bacillus* türleri içerisinde dahi varyeteler oluşturur. *Bacillus*'lar özellikle spor oluşturdıkları için hemen her yerde örneğin toprak, toz, saman, gıda, su, deniz ve tatlı su sedimentleri, balık ve su ürünleri, inek gübresi, bitki rizosferi, bazı böceklerin larvaları ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinden izole edilebilirler (Tunail ve Köşker,1986).

Bacillus'ların spor formasyonu 70⁰C' de 10 dakika pastörizasyon işlemi ile tanınması kolaylaşmaktadır. İzolasyon işleminde spor formlarının ısıya dirençli olma özelliğinden yararlanır (Sneath, 1986).

Bacillus cinsi bakteriler kolay üretilibilmeleri, endüstriyel öneme sahip olmaları (antibiyotik, enzim, toksin, biyoplastik gibi) ve patojeniteleri sebebiyle bakteriler dünyasında dikkat çeken ve üzerinde geniş çalışmaların yapıldığı mikroorganizmalar grubuna girer (Rosovitz ve ark, 1998).

Bacillus thuringiensis türü bakteriler çevresel dengeyi bozmazlar. İnsanlar üzerinde patojen etki bırakmazlar. Doğal ekosistemin sürdürülebilirliği üzerinde organizmaların direncine etki etmezler (Chattopadhyay ve ark, 2004).

Bacillus bakterileri tarafından üretilen subtilisin, proteaz, amilaz gibi endüstriyel enzimler deterjan, besin, eczacılık gibi birçok endüstri alanında kullanılmaktadır (Johnvesly ve Naik, 2001).

Bulaşıcı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin üretiminde de *Bacillus* bakterilerinden yararlanılmaktadır. Örneğin: *Bacillus polymyxa* polimiksini, *Bacillus subtilis* subtilini ve *Bacillus licheniformis* basitrasini üretmektedir (Rosovitz ve ark,1998).

Bacillus thuringiensis cinsi bakteri böceklere karşı dirence dayanıklılık göstermemektedirler. Önceki bakteri çalışmalarına göre *Bacillus* cinslerinde söz konusu böceğin (genellikle kelebek takımlarında etkili) bağırsak kısmından girmektedir. Bir diğer faktör böceğin segmentli yapısının karın bölgesinin ve sindirim sisteminin *Bacillus* türlerinin girebileceği konumda olması önemlidir (Mark ve Byron, 2003).

Bugün birçok gen aktarımı, organ paylaşımı, ilik nakli gibi sağlık açısından önemli konularda gerçekleşen aktarımlarda iki tarafında periferal proteinlerinin antijenik kısmının uyuşmasıdır. Nitekim virüsler bile konak hücreye zarar vereceğinde yada kendi genomunu konakta çoğaltacağı zaman benzer protein yapılarına (DNA baz dizilimlerinin uyuşmasına bağlı olarak gerçekleşen ortak aminoasit dizilimleri) bağlı olarak konağını seçer. Her virüs her konakta tutunma işlemini gerçekleştiremez. Bakterilerde yani *Bacillus* türleri böceğin bağırsak yapısındaki ortak aminoasit eşlemesine göre böcek takımını seçmektedir. Tüm tutunma işleminin ardından böceğin yıkımsal ürünlerinden olan proteaz yapısını inaktif hale getirmektedir. Böceğin bakteri içinde var olan insektisidal kristal proteinin işlevine mecbur bırakmaktadır. Bu durum son yılların

içerisinde göreceli olarak değişkenlik göstermektedir. Net bir yıkım için tanım verilmemiştir(Rajamohan ve ark, 1998).

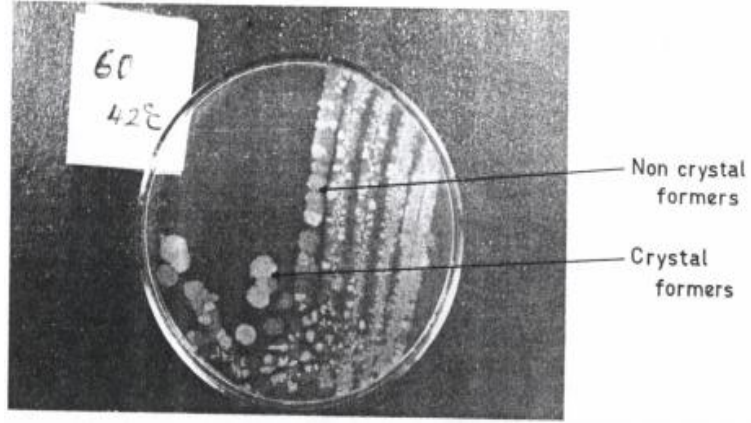
Son yapılan çalışmalarda dayanıklılık süresi üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu özelliği ile kimyasal önlemlerden ve dayanıklılığı az olan pestisitlerden daha çok kullanım alanına sahiptir.

İnsektisidal Kristal Protein (ICP) olarak bilinen Cry proteinler farklı böcek takımları üzerinde etki gösterirler. *Bacillus thuringiensis*'in ortaya çıkarılmış 700 Cry geni bulunmaktadır. Aminoasit farklılıkları gözlenerek 72 farklı Cry (Cry1, Cry2, Cry3...Cry72) geni belirlenmiştir (Raymond et al, 2010). Cry protein grupları en fazla %40 protein benzerliğine sahiptir. Aynı protein grubuna dahil büyük harf ile belirlenen gruplar (Cry1A, Cry1B, Cry1C vb.) en az %70 aminoasit benzerliği göstermektedir. Küçük harfle belirlenen grup genler ise(Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, vb.) %70'den fazla fakat %95'den daha az aminoasit benzerliği göstermektedir. Üzerinde en çok çalışılan *Bacillus thuringiensis* Cry Proteinleri ise Cry2, Cry4 ve Cry11'dir(Azizoğlu, 2017).

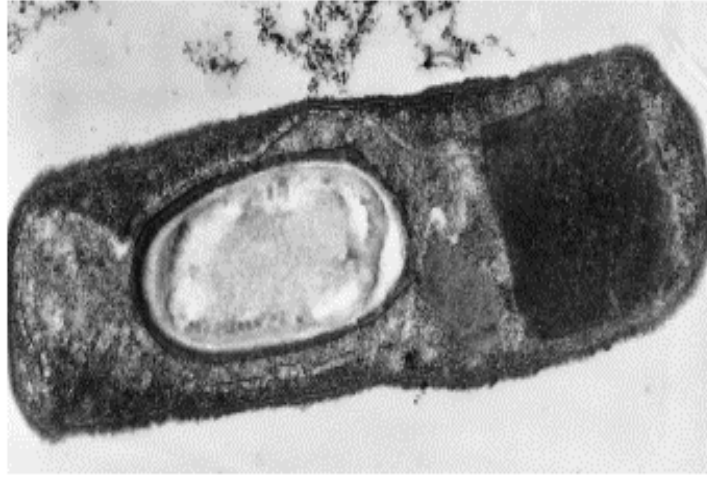
Bugün yaklaşık olarak 30 bitkide 90'dan fazla zararlı böceğe karşı *Bacillus thuringiensis* türleri kullanılmaktadır (Boggle ve Yamamoto,1992)

Söz konusu mikroorganizmalar bu çalışma kapsamında üç farklı limon bahçesinden ve üç farklı bölümden toplanmıştır. Limonların bilinçsizce yapılan bakımından dolayı ortaya çıkan sonuca göre hastalık ve zararlılarından ve bu zararlıların bulaşık olduğu alanlardan toplanan örneklemelerde birçok bakteri türüne de ev sahipliği yaptığı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı yerel üretimin yapıldığı her alandan daha kaliteli bir verim almak için toprağı tanımak, hasadı yapılan ürünü araştırmaktır. Mersin İli Erdemli İlçesi Kargıpınarı Mahallesinde yer alan üç farklı mevki'den(Çıkacak, Çarkçılı, Elvanlı) Limon ile bulaşık yapılar toplanarak ICP genlerini içeren *B.t* bakterilerini izole etmektir.



Şekil 1.2. Toksin boyama ile kristal protein içeren *B.t* türü bakterinin 42°C'deki mikroskop görüntüsü(Sharif ve Alaeddinoğlu, 1988).



Şekil 1.3. *Bacillus thuringiensis*'in sporulasyonu sırasında oluşan kristal proteini(Agaisse ve Lereclus, 1995).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Dünya üzerinde yaşanılabilir alan gün geçtikçe azalmaktadır. Yenilenebilir enerji kaynaklarının yerini yenilenemeyen enerji kaynaklarının alması, besin ve oksijen kaynak alanlarının sanayi, ulaşım ve altyapı çalışma alanlarına dönüştürülmesi vb. nedenlerden dolayı canlıların yaşadığı coğrafik alanlar kontrolsüz bir şekilde yok olmaktadır. Bu coğrafik alan üzerinde insan, hayvan, mantar ve bakteri domainlerine ait canlılar yaşamaktadır. Bu canlılar ekosistemde birçok farklı göreve sahiptir. Canlıların ekosistemdeki yaşadığı bölgelere 'habitat' denir ve habitatın bulunduğu alan, canlının trofik düzeyini gösterir. Canlıların habitatlarındaki yoğunluklarına 'Biyomas' (biyokütle) denir ve üretici basamağından, son tüketici basamağına gidildikçe genellikle biyomas küçülmektedir (Evrendilek, 2004).

Ekosistemde biyokütlesi oldukça küçük olduğu düşünülse de ekolojik nişleri yüksek öneme sahip olan bakteriler, yeryüzünde sayısız madde ile reaksiyona girmekte ve madde döngülerinde oldukça önemli yer tutmaktadır. Ekosistemde gözle görülebilir yapı sergilemedikleri için belirli incelemeler sonucunda ortaya çıkmaktadırlar. Hızlı bölünmeleri, genetik yapı olarak eşlenmenin daha ulaşılabilir olması, plazmit DNA ve halkasal DNA'larının yapısı, prokaryotik ribozom organelinin yapısı, disiplinler arası çalışmalarda daha reel sonuçlar vermelerinden dolayı bugün bakteriler birçok alanda kullanılmaktadır. Kullanıldığı alana bağlı olarak bir çok farklı izolasyon yöntemleri ile bakteriler her bölgeden toplanıp laboratuvar koşullarında farklı yöntemlerle elde edilebilmektedir(Topaktaş, 2018).

Literatür incelemelerinde Türkiye' de farklı bölge, yapı, bitki, hayvan ve bir çok organizmalardan izole edilen bakteri ve çalışma alanları şöyledir.

2.1. Türkiye'de Yapılan Çalışmalar

Alper ve ark, (2013),doğal *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bacillales: Bacillaceae) İzolatlarının *Tetranychus utricae* Koch (Acarina: Tetranychidae), *Ceroplastes rucsi* L.(Homoptera: Coccidae) ve *Ceratitits capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)'ya karşı toksik etkileri adlı araştırma makalesinde Aydın ilinden *Bacillus thuringiensis* izole etmiştir. Bakterilerin spor-kristal karışımının etkisini incelemiş ve izolatlardan %86'sının hiç toksik etki yapmadığı, %14'ünün ise çok çok az toksik etki yaptığını belirlemiştir.

Arslan (2010), *Lactobacillus rhamnosus*'un Rope (Sünme) hastalığı etkeni olan *Bacillus* cinsi bakteriler üzerine etkisinin unlarda araştırılması adlı çalışmasında 13 farklı ekmeklik undan 20 *Bacillus spp.* izole etmiş ve 6 izolatta kontaminasyon etkisini bulmuştur.

Aslım ve ark, (2002). Determination of Some Properties of *Bacillus* isolated from soil adlı makalede Ankara Elmadağ bölgesinden 30 *Bacillus* suşu izole etmiş ve bunları *Bacillus megaterium*, *Bacillus firmus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilus* olarak belirlemiştir.

Azgın (2013), topraktan izole edilen *Bacillus sp.* suşlarının antifungal etkinliklerinin saptanması adlı yüksek lisans tezinde Adana İli'nin farklı bölgelerinden 50 farklı *Bacillus sp.* suşu izole edilmiş ve 5 farklı fungus üzerine aktiviteleri olduğunu bulmuştur.

Azizoğlu (2017), hastalık taşıyıcısı *Culex pipiens* (DipterA: Culicidae)'in biyolojik mücadelesinde yerel *Bacillus thuringiensis* izolatlarının kullanılabilme potansiyelinin araştırılması adlı makalede *Culex pipiens* larvaları üzerinde 14 farklı B.t kristal protein taşıyan bakteri uygulamış ve SY50.4'ün spor-kristal protein karışımının larvaları %80 öldürdüğünü ortaya çıkarmıştır.

Bayram (2015), farklı orijinlerden izole edilen alkalifil ve alkalitolerant bakterilerin, endüstriyel öneme sahip bazı enzim aktivitelerinin belirlenmesi ve izolatların moleküler karakterizasyonu çalışmasında, farklı kaynaklardan 232 bakteri izolatu elde etmiş ve bunlar *Bacillus pumilis*, *Bacillus safensis*, *Bacillus aerius*, *Bacillus Licheniformis* olarak belirlemiştir.

Bozlağan ve ark, (2010), tarım alanlarından izole edilen *Bacillus thuringiensis* izolatlarındaki Cry1 geninin belirlenmesi ve bu izolatların iki farklı depo zararlısı güve üzerindeki öldürücü etkisinin incelenmesi adlı makalelerinde Kayseri bölgesinden 60 farklı *B.t* izole etmişler ve 17 izolatın Cry1 genini taşıdığını ve izolatların 19 kb büyüklüğünde plazmit bandlarını elde etmişlerdir.

