



**BAZI ENTOMOPATOJEN *BACILLUS*  
TÜRLERİNİN İZOLASYONU  
VE KARAKTERİZASYONU**

**ÜZEYİR SÖYLEMEZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI  
Doç. Dr. Necibe Canan USTA**

**Aralık - 2018**

**Her hakkı saklıdır**

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI ENTOMOPATOJEN *BACILLUS* TÜRLERİNİN  
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

ÜZEYİR SÖYLEMEZ

TOKAT  
Aralık - 2018

Her hakkı saklıdır

Üzeyir SÖYLEMEZ tarafından hazırlanan “Bazı Entomopatojen *Bacillus* Türlerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 24 ARALIK 2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Doç. Dr. Necibe Canan USTA

Üye

Doç. Dr. Köksal PABUÇCU

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Gümüş Funda GÖKÇE

ONAY

Prof. Dr. Cetin ÇEKİC  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
24/12/2018



## **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.

**ÜZEYİR SÖYLEMEZ**

**24 Aralık 2018**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

### BAZI ENTOMOPATOJEN *BACILLUS* TÜRLERİNİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

ÜZEYİR SÖYLEMEZ

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

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

Bu çalışmada; entomopatojen özelliğe sahip *Bacillus* türü bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu için Amasya ilinde 5 farklı mevkide meyve bahçelerinden ve topraklarından örnekler elde edildi. Toplanan örneklerden Nutrient Agar ortamında sporlanma özelliği olan 29 Gram-pozitif bakteri izolasyonları yapıldı. Kolorimetrik ve mikroskopik identifikasyon neticesinde morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri (Gram +/-, hemoliz, indol, katalaz, oksidaz vb.) tanımlanarak *Bacillus* cinsine ait izolatlar belirlendi. Sonra, genetik tanımlama amaçlı 16s rDNA izolasyonları yapılarak türe spesifik gen analizleri ile beş *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) türü tanımlandı (%97-99). Pestisit geni varlığının araştırılması amaçlı, önceki aşamada tanımlanan *Bt* izolatlarının DNA izolasyonu sonrası takiben Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) analizi ve standard *Bt* pestisit suşu ile birlikte agaroz jel elektroforezi (AGE) yürütmeleri yapıldı. Moleküler tanımlama sonunda *cry* gen varlığı jel elektroforezinde bantlarla gözlemlenerek belirlenen iki *Bt* izolatımızın (US19 ve US20) biyolojik mücadelede kullanılabilir entomopatojen *Bacillus* türü izolatlar olabileceği gözlemlendi.

2018, 61 SAYFA

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

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

#### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SOME ENTOMOPATHOGEN BACILLUS SPECIES

ÜZEYİR SÖYLEMEZ

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOLOGY

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

In this study, for the isolation and characterization of the entomopathogenic *Bacillus* bacterial species, samples were collected from the fruit garden soils and diseased fruit trees from five different localities in Amasya. From the samples, 29 sporulating Gram-positive bacteria were isolated on Nutrient Agar culture media. Morphological, physiological and biochemical characteristics of them were identified (Gram+ , spores, hemolysis, indole, oxidase etc.). Later the *