Çadircı ve ark, (2013), determination of enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from dairy desserts by multiplex PCR adlı makalede 25 keşkül, 12 tavuk göğsü, 12 kazandibi, 30 supangle, 4 profiterol ve 17 sütlaç olmak üzere 100 örnek analiz edilmiştir. 3'ü tavuk göğsü, 2'si supangle, 1'i keşkül ve 1'i sütlaç olmak üzere toplamda 7 örnekte *B.cereus* varlığını bulunmuştur.

Erem ve ark, (2009), identification of *Bacillus* species isolated from ropey breas both with classical methods and apı identification kits adlı makalede normal ve kepekli ekmekten *B.subtilis*, *B.megaterium*, *B.licheniformis*, *B.coagulans*, *B.pumilus* türleri izole edilmiştir.

İmamoğlu (2008), çeşitli kaynaklardan izole edilen *Bacillus sp.* izolatlarının kitosanaz aktivitesinin ve antifungal etkisinin belirlenmesi adlı yüksek lisans tezinde çeşitli izolasyon yöntemleri ile 508 tane *Bacillus* izolatu elde etmiştir.

Karakuş ve ark, (2018), endüstriyel enzimler üreten *Bacillus* izolatlarının morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu adlı çalışmasında izolatlara ait yedi farklı *Bacillus* türünü *B.cereus*, *B.subtilis*, *B. licheniformis*, *B.pumilus*, *B. megaterium*, *B. methylotrophicus* ve *B. sonorensis* bulmuşlardır.

Katı ve ark, (2016), topraktan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması adlı çalışmada, Giresun adasından toplanan toprak örneklerinden *Bacillus* izolasyonu yapılmış ve sonuç olarak 38 izolat *B. cereus*, 7 izolat *B. thuringiensis*, 10 izolat *B. megaterium*, 6 izolat *B. pumilis* ve 12 izolat *Bacillus sp.* olarak tanımlanmıştır.

Kedici ve ark, (1998), *Bacillus thuringiensis*'li preperatların tarla ve laboratuvar şartlarında patates böceği [*Leptinotarsa decemlineta* (Say)] larvalarına etkileri üzerine araştırmalar adlı çalışmalarında *B.t'in* larvalar üzerinde 4. günde 1.20 ml ve 0.60 ml dozlarında etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Kılıçer ve Özcan, (2013), yem katkısı selüloz enzimlerini üreten *Bacillus* suşlarının izolasyonu ve enzimlerin kısmi karakterizasyonu adlı makalede Düziçi kaplıcasından üç adet termofilik *Bacillus sp.* elde etmişlerdir.

Kocabaş ve ark, (2017), topraktan ksilanaz üreten mikroorganizmaların tanınması ve ksilanazın kısmi karakterizasyonu adlı çalışmalarında en yüksek ksilanaz aktivitesine sahip mikroorganizmanın *Bacillus spp.* tanımlamışlardır.

Odabaş (2011), Ordu ili ve ilçelerinden toplanan toprak numunelerinden *Bacillus sp.* suşlarının izolasyonu ve insektisidal etkilerinin belirlenmesi adlı yüksek lisans tezinde Ordu ilinden *Bacillus* bakterilerini izole etmiş ve böcekler üzerinde öldürücü etkilerini belirlemiştir.

Özdoğan (2007), çeşitli et örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması, proteolitik ve lipopolitik enzim aktivitelerinin araştırılması adlı yüksek lisans tezi'nde incelenen örneklerden kuşbaşı ve kıyma et örneklerinin hepsinde (%100), tavuk örneklerinin 12'sinde (%80) *Bacillus* cinsi ve toplam 279 *Bacillus* izolatu elde etmiştir. Bu izolatların 121'i *B. circulans*, 52'si *B. firmus*, 40'ı *B. lentus*, 39'u *B. megaterium*, 34'ü *B. licheniformis*, 9'u *B. mycoides*, 3'ü *B. sphaericus*, 1'i de *B. cereus* olarak tanımlanmıştır.

Öztürk (2007), Ankara'daki topraklardan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması, moleküler düzeyde tiplendirilmesi ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi adlı doktora tezi çalışmasında Ankara'nın farklı yerlerinden alınan toprak örneklerinden *Bacillus* türlerine ait toplam 60 bakteri izole etmiştir. Sonuçta *B. cereus*, *B. anthracis* ve *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. laterosporus*, *B. pumilis*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *B. brevis*, *B. firmus* ve *B. circulans* türlerinin yer aldığını belirlemiştir.

Öztürk ve Çakmakçı, (2003), bazı böcek patojeni *Bacillus* izolatlarının serolojik olarak tanımlanması adlı makalede böcek patojeni olduğu belirlenmiş 39 adet *Bacillus thuringiensis* izole etmişlerdir.

Şahin ve ark, (2017), *Bacillus thuringiensis* isolation from the environments of boron mines and effects of boric acid on bioactivity adlı makalede bor madenlerinden *B.t* 'in izolasyonunu yapmış ve PCR analizinde Cry1 (% 100), Cry2 (% 41) genlerinin varlığını tespit etmiştir.

Topçal ve ark, (2014), topraktan izolen edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve bakteriosin üretimlerinin belirlenmesi adlı çalışmalarında Gaziantep ili Oğuzeli ilçesinde *Hordeum sp.*(arpa) ve *Vicia sp.* (fiğ) ekilmiş topraklardan 121 adet *Bacillus* suşları elde etmişler ve bu suşların *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *B. megaterium* ve *B. amyloliquefaciens* olarak belirlemiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri örnekleri

Bu çalışma kapsamında kullanılan bakteriler, Mersin İli Erdemli İlçesi Kargıpınarı mahallesinde 3 farklı mevki’de (Çıkacak, Çarkçılı, Elvanlı) yer alan limon bahçelerinden (çiçek, sürgün, yaprak, toprak, meyve) izole edilmiştir. Bahçe içerisinde hastalıklı bitkilerden ve bunların bulaşık olduğu yaprak, meyve, sürgün ve toprağa yeni düşmüş limonlar ile toprak gibi yapılar, toprağın üst kısmı (yabancı ot, poşet, plastik eşyalar vb. gibi yapılardan) temizlenerek steril spatula ile yaklaşık 5 cm derinlikten alınarak steril ağzı kapaklı plastik poşete konulmak üzere buz dolabında +4°C’de saklanmıştır.

3.1.2. Kimyasallar ve çözeltiler

Kullanılan besiyerleri

Nutrient Broth (NB) sıvı besi yeri (gr/lt): 13 gr nutrient broth distile suya akıtılarak hacmi 1 litreye tamamlandı.

Nutrient Agar (NA) katı besi yeri (gr/lt): 28 gr nutrient agar distile suya aktarılarak hacmi 1 litreye tamamlandı.

Luria Bertani Agar (LBA) Genel Besi yeri (1 lt/40 gr)

Tryptone Soy Agar (TSA) Genel Besi Yeri(1 lt/ 37gr)

Agaroz Jel Elektroforezi için kullanılan çözeltiler

Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponu (x50) (pH 8.0): 242 gram tris, 57.1 ml glacial asetik asit, 0.5 M 100 ml EDTA (pH 8.0), maddeler distile suya aktarılarak hacmi 1 litreye tamamlandı.

Agaroz: %0.8’ lik ve %2’ lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlandı (Agarose low EEO,A9539-10G).

Yükleme tamponu: 40 gr sukroz, 0.025 gr bromofenol mavisi, 0.25 gr ksilen siyanol 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

Etidyum bromür (EtBr): 10 mg/ml derişimde sulandırılıp hazırlandı ve koyu renkli şişelerde muhafazalandı.

DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler

Bütün Çözeltiler Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit ZYMO RESEARCH prosedürüne uygun olarak hazırlandı.

ZR Bashing Bed Buffer Lysis Tube (0.1 mm &0.5 mm) (750 mikrolitre)

Genomic Lysis Buffer (1200 mikrolitre)

DNA pre-wash Buffer (200 mikrolitre)

g-DNA Wash Buffer (500 mikrolitre)

DNA Elution Buffer (35 mikrolitre)

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan çözelti ve tamponlar

<u>Bileşen</u>	<u>Son Hacim</u>	<u>Son Derişim</u>
Yeşil veya renksiz GoTaq ^R reaksiyon tamponu	10 mikrolitre	1X (1.5 mikrometre magnezyum klorür)
PCR nükleotit karışımı, 10Mm	1 mikrolitre	0.2 mikrometre dNTP
Üst primer	X mikrolitre	0.1-1.0 mikrometre
Alt primer	Y mikrolitre	0.1-1.0 mikrometre
GoTaq ^R DNA polimeraz (5 mikrolitre)	0.25 mikrolitre	1.25 mikron
Şablon DNA	Z mikrolitre	<0.5 mikrogram/25 Mikrolitre
Nükleaz içermeyen su	50 mikrolitre	

Çizelge 3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda kullanılan çözelti ve tamponlar

Coomassie Brilliant Blue (%50 etanol ve %7 asetik asit solusyonu içinde %25 oranında CBB) boyası kullanıldı.

Katalaz testi için 100 ml ile seyreltilmiş Hidrojen Peroksit çözeltisi

Amilaz testi için lügol çözeltisi kullanıldı (3gr Nişasta, 8,4 gr N.A Besi yeri 300 mililitreye tamamlandı).

3.1.3. Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

Mikroskop (Olimpia ve ZEISS)

PCR Nucleotide Mix (Cat.#C1141)

İnkübatör/ Etüv (Nüve)

Güvenlik kabini (KOJAIR)

Otoklav (Nüve)

DNA Yoğunluk Ölçer NanoDrop 2000

DNA PCR(BIO-RAD)

Zymo-Spin™ IV Spin Filter (Orange Top) Collection Tube

Dısıruptor

Zymo-Spin™ IIC Column

Agaroz jel elektroforezi Ünitesi (E-C 105 Apparatus Corporation)

Agaroz Jel Elektroforez Kapağı (CLEA AVER)

Ultraviyole (UV) cihazı(GEL LOGIC 200 IMAGING SYSTEM)

MOLECULAR İMAGING SOFTWARE-KODAK) Okuma Programı

100 kb DNA Ladder N3232s 500µg/ml BioLabs

Dipfriz ve buzdolabı

Santrifüj (Nüve)

Benmari / Su Banyosu (Allsheng)

Ependorf tüpler

PCR Tüpleri

Pipetör (BOCOREX)

Standart Tüpler(KIMAKAP 73660)

Kristal Uç

Mavi Uç

3.1.4. Cry gen primerleri

Çalışmada *B.t.* kristal toksin tarama analizleri için literatürde önceden bilinen çeşitli universal cry genlere özgün primerler kullanılmıştır.

Primer Numara	Primer Sekansı	Sıcaklık (°C)
Cry1R	5'-TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT-3'	66
Cry1F	5'-CATGATTCATGCGGCAGATAAAC-3'	
Cry2R	5'-CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT-3'	61
Cry2F	5'-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG-3'	
Cry3R	5'-CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT-3'	55
Cry3F	5'-CGTATACGCAGAGAGATGACATTAAC-3'	
Cry4R	5'-GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC-3'	48
Cry4F	5'-GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC-3'	

Çizelge 3.2. İzolasyon için kullanılan DNA primer örnekleri (Ben-Dov et al., 1997)

3.2. Yöntem

3.2.1. Alınan örneklerden *Bacillus* cinsine ait bakterilerin izolasyonu

Bacillus cinsine ait bakterilerin izolasyonu için Nutrient agar (NA) besi yeri kullanıldı. Vortekste 1 dakika karıştırıldı. Mersin ili 3 farklı istasyondan alınan örnekler 1 gram tartılarak içerisinde 9 mililitre steril fizyolojik su içeren kaplara aktarıldı. Vortekste 1 dakika boyunca karıştırıldı. Çiçek, yaprak, sürgün örnekleri 100°C'de 20 dakika inkübasyona tutularak spor oluşturmeyen formların üremesi engellendi ve ortamda spor oluşturan formların gözlenmesi için uygun ortam oluşturuldu. Örneklerden 10⁻¹'den 10⁻⁷'ye kadar seri seyreltmeler yapılarak 10⁻³ seyreltmeden sonra Nutrient Agar besi yerine yayma yöntemiyle 0,1 ml ekimler yapıldı ve 30°C'de 5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübe işleminden sonra *Bacillus* türüne ait morfolojik yapıları benzeyen (opak, mat, büyük, beyaz, sarı vb.) koloniler seçildi. Seçilen morfolojik *Bacillus* türüne ait bakteriler Nutrient Agar besi yerine tek ekim yöntemiyle ekildi ve (Saf kültür oluşturuldu) sıvı besi yerine aktarımı yapıldı. Örnekler kullanılmaya kadar +4°C'de muhafaza edildi(Sharif ve Alaeddinoğlu, 1988).

3.2.2. Bakteriyel izolatların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Bacillus izolatlarını tanımlamak için toksin ve gram boyama yapılmıştır.

Toksin boyama

Bacillus thuringiensis suşları ve mutant suşlarının izolasyon ile koloni morfolojisi tanımını yapmak için nutrient agar besi yerine ekim yapıldı +4°C'de tutularak kolonilerin takibi yapıldı. Bakteriler için Coomasie parlak mavi boya % 0,25, % 50 etil alkol, % 7 asetik asit içeren bir karışım hazırlandı. Lam üzerine dört ayrı bölgeye koloni oluşturulan bakteriler öze ile yerleştirildi. 5 dakika kurumaya bırakıldı. Kaynatılmış su ile yıkanan lameller ışık mikroskobu ile incelendi. Kristal endotoksin sporlar, spor içeren bakteri varyeteleri ve vejetatif hücreler arasındaki farklılaşma sağlandı(Sharif ve Alaeddinoğlu, 1988)

Gram boyama

Spor oluşturan bakterilerin incelemesinde en net sonuç veren boyama Schaffer-Fulton yöntemidir. Steril fizyolojik tuz çözeltisi lam üzerine 1 damla damlatılıp bunzen bek alevinden geçirilerek sterilize edildi. Soğumaya bırakıldı. Besi yerinden bakteriler sterilize edilmiş öze ile alınarak saf su ile karıştırıldı.

Kurumaya bırakılan lam bunzen bek alevinden 15-20 kez geçirilerek kurutma kağıdı ile sarıldı. Ticari malachit yeşili çözeltisinden 1 damla lam üzerine damlatıldı ve bek alevinde 5 dakika ısıtıldı. Kaynatılmış su ile yıkandı. Safranin ile 15 saniye karşı boyaması yapıldı. Kaynatılmış su ile yıkanıp kurutma kağıdına sarıldı. İmmersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifte incelendi. Spor içeren kısımlar yeşil, diğer hücreler pembe olarak görüldü(Yousten ve Rogoff, 1969).

3.2.3. Bakteriyel izolatların biyokimyasal aktivite testleri

Bacillus izolatlarının biyokimyasal aktivite (üreme) testleri için Katalaz ve Amilaz testleri uygulanmıştır.

Katalaz testi

Saf kültüre alınan bakteriler sterilize edilmiş öze ile petri kabından lam üzerine alındı. 1 ml önceden hazırlanmış hidrojen peroksit çözeltisi lam üzerine damlatıldı. Gaz kabarcığı çıkışı gözlenen lam üzerindeki bakteriler katalaz testinde pozitif sonuç olarak değerlendirildi(Baltacı, 2015).

Amilaz testi

Polisakkarid yapıda olan nişasta amilaz enzimi tarafından parçalanmaktadır. Nişasta amilaz enziminin substratıdır. Bazı bakteriler nişastayı parçalayan ekstraselüler enzim üretmektedirler. Petri kaplarına %3'lük nişastalı agar eklendi. Bakteriler steril öze ile nişastalı agar içeren petri kaplarına ekildi. Petri kapları 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda petri kaplarına nişasta ayırıcı olan lugol çözeltisi damlatıldı. 20 dakika bekletilen petilerde mavi ve mor renk oluşumu negatif, şeffaf-saydam-çok açık kahverengi görüntüler pozitif olarak değerlendirildi(Yüzüğüllü-Karakuş ve ark, 2018).



Şekil 3.1. Amilaz testi sonucunda şeffaf görünüm kazanan *Bacillus* türü bakteriler

3.2.4. *Bacillus* izolatlarında yapılan moleküler testler

Bakteri DNA izolasyonu

Örnekler 1 gece kültüre bırakıldı. Mikroskopik inceleme sonucu morfolojik yapıları *B.t* türüne benzeyen 19 izolat ZYMO RESEARCH DNA İzolasyon yönteminin kurallarına göre DNA izolasyonu yapıldı.

Tüm sıvı kültürler santrifüjde çöktürüldü. (13 rcf, 3 dakika). Sıvı kültür içeren ependorfların supernatant kısmı dökülür(İşlem iki kez tekrarlandı.). 19 izolatın mekanik ve fiziksel olarak parçalanması için ependorflara 200 mikrolitre distile su eklendi ve çözdürüldü. Üzerine 750 mikrolitre Bashing Bead Buffer eklendi. Karışım 15 dakika boyunca Dısıruptörde karıştırıldı.

Dısıruptor sonrası izolatlar 10.000 g (rcf)'de 1 dakika santrifüj edildi. Çözeltiden 400 mikrolitre alınarak Zymo-Spin kolon içerisindeki II-F filtreden geçirilerek çözeltiler 800 g (rcf)'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta kalan DNA kolonisine 1200 mikrolitre Genomic Lysis Buffer eklendi. Karışım IIC Column filtreden geçirildi. 10.000 g (rcf)'de 1 dakika santrifüj edildi.

200 mikrolitre DNA pre-wash Buffer IIC Column filtreden geçirildi. 1 dakika 10.000 g (rcf)'de santrifuj edildi. Karışıma 500 mikrolitre g DNA wash Buffer eklenerek IIC Column filtreden geçirildi. 10.000 g (rcf)'de 1 dakika santrifuj edildi. Ependorflara 35 mikrolitre DNA Elution Bufer koyuldu. 30.000 g (rcf)'de 30 saniye santrifuj edildi. İzole edilen DNA'ların yoğunlukları NanoDrop 2000 cihazında ölçüldü. İstenen DNA yoğunluklarına ulaşmak için NanoDrop 2000 cihazına Elution Buffer ile körleme yapıldı.

Polimer Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonun protokolü aşağıdaki parametrelere göre izlenerek gerçekleştirilmiştir.

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95°C	2 dakika	35 çevrim
Denatürasyon	95°C	0.5-1 dakika	25-35 çevrim
Tavlamak	42-65°C	0.5-1 dakika	25-35 çevrim
Genişletme	72°C	1min/kb	25-35 çevrim
Son Uzatma	72°C	5 dakika	1 çevrim
Islatma	4°C	Süresiz	1çevrim

Çizelge 3.3. PCR Uygulama Protokolü

Agoroz Jel Elektrofözezi (AGE)

%1'lik 0,5 gram Agoroz Jel tartıldı. 50 mililitre TAE tamponu ile karıştırılarak 1 dakika mikrodalgada ısıtıldı. Musluk suyu ile soğutuldu. 2 Mikrolitre sulandırılmış Etidyum Bromür damlatıldı. Elektrofözez tanklarına döküldü. Tanklar soğutmaya bırakıldı. 9 bantlık tankın 1. bölgesine 100 baz çifti (6 mikrolite)içeren marker yüklendi.(Belirleyici olması için) Jel plaklarının büyüklüğü 70x70 mm'dir.

Örnekler tankların içerisine pipetör ile eklendi. Tankların kapakları kapatılarak 94 voltta 20-25 dakika yürütüldü. Sonuçlar UV ışık altında görüntüleme cihazına yüklenerek fotoğrafları alındı. Örnekler için Cry1, Cry2, Cry3, Cry4 proteinleri kullanıldı(Öztürk, 2007).

4. BULGULAR

Bacillus cinsine ait bakterilerin tür izolasyonu için Nütrient agar besi yeri kullanıldı. Mersin iline ait farklı lokasyonlardan (Çıkaçak, Çarkçılı ve Elvanlı) örneklem yapılarak bu örneklem belirlen kodlamalar ile işaretlendi.

4.1. Üç Farklı İstasyondan Alınan Örneklerden Bakteri İzolasyonu

4.1.1. İstasyon 1

İzole etmek istenen bakteriler için 1. istasyonumuz: Çıkacak mevkiinde bulunan limon bahçesinden üç farklı noktadan örnek alınmış ve örnekler izole edilerek çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. İstasyon 1 örneklemeleri

Yer No	Örneklem türü	Sporlu Bakteri İzolatları
1A	Sürgün çiçek	H ₁ ,H ₂ ,H ₃ ,H ₄₆ ,H ₄₇ ,H ₄₃ ,H ₄₄ ,H ₄₅
1B	Yaprak+ Çiçek	H ₄ ,H ₅ ,H ₆ ,H ₇ ,H ₄₉ ,H ₄₈
1C	Toprak+ Çiçek	H ₅₀ ,H ₈ ,H ₉ ,H ₁₀ ,H ₁₁ ,H ₅₁

4.1.2. İstasyon 2

İzole etmek istenen bakteriler için 2.istasyon: Çarkçılı mevkiinde bulunan limon bahçesinden üç farklı noktadan örnek alınmış ve örnekler izole edilerek çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. İstasyon 2 örneklemeleri

Yer No	Örneklem Türü	Sporlu Bakteri İzolatları
2A	Sürgün çiçek	H ₁₆ ,H ₁₇ ,H ₁₈ ,H ₁₉ ,H ₅₆ ,H ₅₇ ,H ₅₈ ,H ₅₉ ,H ₃₁ ,H ₃₂ ,H ₃₃ ,H ₃₄
2B	Sürgün+ Çiçek+ Toprak	H ₂₀ ,H ₂₁ ,H ₂₂ ,H ₂₃ ,H ₆₀ ,H ₆₁ ,H ₆₂ ,H ₆₃ ,H ₃₅ ,H ₃₆ ,H ₃₇ ,H ₃₈
2C	Yaprak+ Toprak	H ₂₄ ,H ₂₅ ,H ₂₆ ,H ₂₇ ,H ₆₄ ,H ₃₉ ,H ₄₀ ,H ₄₁ ,H ₄₂

4.1.3. İstasyon 3

İzole etmek istenen bakteriler için 3.istasyon: Elvanlı mevkiinde bulunan limon bahçesinden üç farklı noktadan örnek alınmış ve örnekler izole edilerek çizelge 4.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. İstasyon 3 örneklemi

Yer No	Örneklem Türü	Sporlu Bakteri İzolatları
3A	Sürgün çiçek	H ₁₂ ,H ₁₃ ,H ₁₄ ,H ₁₅ ,H ₅₂ ,H ₅₃ ,H ₅₄ ,H ₅₅ ,H ₂₈ ,H ₂₉ ,H ₃₀
3B	Toprak	H ₆₅ ,H ₆₆ ,H ₆₇ ,H ₆₈ ,H ₆₉ ,H ₇₀ ,H ₇₁ ,H ₇₂ ,H ₇₃
3C	Yaprak+ Toprak	H ₇₄ ,H ₇₅ ,H ₇₆ ,H ₇₇ ,H ₇₈ ,H ₇₉ ,H ₈₀ ,H ₈₁ ,H ₈₂ ,H ₈₃ ,H ₈₄

Üç farklı istasyondan alınan örneklerden izole edilen bakteriler alındıkları mevki ve her mevkiye ait örnekleri içeren çizelge 4.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Üç istasyon sonunda elde edilen izolatlar

Sayı	İzolat No	Yer No	Örnek	Yer Mevki
1	H1	1A	Sürgün çiçek	Çıkacak
2	H2	1A	Sürgün çiçek	Çıkacak
3	H3	1A	Sürgün çiçek	Çıkacak
4	H4	1B	Yaprak+Çiçek	Çıkacak
5	H5	1B	Yaprak+Çiçek	Çıkacak
6	H6	1B	Yaprak+Çiçek	Çıkacak
7	H7	1B	Yaprak+Çiçek	Çıkacak
8	H8	1C	Toprak+Çiçek	Çıkacak
9	H9	1C	Toprak+Çiçek	Çıkacak
10	H10	1C	Toprak+Çiçek	Çıkacak
11	H11	1C	Toprak+Çiçek	Çıkacak
12	H12	3A	Sürgün çiçek	Elvanlı
13	H13	3A	Sürgün çiçek	Elvanlı

Sayı	İzolat No	Yer No	Örnek	Yer Mevki
14	H14	3A	Sürgün çiçek	Elvanlı
15	H15	3A	Sürgün çiçek	Elvanlı
16	H16	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı
17	H17	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı
18	H18	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı
19	H19	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı
20	H20	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı
21	H21	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı
22	H22	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı
23	H23	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı
24	H24	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı
25	H25	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı
26	H26	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı
27	H27	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı
28	H28	3A	Sürgün çiçek	Elvanlı
29	H29	3A	Sürgün çiçek	Elvanlı
30	H30	3A	Sürgün çiçek	Elvanlı
31	H31	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı
32	H32	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı
33	H33	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı
34	H34	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı
35	H35	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı
36	H36	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı
37	H37	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı
38	H38	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı
39	H39	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı
40	H40	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı
H41	H41	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı

Sayı	İzolot No	Yer No	Örnek	Yer Mevki
42	H42	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı
43	H43	1A	Sürgün çiçek	Çıkacak
44	H44	1A	Sürgün çiçek	Çıkacak
45	H45	1A	Sürgün çiçek	Çıkacak
46	H46	1A	Sürgün çiçek	Çıkacak
47	H47	1A	Sürgün çiçek	Çıkacak
48	H48	1B	Yaprak+Çiçek	Çıkacak
49	H49	1B	Yaprak+Çiçek	Çıkacak
50	H50	1C	Toprak+Çiçek	Çıkacak
51	H51	1C	Toprak+Çiçek	Çıkacak
52	H52	3A	Sürgün çiçek	Elvanlı
53	H53	3A	Sürgün çiçek	Elvanlı
54	H54	3A	Sürgün çiçek	Elvanlı
55	H55	3A	Sürgün çiçek	Elvanlı
56	H56	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı
57	H57	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı
58	H58	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı
59	H59	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı
60	H60	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı
61	H61	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı
62	H62	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı
63	H63	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı
64	H64	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı
65	H65	3B	Toprak	Elvanlı
66	H66	3B	Toprak	Elvanlı
67	H67	3B	Toprak	Elvanlı
68	H68	3B	Toprak	Elvanlı
69	H69	3B	Toprak	Elvanlı

Çizelge 4.4. Üç istasyon sonunda elde edilen izolatlar(Devamı)

Sayı	İzolat No	Yer No	Örnek	Yer Mevki
70	H70	3B	Toprak	Elvanlı
71	H71	3B	Toprak	Elvanlı
72	H72	3B	Toprak	Elvanlı
73	H73	3B	Toprak	Elvanlı
74	H74	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı
75	H75	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı
76	H76	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı
77	H77	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı
78	H78	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı
79	H79	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı
80	H80	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı
81	H81	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı
82	H82	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı
83	H83	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı
84	H84	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı

4.2. Bakteriyel İzolatların Morfolojik Bulguları

Bakteri içeren örneklerden farklı mevkilere ait 84 farklı izolatin morfolojik ve mikroskobik(Spor oluşturma, spor şekli, koloni morfolojisi ve spor boyama) inceleme sonuçları Çizelge 4.5.'deki gibi belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. İzolatların makroskobik ve mikroskobik inceleme sonuçları

İzolat No	Yer No	Coomassie B. R250 Boyama	Mikroskobik Şekil	Endospor	NA Kolonileri
H1	1A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H2	1A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H3	1A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H4	1B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H5	1B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H6	1B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H7	1B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H8	1C	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H9	1C	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H10	1C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H11	1C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H12	3A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Nemli-Beyaz
H13	3A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H14	3A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H15	3A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H16	2A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H17	2A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H18	2A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Bayaz
H19	2A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H20	2B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H21	2B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak

Çizelge 4.5. İzolatların makroskobik ve mikroskobik inceleme sonuçları(Devamı)

İzolat No	Yer No	Coomassie B. R250 Boyama	Mikroskobik Şekil	Endospor	NA Kolonileri
H22	2B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H23	2B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H24	2C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H25	2C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H26	2C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H27	2C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H28	3A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Beyaz-Nemli-Parlak
H29	3A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Beyaz-Nemli-Parlak
H30	3A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H31	2A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H32	2A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H33	2A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H34	2A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H35	2B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H36	2B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H37	2B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H38	2B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H39	2C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H40	2C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H41	2C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H42	2C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H43	1A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Beyaz-Nemli-Parlak
H44	1A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Beyaz-Nemli-Parlak
H45	1A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Beyaz-Nemli-Parlak
H46	1A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Beyaz-Nemli-Parlak
H47	1A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H48	1B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Beyaz-Nemli-Parlak
H49	1B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Beyaz-Nemli-Parlak

Çizelge 4.5. İzolatların makroskobik ve mikroskobik inceleme sonuçları(Devamı)

İzolat No	Yer No	Coomassie B.R250 Boyama	Mikroskobik Şekil	Endospor	NA Kolonileri
H50	1C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Beyaz-Nemli-Parlak
H51	1C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Beyaz-Nemli-Parlak
H52	3A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H53	3A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H54	3A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H55	3A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H56	2A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H57	2A	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H58	2A	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H59	2A	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H60	2B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Beyaz-Parlak
H61	2B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Beyaz-Parlak
H62	2B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H63	2B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H64	2C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Parlak-Beyaz
H65	3B	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H66	3B	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H67	3B	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Mat-Sarı
H68	3B	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Mat-Sarı
H69	3B	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Mat-Sarı
H70	3B	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H71	3B	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H72	3B	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H73	3B	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H74	3C	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H75	3C	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H76	3C	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz

Çizelge 4.5. İzolatların makroskobik ve mikroskobik inceleme sonuçları(Devamı)

İzolat No	Yer No	Coomassie B.R250 Boyama	Mikroskobik Şekil	Endospor	NA Kolonileri
H77	3C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H78	3C	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Parlak-Beyaz
H79	3C	Pozitif	Küresel-Çubuk	Pozitif	Parlak-Beyaz
H80	3C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H81	3C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Sarı-Nemli-Parlak
H82	3C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H83	3C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz
H84	3C	Pozitif	Çubuk	Pozitif	Mat-Beyaz

4.3. Bakteriyel İzolatların Biyokimyasal Aktivite Bulguları

Morfolojik ve biyokimyasal yapısı incelenen 84 bakterinin katalaz ve amilaz test sonuçları Çizelge 4.6.'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. İzolatlara ait biyokimyasal aktivite test sonuçları

İzolat No	Yer No	Katalaz Testi	Amilaz Testi
H1	1A	Pozitif	Pozitif
H2	1A	Pozitif	Pozitif
H3	1A	Pozitif	Pozitif
H4	1B	Pozitif	Pozitif
H5	1B	Pozitif	Pozitif
H6	1B	Pozitif	Pozitif
H7	1B	Pozitif	Pozitif
H8	1C	Pozitif	Pozitif
H9	1C	Pozitif	Pozitif
H10	1C	Pozitif	Pozitif
H11	1C	Pozitif	Pozitif
H12	3A	Pozitif	Pozitif

Çizelge 4.6. İzolatlara ait biyokimyasal aktivite test sonuçları (Devamı)

İzolot No	Yer No	Katalaz Testi	Amilaz Testi
H13	3A	Pozitif	Pozitif
H14	3A	Pozitif	Pozitif
H15	3A	Pozitif	Pozitif
H16	2A	Pozitif	Pozitif
H17	2A	Pozitif	Pozitif
H18	2A	Pozitif	Pozitif
H19	2A	Pozitif	Pozitif
H20	2B	Pozitif	Pozitif
H21	2B	Pozitif	Pozitif
H22	2B	Pozitif	Pozitif
H23	2B	Pozitif	Pozitif
H24	2C	Pozitif	Pozitif
H25	2C	Pozitif	Pozitif
H26	2C	Pozitif	Pozitif
H27	2C	Pozitif	Pozitif
H28	3A	Pozitif	Pozitif
H29	3A	Pozitif	Pozitif
H30	3A	Pozitif	Pozitif
H31	2A	Pozitif	Pozitif
H32	2A	Pozitif	Pozitif
H33	2A	Pozitif	Pozitif
H34	2A	Pozitif	Pozitif
H35	3A	Pozitif	Pozitif
H36	2B	Pozitif	Pozitif
H37	2B	Pozitif	Pozitif
H38	2B	Pozitif	Pozitif

Çizelge 4.6. İzolatlara ait biyokimyasal aktivite test sonuçları(Devamı)

İzolot No	Yer No	Katalaz Testi	Amilaz Testi
H39	2C	Pozitif	Pozitif
H40	2C	Pozitif	Pozitif
H41	2C	Pozitif	Pozitif
H42	2C	Pozitif	Pozitif
H43	1A	Pozitif	Pozitif
H44	1A	Pozitif	Pozitif
H45	1A	Pozitif	Pozitif
H46	1A	Pozitif	Pozitif
H47	1A	Pozitif	Pozitif
H48	1B	Pozitif	Pozitif
H49	1B	Pozitif	Pozitif
H50	1C	Pozitif	Pozitif
H51	1C	Pozitif	Pozitif
H52	3A	Pozitif	Pozitif
H53	3A	Pozitif	Pozitif
H54	3A	Pozitif	Pozitif
H55	3A	Pozitif	Pozitif
H56	2A	Pozitif	Pozitif
H57	2A	Pozitif	Pozitif
H58	2A	Pozitif	Pozitif
H59	2A	Pozitif	Pozitif
H60	2B	Pozitif	Pozitif
H61	2B	Pozitif	Pozitif
H62	2B	Pozitif	Pozitif
H63	2B	Pozitif	Pozitif
H64	2C	Pozitif	Pozitif
H65	3B	Pozitif	Pozitif

Çizelge 4.6. İzolatlara ait biyokimyasal aktivite test sonuçları(Devamı)

İzolat No	Yer No	Katalaz Testi	Amilaz Testi
H66	3B	Pozitif	Pozitif
H67	3B	Pozitif	Pozitif
H68	3B	Pozitif	Pozitif
H69	3B	Pozitif	Pozitif
H70	3B	Pozitif	Pozitif
H71	3B	Pozitif	Pozitif
H72	3B	Pozitif	Pozitif
H73	3B	Pozitif	Pozitif
H74	3C	Pozitif	Pozitif
H75	3C	Pozitif	Pozitif
H76	3C	Pozitif	Pozitif
H77	3C	Pozitif	Pozitif
H78	3C	Pozitif	Pozitif
H79	3C	Pozitif	Pozitif
H80	3C	Pozitif	Pozitif
H81	3C	Pozitif	Pozitif
H82	3C	Pozitif	Pozitif
H83	3C	Pozitif	Pozitif
H84	3C	Pozitif	Pozitif

4.4. Bakteriyeel İzolatların DNA İzolasyon Sonrası Ölçülen DNA Yoğunlukları

İzolat No	Mevki	Örneklem Türü	DNA Yoğunlukları
H ₁	1A	Sürgün çiçek	256,8 ng/ml
H ₅	1B	Yaprak+ Çiçek	303,9 ng/ml
H ₇	1B	Yaprak+ Çiçek	283,4 ng/ml
H ₈	1C	Toprak+ Çiçek	178,8 ng/ml
H ₁₈	2A	Sürgün çiçek	288,7 ng/ml
H ₂₆	2C	Yaprak+ Toprak	278,9 ng/ml
H ₂₇	2C	Yaprak+ Toprak	244,9 ng/ml
H ₃₁	2A	Sürgün çiçek	281,7 ng/ml
H ₃₃	2A	Sürgün çiçek	147,6 ng/ml
H ₃₄	2A	Sürgün çiçek	265,0 ng/ml
H ₃₅	2B	Sürgü çiçek+ Toprak	257,0 n/ml
H ₃₇	2B	Sürgün çiçek+ Toprak	201,6 ng/ml
H ₃₉	2C	Yaprak+ Toprak	257,4 ng/ml
H ₄₀	2C	Yaprak+ Toprak	388,6 ng/ml
H ₄₂	2C	Yaprak+ Toprak	306,5 ng/ml
H ₅₇	2A	Sürgün çiçek	271,6 ng/ml
H ₆₅	3B	Toprak	299,5 ng/ml
H ₇₇	3C	Yaprak+ Toprak	398,9 ng/ml
H ₈₀	3C	Yaprak+ Toprak	289,2 ng/ml

Çizelge 4.7. İzolatların ölçülen DNA yoğunlukları

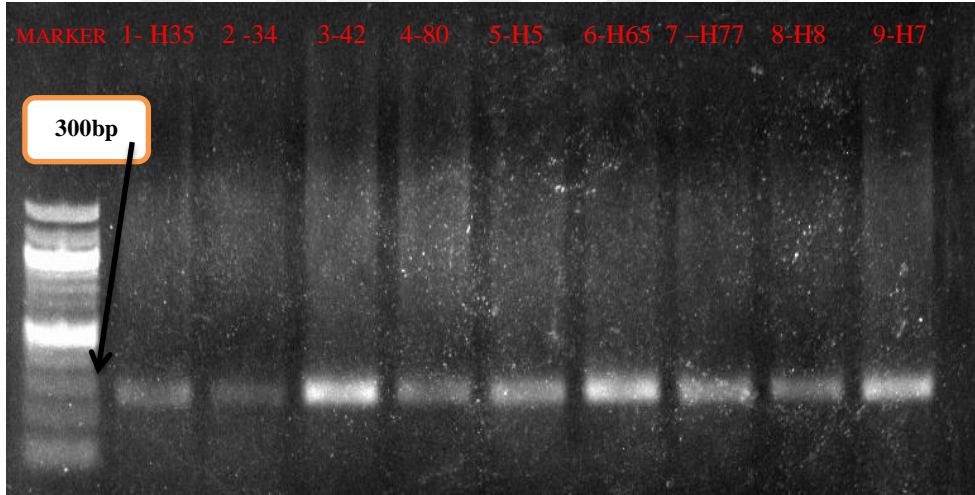
4.5. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Cry Gen Agoroz Jel Elektroforez Yürütme Sonuçları

AGE yürütmelerinde kontrol olarak SENTEGEN Biotech tarafından sağlanan *B.t* primerleri olan Cry1, Cry2, Cry3, Cry4 kristal protein içeren (*Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki) genleri kullanılmıştır.

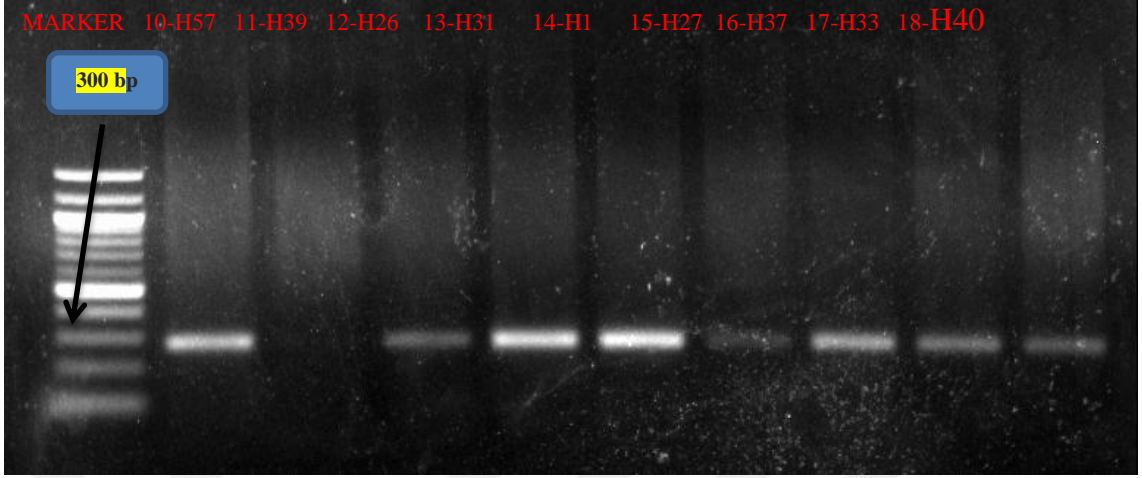
Kontrol olarak kullanılan *B.t* Cry1 geni bağlanma sıcaklığı 66°C ve baz uzunluğu 277 - 300 bp, Cry2 geni bağlanma sıcaklığı 61 °C ve baz uzunluğu 689-701 bp, Cry3 geni bağlanma sıcaklığı 55°C ve baz uzunluğu 589-604 bp, Cry4 geni bağlanma sıcaklığı 48°C ve baz uzunluğu 498 bp şeklindedir.

Cry1 geni 19 bant içerisinde 18 bant oluşturmuştur.

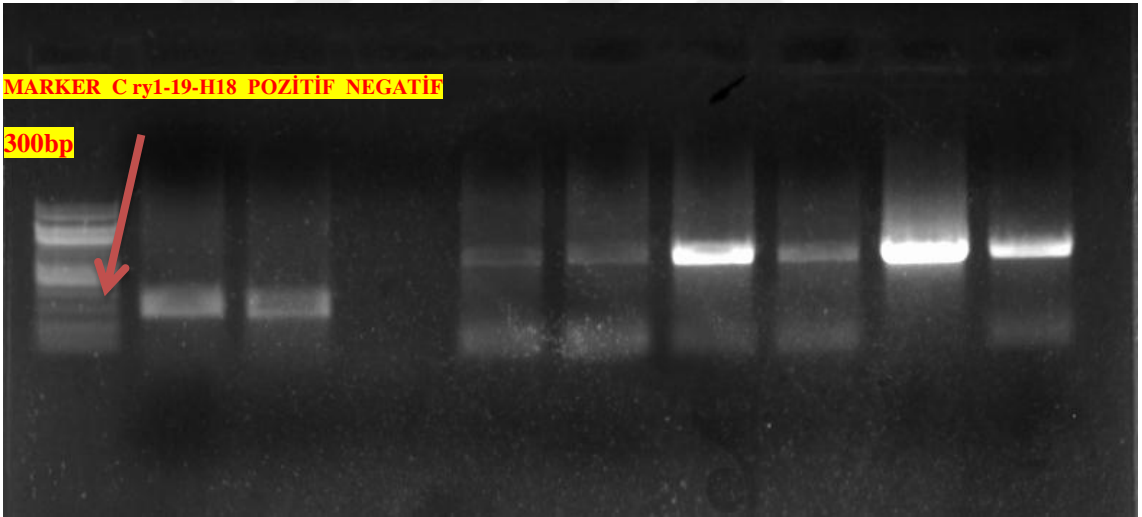
Sadece H₃₉ izolatında Cry1 geni bant oluşturmamıştır.



Şekil 4.5.1. (a) 277-300 baz uzunluğu ile görünen Cry1 geni

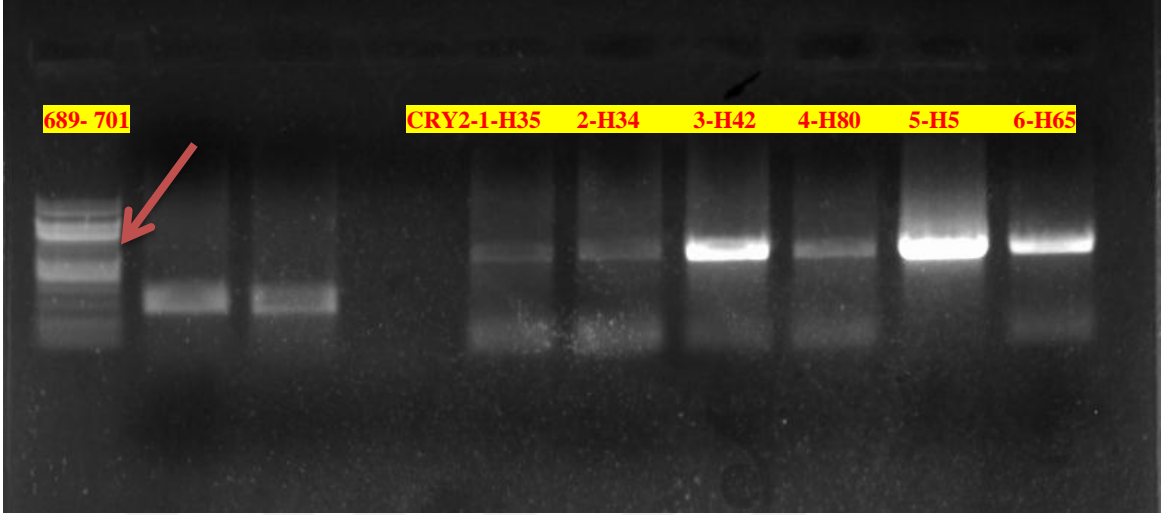


Şekil 4.5.1.(b) 277-300 baz uzunluğu ile görünen Cry1 geni

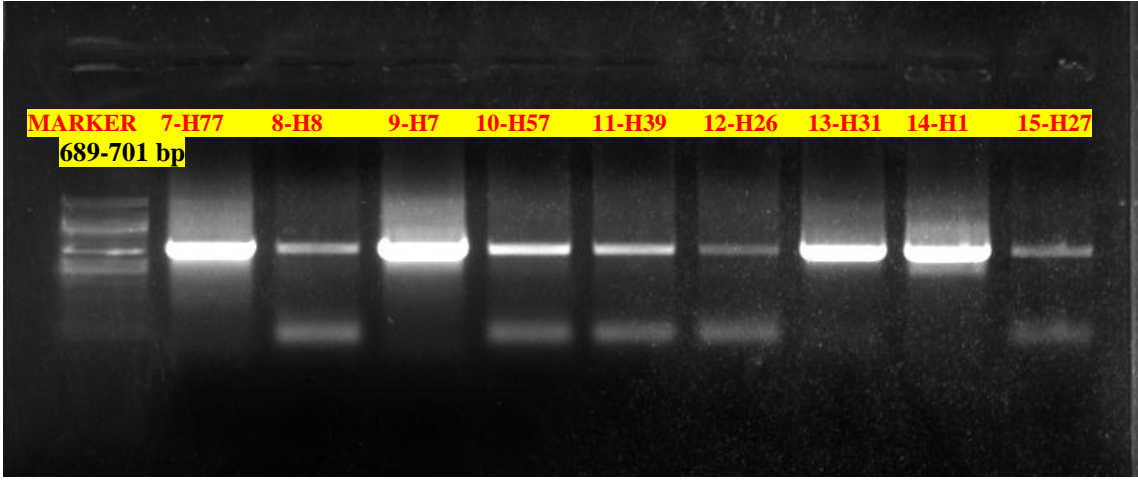


Şekil 4.5.1.(c) 277-300 baz uzunluğu ile Cry 1 geni (üzeri yazılı olanlar) Pozitif *B.t.* (*Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki).

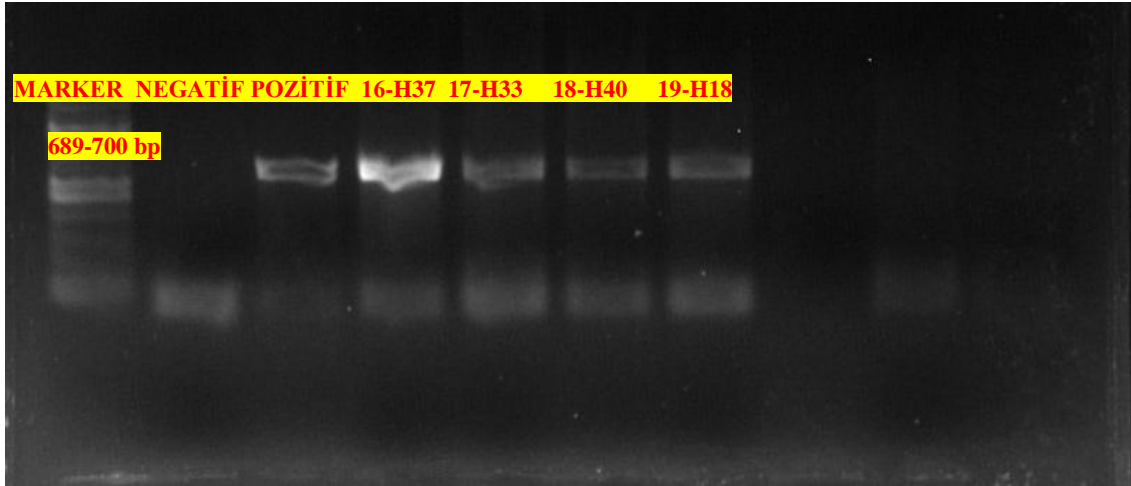
Kontrol olarak kullanılan Cry2 geni 19 bant içerisinde 19 bant oluşturmuştur.



Şekil 4.5.2. (a) 689-701 bant uzunluğu ile Cry2 geni



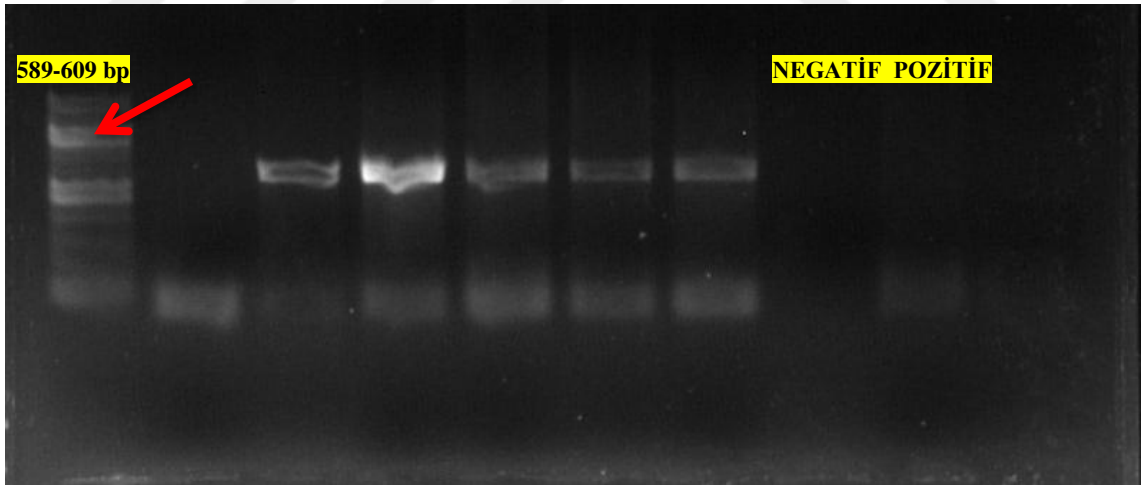
Şekil 4.5.2. (b) 689-701 bant uzunluğu ile Cry2 geni



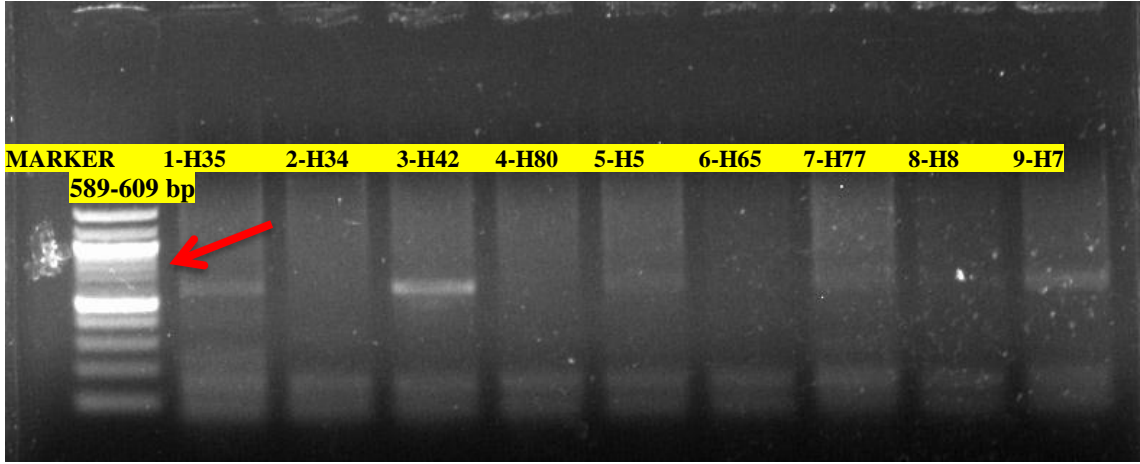
Şekil 4.5.2. (c) 689-701 bant uzunluğu ile Cry2 geni, Pozitif *B.t* :(*Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki).

Kontrol olarak kullanılan Cry3 geni 19 izolat içerisinde 9 bant oluşturmuştur.

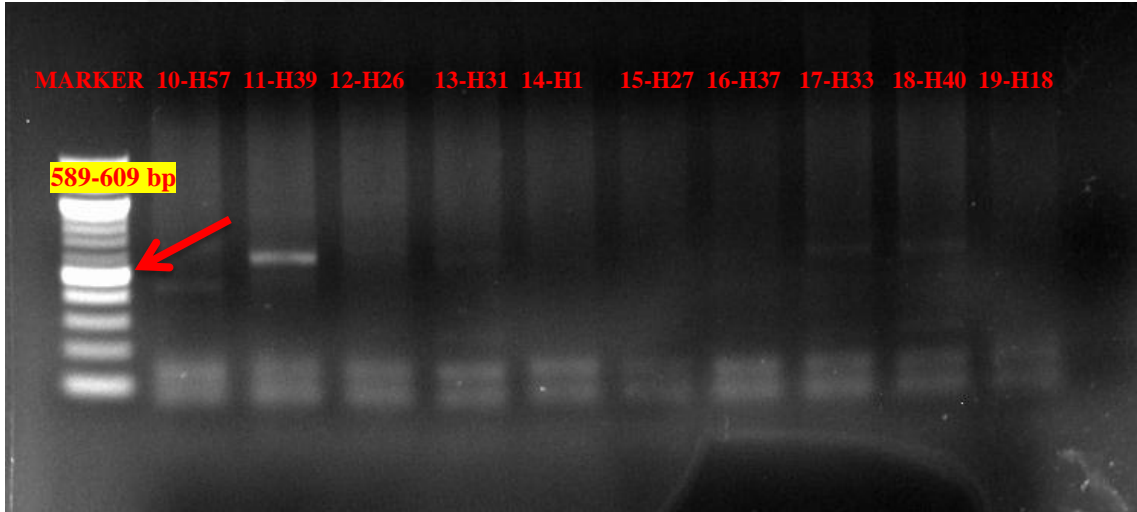
H₃₄, H₈₀, H₆₅, H₈, H₅₇, H₂₆, H₁, H₂₇, H₃₇, H₁₈ izolatlarında Cry3 genine rastlanmamıştır.



Şekil 4.5.3. (a) 589-609 bant uzunluğu ile Cry3 geni, Pozitif *B.t*:(*Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki).



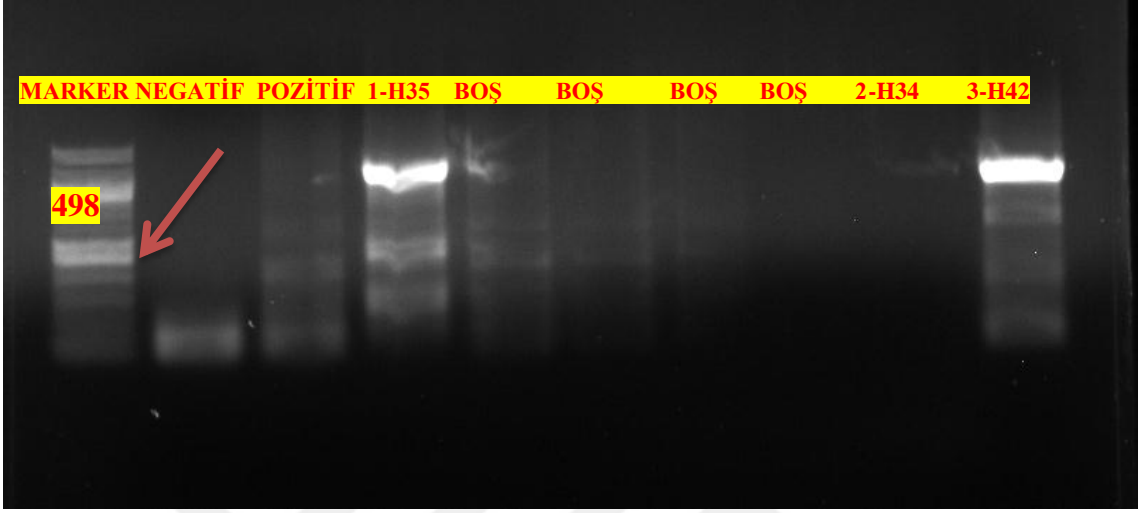
Şekil 4.5.3. (b) 589-609 bant uzunluğu ile Cry3 geni



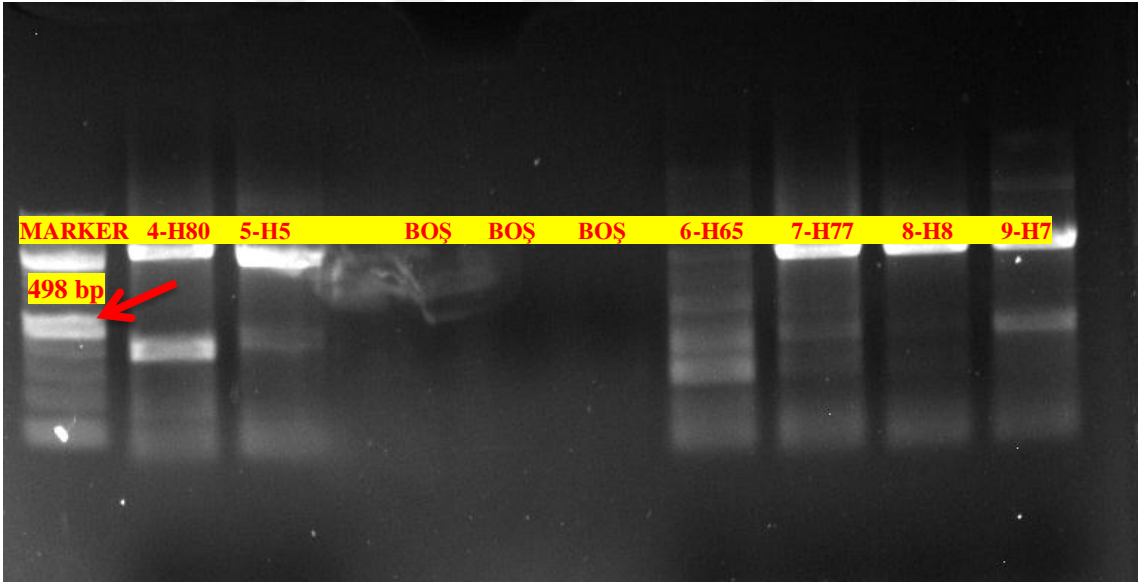
Şekil 4.5.3. (c) 589-609 bant uzunluğu ile Cry3 geni

Kontrol olarak kullanılan Cry4 geni 19 izolat içerisinde 16 bant oluşturmuştur.

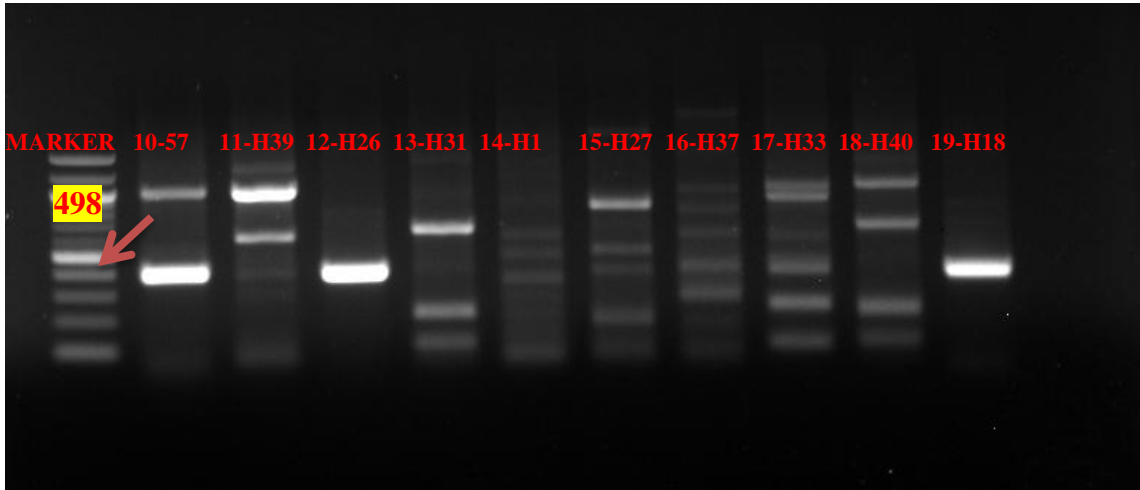
H₃₄, H₃₁, H₄₀ izolatlarında Cry4 genine rastlanmamıştır.



Şekil 4.5.4. (a) 498 bant uzunluğu ile Cry4 geni, Pozitif *B.t* :(*Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki).



Şekil 4.5.4. (b) 498 bant uzunluğu ile Cry4 geni



Şekil 4.5.4. (c) 498 bant uzunluğu ile Cry4 geni

İzolatların Cry1, Cry2, Cry3, Cry4 genlerini içeren/içermeyen sonuçları Çizelge 4.8.'de gösterilmiştir.

İzolat Sayı	İzolat No	Yer No	Örnek	Yer Mevki	Cry1 Geni	Cry2 Geni	Cry3 Geni	Cry4 Geni
1	H ₃₅	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı	+	+	+	+
2	H ₃₄	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı	+	+	--	--
3	H ₄₂	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı	+	+	+	+
4	H ₈₀	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı	+	+	--	+
5	H ₅	1B	Yaprak+Çiçek	Çıkacak	+	+	+	+
6	H ₆₅	3B	Toprak	Elvanlı	+	+	--	+
7	H ₇₇	3C	Yaprak+Toprak	Elvanlı	+	+	+	+
8	H ₈	1C	Toprak+Çiçek	Çıkacak	+	+	--	+
9	H ₇	1B	Yaprak+Çiçek	Çıkacak	+	+	+	+
10	H ₅₇	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı	+	+	--	+
11	H ₃₉	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı	--	+	+	+
12	H ₂₆	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı	+	+	--	+
13	H ₃₁	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı	+	+	+	--
14	H ₁	1A	Sürgün çiçek	Çıkacak	+	+	--	+
15	H ₂₇	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı	+	+	--	+
16	H ₃₇	2B	Sürgün çiçek+Toprak	Çarkçılı	+	+	--	+
17	H ₃₃	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı	+	+	+	+
18	H ₄₀	2C	Yaprak+Toprak	Çarkçılı	+	+	+	--
19	H ₁₈	2A	Sürgün çiçek	Çarkçılı	+	+	--	+

Çizelge 4.8. Cry1, Cry2, Cry3, Cry4 protein genlerini içeren bakteri izolatları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tartışma

Dünya nüfusunun milyarların üzerinde olduğu şu dönemde artan nüfus dünya coğrafyasında yaşam alanının gereksinimini zorunlu kılmaktadır. Bu zorunluluk var olan orman, tarla, bahçe ve yeşil olarak değerlendirilen birçok farklı bölgenin yerleşim yerlerine dönmesine neden olmaktadır. Söz konusu alanların daralması doğal bitki ortamını da yok etmektedir. Doğal ortamın yok olması içindeki bakteri, mantar, böcek vb. canlı organizmalarında ortamdaki yok olması demektir.

Doğal ortamı koruma amacıyla dünya üzerinde birçok çalışma ve projeler yürütülmektedir. Bu çalışmalar kapsamında biyolojik mücadele ve biyolojik kontrol önemli bir yer tutmaktadır. Doğal biyolojik mücadele; ortamda bulunan zararlılara karşı bitki korumasını sağlamak amacıyla kimyasal ilaç kullanımını yok edecek kadar azaltan zararlılara karşı onlarla beslenen biyoinsektisitler; predatörler, parazitoid böcekler, omurgasızlar, feromonlar, omurgalılar, böcek büyüme düzenleyicileri vb. organizmaların kullanıldığı yöntemdir. Biyolojik kontrol; bitkileri korumak amacıyla uygulanan prosedürü, ek koruma yöntemlerine tabi tutmak ancak bu koruma için kimyasal, zararlı ilaçları kullanmak yerine tamamı ile doğal ilaç ve predatörlerin kullanıldığı uygulama biçimidir.

Kimyasal ilaçlama, tarımsal alanda zaman ve ekonomik durum göz önüne alındığında en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Ancak ekonomik durum ve ürünün kalitesinin zamanında olması için yapılan bu yöntem, organizmanın üzerinde etkisini giderek azaltmaktadır. Organizma ilaçlara karşı direnç kazanırken bir yandan da farklı zararlı organizmaların gelişmesine neden olmaktadır.

Biyolojik ilaçlama olarak nitelendirdiğimiz insektisitlerin etki mekanizmaları neredeyse aynıdır. Etki dereceleri farklılık göstermektedir. Faydalı olarak kabul edilen predatör ve parazitler insektisitlerden daha çok etkilenmektedirler. Ancak böceklerdeki dayanıklılık, predatör ve parazitlerden daha hızlı olmaktadır. Bunun sonucunda dayanıksız olan parazit ve predatörler ortamdaki elenmektedir. Doğal ortamda predatörü olmayan zararlılar ise daha çabuk yayılmakta ve üremektedir(Ecevit, 1988). Doğal denge kendiliğinden bozulmakta ve yeni türlerin oluşmasına izin vermektedir. Bu durum gelişen farklı zararlı durumuna göre yeni ilaçlama yapılmasını zorunlu kılmaktadır (Ünal, 1998).

Dođal biyolojik m¼cadele ilk uygulandığı d¼nemde ekonomik y¼nden pahalı olsa da zamanla ve uygulamaların çoğunluğu sağlandığında zararı karşılamaktadır. Kimyasallara g¼re daha uzun soluklu olması ve zararlıyı direkt öld¼rmesi yön¼nden olukça önemlidir. Biyolojik yöntemle bire bir zararlıyı öld¼rmek her deneyde gerçekleşmese de zararlının üreme güc¼nü ve yetisini oldukça aza indirgemektedir. Biyolojik m¼cadelenin tam bilgi birikimi ile uygulamasının yapılması, kimyasallara g¼re daha uzun süre de sonuç alma gibi negatif sonuçları da bulunmaktadır. Biyolojik m¼cadelenin en önemli kısmı zararlı üzerine kullanılacak olan ajanın sečilmesi, izole edilmesi, karakterizasyonu ve seri olarak üretiminin ve/veya ticari olarak satışıının yapıyor olması gerekmektedir. Biyolojik ajan olarak kullanılan organizmalar entomopatojen olarak adlandırılmaktadır.

En yaygın kullanılan entomopatojen ajan, biyolojik savaş için en uygun yöntem ve basamak içerisinde *Bacillus thuringiensis* Berliner bakterisi yer almaktadır. Bir zararlının yok olmasını sağlarken diğer tüm yararlı organizmaların ortadan kaldıran yöntemlerin tersine *B.t* zararlıları yok ederken doğal florasında ortamını korumaktadır. Zararlının biyolojik olarak savaşımında *B.t* çok az direnç oluşturmakta ve kullanıldığı organizma üzerinde tersinir sonuçlar oluşturmamaktadır. Yeni suşlarının kolay izole edilmesi, iğerdiği ICP genlerinin spesifik özellik göstermesi, inaktif durumda olması ve zararlı vücudunda aktif hale gelerek öld¼r¼c¼ etki yapması *Bacillus thuringiensis* tür¼nü gözde entomopatojen ajan yapmıştır. İnsektisit satışları son zamanlarda oldukça artmıştır. Ama bu toplam satışın % 1-1,5'lik kısmına denk gelmektedir. Bu dilimin neredeyse tamamını (% 95) *Bacillus thuringiensis* kökenli insektisitler oluşturmaktadır (Gaugler, 1997 ve Georgis, 1997). *B.t* bakterileri *Bacillus cereus* grubuna dahildirler. Daha çok Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera grubundaki böceklere karşı etkilidirler(Beegle ve Yamamoto, 1992).

Yapılan çalışma da *B.t* tür¼ bakteriler üç farklı istasyondan belirlenen yöntemlerle izole edilmiştir. İzolasyon aşamasında bakterilerin kontamine olamaması için uygun sıcaklık sağlanmış, steril aletler kullanılmış ve saf izolatların elde edilmesi sağlanmıştir. Entomopatojen olarak adlandırılan bakteriler spor oluşturma özelliklerinden dolayı bu gruba dahildirler. Spor oluşumu içinde kullanılan sıcaklık protokol¼(80 °C ve 100 °C) 'dir.

Çalışma neticesinde 84 izolatın faz kontrast mikroskop gözlemleri ile belirlenen morfolojik özellikleri ve biyokimyasal test analizleri itibarıyla *B.t* türüne benzeyenler seçilmiş ve sonraki toksin gen taramalarında 19 izolatın kristal toksin genini taşıdığı tespit edilmiştir. Genetik analizlerde izolatların 6 'sında 4 farklı Cry geni tespit edilmiştir. Bir izolat içerisinde 4 farklı Cry gen olması, toksinin kullanılacağı bitkisel zararlının direnç geliştirmesini azaltarak ilgili toksinin daha uzun vadede kullanımını sağlayacağı düşünülebilir.

Dünyada ve ülkemizde yeni bakteriyel pestisitlerin araştırılarak bulunması geçmişte, günümüz ve gelecekte de artarak devam edecektir *B.t* izole edilmekte ve insektisit özelliğinin belirlenmesi için farklı organizmalar üzerinde kullanılmaktadır. Örneğin, Ordu ilinden *Bacillus thuringiensis* türleri izole edilmiş ve tarım zararlısı böcekler üzerinde öldürücü etkiye sahip olduğunu belirtilmiştir (Odabaş, 2011). Çalışmasında *Bacillus* türlerini izole etmiş ve mantarlar üzerinde antifungal etkilerini değerlendirmiştir (Azgın, 2013). Çalışmalarında Gaziantep İlinden arpa ve fiğ ekili topraklardan 121 adet *Bacillus sp.* izole etmiş 114 tanesine *Bacillus* cinsine özel 16S rRNA ürünüyle PCR ürünü verdiğini tespit etmiştir. Elde edilen bakterilerden ise *Escherichia coli* ve *Micrococcus luteus* gelişimini engellediğini gözlemişlerdir (Topçal ve ark, 2014). Diğer yandan farklı bir çalışma olan incir ve çekirdeksiz üzümde 508 tane *Bacillus* izole edilmiş ve sadece 184 tanesinde (%36) kitosanaz aktivite olduğunu belirlenmiştir (İmamoğlu, 2008). Çalışmasında *Bacillus* cinsine ait 12 bakterinin Ekzopolisakkarit üretim yeteneğini araştırmıştır. İncelediği suşlarda 0-143 mg/L arasında EPS ürettiğini belirlemiştir (Ergene, 2015).

Bu tez çalışmasında, elde edilen bakteriyel izolatların genetik yapıları incelendiğinde içerdiği ICP genleri ile bakterilerin biyolojik savaş adı altında yapılan çalışmalarda özgünlük yaratarak birçok farklı zararlı gruplarında çalışma olanakları bulacağını göstermektedir. Biyolojik savaşta amaç; hedef organizmanın hangi taksonomik kategoriye aitse büyüme ve gelişim dönemleri incelenerek zararlının her döneminde (nimf, pulpa, ergin ve kelebek vb.) farklı gelişim göstermesi durumuna göre uygulama metodu geliştirilerek söz konusu savaştan olumlu sonuçlar almaktır.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde biyolojik savaşın amacına uygun olarak tez çalışmasının bir sonraki aşaması, yani *B.t* izolatlarının limon zararlılarına karşı in vitro ve in vivo bioassay araştırmaları gerçekleştirilebilir. Elde edilecek verilere göre farklı gruplardaki diğer zirai bitki zararlılarında da benzer araştırmalar yapılabilecektir. Hedef

organizmayla aynı anda ve tek bir bakteri türünün toksinleriyle, zararlı ile mücadelede direnç gelişimini de azaltarak/öteleyerek etkiyi artırabilme imkânı elde edilmiş olacaktır. Bir kristal protein geninin etki mekanizması ve süresi, etki ettiği zararlının özelliği ve uyumu düşünüldüğünde bir bakteri içerisinde aynı anda 4 farklı Cry geninin bulunması zaman, maliyet ve verim açısından birçok farklı noktada yapılan çalışmalara avantaj kazandıracaktır.

Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlarda bakterilerin sahip olduğu koloni morfolojileri (Bej-Sarı-Parlak ve Mat-Beyaz) farklı olsa da ortak olarak ICP genlerini içerdiği tespit edilmiştir. Kazanılmış olan morfolojiler ile her zaman spor içeren bakteriye ulaşmak mümkün olmasa da bu çalışmada uygulanan 3 tekrarlı izolasyon uygulamaları ile etkin toksin protein ve sporlanmaya sahip *Bacillus* türlerine ulaştırılmış olduğu düşünülebilir. Çalışmanın daha büyük boyutlarda projelere açık olması ve temel veri niteliğinde olması; tez konusu kadar, araştırmanın başlangıç aşamasında farklı ısılarda tekrarlı izolasyonların uygulanması da çalışmayı özgün kılmıştır.

Sonuç olarak günümüzde birden farklı yöntem ve çalışmayla söz konusu bakteri, izolasyon aşamasından geçerek farklı canlılar üzerinde uygulanmaktadır. Bu çalışma kapsamında da elde edilen sonuçlara göre, elde edilen *B.t* izolatların, özellikle 6 adedi etki gücü itibariyle pestisit olarak kullanılma potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir.

5.2. Sonuç

Çalışmada, Mersin ili Erdemli ilçesine ait üç farklı lokasyonun farklı bölgelerine ait alanlardan izole edilen 84 izolatın belirli boyama ve testlere tabii tutulup tür tanımlaması yapılmıştır. 84 izolat içerisinde 19 tane *Bacillus thuringiensis* türü bakteriler tayin edilmiştir. SENTEGEN tarafından sağlanan kristal toksin gen taşıyan primerler (Cry1, Cry2, Cry3, Cry4) ve 19 izolat (H₁, H₅, H₇, H₈, H₁₈, H₂₆, H₂₇, H₃₁, H₃₃, H₃₄, H₃₅, H₃₇, H₃₉, H₄₀, H₄₂, H₅₇, H₆₅, H₇₇, H₈₀) ile bant uzunluğu karşılaştırması yapılmıştır. Sonuç olarak, 19 izolat içerisinde Cry 1 geni 18 izolatta görülmüştür. Bu izolatlar; H₃₅, H₃₄, H₄₂, H₈₀, H₅, H₆₅, H₇₇, H₈, H₇, H₅₇, H₂₆, H₃₁, H₁, H₂₇, H₃₇, H₃₃, H₄₀, H₁₈ olarak belirlenmiştir. 19 izolat içerisinde Cry2 geni 19 izolatta görülmüştür. Bu izolatlar; H₃₅, H₃₄, H₄₂, H₈₀, H₅, H₆₅, H₇₇, H₈, H₇, H₅₇, H₃₉, H₂₆, H₃₁, H₁, H₂₇, H₃₇, H₃₃, H₄₀, H₁₈ olarak belirlenmiştir. 19 izolat içerisinde Cry3 geni 9 izolatta görülmüştür. Bu izolatlar; H₃₅, H₄₂, H₅, H₇₇, H₇, H₃₉, H₃₁, H₃₃, H₄₀ olarak belirlenmiştir. 19 izolat içerisinde Cry4 geni 16 izolatta görülmüştür. Bu izolatlar; H₃₅, H₄₂, H₈₀, H₅, H₆₅, H₇₇, H₈, H₇, H₅₇, H₃₉, H₂₆, H₁, H₂₇, H₃₇, H₃₃, H₁₈ olarak belirlenmiştir. Tüm izolatlar içerisinde en az iki Cry geni bulunmaktadır.

Bugün yapılan birçok çalışmada sporlu bir bakteri içerisinde en az iki Cry geni bulunması, olası yapılacak çalışmaların önünü oldukça genişletmektedir. Bu tez çalışması baz alınarak elde edilen sonuçlar geniş kapsamda yapılan çalışmalara başlangıç olabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Agaisse, H. ve Lereclus, D., 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein. *Journal of Bacteriology*, Now. 177(21),6027-6032.
- Akgün, C., 2006. Turunçgiller sektör profili. Dış Ticaret Şubesi Uygulama Servisi <http://kobi.mynet.com/pdf/turunçgiller.pdf> (01.07.2006).
- Akkaya, E.S. ve Kıvanç, M., 2008. Termofil bakteriler; sıcak su kaynaklarında yaşayan Gr(+) basillerin izolasyon ve identifikasyon yöntemleri. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 02, 61-70.
- Alkan, B., 1953. Türkiye’de Narenciye (Turunçgil) Hastalık ve Zararlıları. Ziraat Fakültesi Yayınları:44,Yardımcı Ders Kitabı 21, Ankara, 98s.
- Alper, M., Güneş, H., Civelek, H.S., Oktay, D ve Eşkin, A., 2013. Doğal *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bacillales: Bacillaceae) izolatlarının *Tetranychus urticae* Koch (Acarina:Tetranychidae), *Ceroplastes rusci* L.(Homoptera: Coccidae) ve *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)’ya karşı toksik etkileri. *Türk Entomoloji Bülteni Dergisi*, 3(2), 75-87.
- Ammounh, H., Harba, M., Idris, E., Makee, H., 2011. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* Isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities some against insect pests. *Tur J Agric For*, 35,421-431.
- Anderson, A. J. ve Dawes, A. E., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Rev.*, 54 (4), 450-472.
- Anonim, 1991. Turunçgil Hastalık ve Zararlıları. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Narenciye Araştırma Enstitü Müdürlüğü, Genel Yayın no:15,Teknik Yayınlar:9,76s.,Antalya.
- Anonim, 1997. Akdeniz Bölgesinde Turunçgillerde Zirai Mücadele El Kitabı. TMMOB, Ziraat Mühendisleri Odası,81s.,Adana.
- Anonim, 1997. Turunçgil Bahçelerinde Entegre Mücadele Teknik Talimatı. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü.73s.
- Anonim, 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatı, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Cilt 5, 84s.
- Anonim, 2010. Ruhsatlı Bitki Koruma Ürünleri. T. C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü,398 s,Ankara.
- Anonim, 2011. Turunçgil Hastalık ve Zararlıları. T. C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü ve Karantina Daire Başkanlığı,44s,Ankara.
- Anonim, 2014. Turunçgil Yetiştiriciliği, Hastalık ve Zararlıları. Adana İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü ve Bitkisel Üretim ve Bitki Sağlığı Şube Müdürlüğü. Adana, 2,4-50s.
- Anonim, 2017. A’dan Z’ye Turunçgiller. *Türk Tarım Dergisi*. Kasım-243, 8-23s,Ankara.
- Arda, M., 2000. “Temel mikrobiyoloji”. Medisan Yayınları, Ankara.
- Arslan, S., 2010. *Lactobacillus rhamnosus* ’un Sünme (Rope) hastalığı etkeni olan *Bacillus* cinsi bakteriler üzerine inhibitör etkisinin unlarda araştırılması.(Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Aslım, B., Sağlam, N., Beyatlı, Y., 2002. Determination of Some properties of *Bacillus* Isolated from Soil. *Turk J Biol*, 26, 41-48.
- Aydın, A.A ve Aksoy, D.N., 2013. Çeşitli Gıda Atıklarından Selüloz Üreten Asetik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması. İstanbul Teknik Üniversitesi. Kimya Mühendisliği, *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 43(1):26-35.

- Azar, İ., 2008. Bursa’da Pazardan Alınan Limonlarda Bazı İnkstisit Kalıntılarının Saptanması Üzerine Çalışmalar.(Yüksek Lisans Tezi), Namık Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü/Bitki Koruma Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Azgın, F., 2013. Topraktan İzole Edilen Farklı *Bacillus* sp. Suşlarının Antifungal Etkinliklerinin Saptanması.(Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Azizoğlu, U., 2017. Hastalık Taşıyıcısı *Culex pipiens* (Diptera:Culicidae)’in Biyolojik Mücadelesinde Yerel *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Kullanılabilme Potansiyelinin Araştırılması. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7(1), 47-53.
- Bağcı ,H., Sharef, S.R ve Özdamar, K., 1991. *Bacillus Thuringiensis* varyetelerinin sınıflandırılmasında sayısal taksonominin uygulanması, Doğa Tr. of Biolog,5:70-81.
- Baltacı, Ö.M., 2015. Erzurum Mezbahalarından Toplanan İşkembe Örneklerinden Selülolitik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu Ve Moleküler Karakterizasyonu.(Yüksek Lisans Tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Erzurum.
- Başkaya , Y., 2016. Topraktan İzole Edilen Mikroorganizmaların Antimikrobiyal Madde Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi, 19(4),393-398.
- Bayram, S., 2015. Farklı Orijinlerden İzole Edilen Alkalifil ve Alkalitolerant Bakterilerin, Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi ve İzolatların Moleküler Karakterizasyonu.(Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Bilim Dalı, Erzurum.
- Beegle, C.C., Yamamoto, T., 1992. “History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development”. Can, Entomol., 124: 587-616 .
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N. and Margalith. Y., 1997 . “Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis*”. Appl. Environ. Microbiol., 63, 4883–4890.
- Boustanabadimaralan, N., 2014. *Bacillus thuringiensis* İle Çeşitli Boyaların Renk Giderimlerinin Araştırılması.(Yüksek Lisans Tezi), Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoteknoloji Anabilim Dalı , Ankara.
- Bozlağan, İ., Ayvaz, A., Öztürk, F., Açık, L., Akbulut, M., Yılmaz, S., 2010. Detection of the cry1 gene in *Bacillus thuringiensis* Isolates from agricultural fields and their bioactivity against two stored product moth larvae.Turk J Agric For,34,145-154.
- Bravo, A., Gill, S. S., Soberon, M., 2007. “Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control”, Toxicon, 49 (4): 423-435.
- Burke, Q. F., McDonald, K. O ve Davidson, E. W., 1983 . “Effect of UV light on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593”. Applied and Environmental Microbiology, 954-956.
- Chattopadhyay, A., Bhatnaga, N.B., Bhatnagar, R., 2004 “Bacterial Insecticidal Toxins”, Critical Reviews in Microbiology, 30.
- Çadircı, Ö., Gücükoğlu, A., Terzi, G., Kevenk, O.T., Alişarlı, M., 2013. Determination of Enterotoxigenic Gene Profiles of *Bacillus cereus* Strains Isolated from Dairy Desserts by Multiplex PCR. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi,19(5), 869-874.

- Çelikten, M., Bozkurt, İ.A., 2018. Buğday Kök Bölgesinden İzole Edilen Bakterilerin Buğday Gelişimine Olan Etkilerinin Belirlenmesi. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 23(1), 26-41.
- Demir, E., 2014. Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyosin Üretiminin Karakterizasyonu.(Yüksek Lisans Tezi), Adana Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı , Aydın.
- Demirtaş, B., 2005. Türkiye’de Limon Üretim Ekonomisi Ve Pazar Yapısı.(Doktora Tezi), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/ Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı, Adana.
- Dinç, N., Kenan , T. ve Salih, H., 1980. Akdeniz Bölgesi Limonlarında Görülen Uçkurutan Hastalığı (*Deuterophoma tracheiphila* (Petri) Kane, et Ghik.) ‘ nın Savaş Yöntemleri Üzerine Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, Cilt 21, No 2.
- 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.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları , 27, Samsun.
- Eltem, R., Uçar, F., 1998. “Bir soda gölü olan Denizli Acıgöl ’den izole edilmiş *Bacillus* suşunun antimikrobiyal aktivite spektrumlarının saptanması”, KÜKEM Dergisi, 21(1):57-64.
- Er, M.K ve Mart, C., 2009. Kahramanmaraş İlinde Belirlenen Bazı Entomopatojen Funguslar ve İlin Entomopatojen Fungus Kullanımı Bakımından Değerlendirilmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Doğa Bil. Dergisi, 12(2).
- Erem, F., Certel, M., Karakaş, B., 2009. Identification of *Bacillus species* Isolated from Ropey Breads both with Classical Methods and Apı Identification Kits. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 22(2), 201-210.
- Eren, Ö., 1996. “*Bacillus* sp. suşlarında antibiyotik, selulaz ve amilaz üretiminden sorumlu genlerin protoplast transformasyon tekniği ile Gram (+) bakterilere transferi ve ekspresyon düzeyinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Ergene, E., 2015. Bazı *Bacillus* suşları ile Melastan Ekzopolisakkarit Üretim Koşullarının Optimizasyonu.(Yüksek Lisans Tezi), Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/Gıda Mühendisliği, Sakarya.
- Evrendilek, F., 2004. Ekolojik Sistemlerin Analizi, Yönetimi ve Modellenmesi. Papatya Yayınları, 208s, Türkiye.
- Gaugler, R., 1997. Alternative Paradigms for Commercializing Biopesticides, *Phytoparasitica*, 25, 179-182.
- Gaugler, R., Lewis , E., Stuart , R. J 1997. Ecology in the service of biological control: The case of entomopathogenic nematodes .*Oecologia*, 109, 483-489.
- Georgis, R., 1997. Commercial Prospects of Microbial Insecticides in Agriculture, In “Microbial Insecticides: Novelty or Necessity?” (Evans, H. F., Chair), Proc. Br. Crop. Prot. Council Symp., 68, 243-252.
- Höfte, H and Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *American Society for Mikrobiology*, 53(2), 242-255.
- Höfte, H., Whiteley, H.R., 1989. “Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*”, *Microbiol. Rev.*, 53: 242-255.
- İmamoğlu, Ö., 2008. Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen *Bacillus sp.* İzolatlarının Kitosanaz Aktivitesinin ve Antifungal Etkisinin Belirlenmesi.(Doktora Tezi). Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir.

- Johnvesly, B. ve Naik, G. R., 2001. "Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium", *Process Biochemistry*, 37:139-144.
- Kalaylı, E., Beyatlı, Y., 2003. *Bacillus* cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA'ları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 01(12):24-35.
- Karakuş, Y., Sertel, A., Duman, Y. ve Polat, F., 2018. Endüstriyel Enzimler Üreten *Bacillus* İzolatlarının Morfolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 75(49),353-364.
- Karataş, E. ve Alaoğlu Ö., 2011. Manisa İlinde Üreticilerin Bitki Koruma Uygulamaları. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*,48(3),183-189.
- Katı, H., Karaca, B ve Gülşen, Ş.H., 2016. Toprakdan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması ve Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 20(2),281-290.
- Kedici, R. Melan, K ve Bulut, H., 1998. *Bacillus thuringiensis* 'li preparatların tarla ve laboratuvar şartlarında Patates böceği [*Leptinotarsa decemlineata* (Say)] larvalarına etkileri üzerine araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni Dergisi*. 38(3-4),135-153.
- Kersting, U., Özden,Ö., 2001. Turunçgil Zararlıları Akdeniz İhracatçı Birlikleri,70s,Mersin.
- Kılıçer, H.R ve Özcan, D.B., 2013. Yem Katkısı Selülaz Enzimlerini Üreten Termofilik *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu.Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,17(4),1-8.
- Kocabaş, A., Gümüştas, N., Gönek, S., 2017. Toprakdan Ksilanaz Üreten Mikroorganizmaların Taranması ve Ksilanazın Kısmi Karakterizasyonu. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*. 7(2),503-508.
- Maniatis, T., Fritsh, E. F. and Sambrook, J., 1989. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1-25.
- Mark, E.W., Byron, A.W., 2003. "Bt: Mode of Action ve Use", *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54: 200–211.
- Marul, B., 2007. Fabrika Atıklarından İzole Edilen *Bacillus sp.* 'den Aktif Ve Kararlı Lipaz Üretim Koşullarının Ve Üretilen Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanımının Araştırılması.(Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü /Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Odabaş, D., 2011. Ordu İli ve İlçelerinden Toplanan Toprak Numunelerinden *Bacillus Sp.* Suşlarının İzolasyonu ve İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.(Yüksek Lisans Tezi) Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı , Ordu.
- Özdoğan, H., 2007. Çeşitli Et Örneklerinden İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması, Proteolitik Ve Lipolitik Enzim Aktivitelerinin Araştırılması.(Yüksek Lisans Tezi), Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı , Ankara.
- Öztürk, A., Çakmakçı, M.L., 2003. Bazı Böcek Patojeni *Bacillus* İzolatlarının Serolojik Olarak Tanımlanması. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 16(1):1-7.
- Öztürk, F., Açık, L., Ayvaz, A., Bozdoğan, B. ve Suludere, Z., 2008. Toprakdan Doğal *Bacillus thuringiensis* Suşlarının İzolasyonu, Karakterizasyonu ve *Ephestia Kuehniella Zeller* (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarına Karşı Biyolojik Aktivitesi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 33(4), 202-208.
- Öztürk, F., 2007. Ankara'daki Toprakdan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması, Moleküler Düzeyde Tiplendirilmesi ve Biyolojik Aktivitelerinin

- Belirlenmesi.(Doktora Tezi), Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Öztürk, F., Açık, L. ve Ayvaz, A., 2008. Toprakta İzole Edilen *Bacillus Thuringiensis* İzolatlarının cry2 Genlerinin Belirlenmesi Ve Lepidoptera Larvaları Üzerine Olan İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi. Trabzon.
- Rajamohan, F., Alzate, O., Cotrill, A. J., Curtiss, A ve Dean, H.D., 1996. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin: Mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. Department of Biochemistry, and Biophysics Program, The Ohio State University, Vol. 93pp. 14338–14343.
- Rajamohan, F., Cotrill, A., Goulds ve Dean, D.H, 1996. Role of Domain II, Loop 2 Residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb α -Endotoxin in Reversible and Irreversible Binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. The Journal Of Biological Chemistry, Vol.271,No.5, Issue of February 2, pp. 2390-2396.
- Rajamohan, F., Lee, K.M., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* İnsecticidal Proteins: Molecular Mode of Action.Progress in Nucleic Acid Reserarch and Molecular Biology, Kivie Moldave.Sciencedirect,nNetherlands,1-27.
- Raymond, B., Johnston, P.R., Nielsen-Le Roux, C., Lereclus, D., Crickmore, N., 2010. *Bacillus thuringiensis*: An Impotent Pathogen, Trends in Microbiol., 18(5), 189-194.
- Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I. ve Chambliss, G. H., 1998. “*Bacillus*, topley and Wilson’s microbiology and microbial infections, systematic, bacteriology, by edited L. Collier, A. Balows and M. Susman”, Oxford University Press, Ninth Edition, New York, 2:5-193.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev 62:775-806.
- Sharif, A.F. ve Alaeddinoğlu, N.G., 1988. A Rapid And Aimple Method For Staining Of The Crystal Protein Of *Bacillus thuringiensis*. Journal Of Industrial Microbiology.June.3,227-229.
- Sneath, P. H. A., 1986. “Endospore-forming gram positive rods, and cocci, Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, edited by P. H. A. Sneath, N. S., Mair, M. E., Sharpe, J. G. Holt”, Williams and Wilkins, Baltimore, 2:1104-1139.
- Soylu, O.Z., 1980. Akdeniz Bölgesi Turunçgillerinde Zararlı Olan Turunçgil Beyaz Sineği (*Dialeurodes Citri Ashmead*)’nın Biyolojisi ve Mücadelesi Üzerine Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni Dergisi, 20,1-4.
- Soylu, Z.O. ve Ürel, N., 1977. Güney Anadolu Bölgesi Trunçgillerinde Zararlı Böceklerin Parazit Ve Predatörlerinin Tesbiti Üzerine Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni Dergisi, 17, 2-4.
- Şahin, B., Çöl, B., Güneş, H., 2017. *Bacillus thuringiensis* Isolation from the Environments of Boron Mines and Effects of Boric Acid on Bioactivity. Gazi University Journal of Science.30(1),223-234.
- Tağa, Ö. ve Bilgin, B., 2008. Ege ve Akdeniz Bölgelerinde Yetiştirilen Narenciye Ürünlerindeki Pestisit Kalıntı Düzeylerinin Belirlenmesi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.
- Taubman, S., 1992. “Genus *Bacillus*”, Contemporary Oral Microbiology and Immunology, 355-356 .
- Topaktaş, M., 2018. Moleküler Genetik. Akademisyen Kitapevi, 544s, Türkiye.

- Topçal, F., Dığrak, M., Gündoğan, R., 2014. Topraktan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması ve Bakteriosin Üretimlerinin Belirlenmesi. Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi,4(2),57-67.
- Tunail, N. ve Köşker, Ö., 1986. “Süt mikrobiyolojisi”, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 966:138.
- Tunail, N., Köşker, Ö., “Süt mikrobiyolojisi”, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 966:138 (1986).
- Tuncer, C., Ecevit, O., (1994). *Bacillus thuringiensis* Ürünleri ve Böceklerde Dayanıklılığın Önemi. Türkiye Entomoloji Dergisi,18(2):119-128.
- Tuncer, C., Ecevit, O., 1994. *Bacillus thuringiensis* Ürünleri ve Böceklerde Dayanıklılığın Önemi. Türkiye Entomoloji Dergisi,18(2):119-128.
- Ünal, G., 1998. Zirai Mücadele İlaçları Toksikolojisi ve Çevre, Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü Seminer Notları, Ankara.
- Walker, K., M. Mendelsohn, S., Matten, M., Alphin & D. Ave., 2003. “The Role of Microbial Bt Products in U.S. Crop Protection, 31-51”. In: *Bacillus thuringiensis: A Cornerstone of Modern Agriculture* (Ed: M. Metz). Food Products Press, pp242, USA.
- Yamamoto, T. ve McLaughlin, R. E., 1981. “Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki toxic to the mosquito larva *Aedes taeniorhynchus*”, Biochem. Biophys. Res. Commun, 103: 414-421.
- Yılmaz, M., 2003. “Topraktan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolic özelliklerinin belirlenmesi, plasmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi”, (Doktora Tezi), Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-20 .
- Yousten, A.A ve Rogoff, H.M., 1969. Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in Relation to Spore and Crystal Formation. Journal of Bacteriology.100(3), 1229-1236.
- Yousten, A.A ve Rogoff, M.H., 1969. Metabolism Of *Bacillus thuringiensis* İn Relation To Spore And Crystal Formation. Journal Of Bacteriology,December.Vol.100,No.3.,1229-1236.
- Zümreoğlu, A., 1996. Turunçgil Zararlıları ile Mücadele Örnekleme Yöntemleri Ve Ekonomik Zarar Eşikleri. Türkiye Bitki Koruma Dergisi,10(4),245-257.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı soyadı	Halime BALCI
TC Kimlik No	1519361088
Doğum Tarihi ve Yeri	24.04.1989 –Erdemli/MERSİN
Yabancı Dili	İngilizce
Email	balcihalime0@gmail.com b.halime@outlook.com.tr

Eğitim Bilgileri

DERECE	EĞİTİM BİRİMİ	BÖLÜM	MEZUNİYET
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi, TOKAT	Biyoloji ABD	2019
Lisans	Ondokuzmayıs Üniversitesi, SAMSUN	Biyoloji Öğretmenliği, Eğitim Fakültesi	2015
Ön Lisans	Harran Üniversitesi, ŞANLIURFA	Gıda Teknolojisi	2010-Terk
Lise	Kargıpınarı Anadolu Lisesi, MERSİN	Fen Bilimleri	2006

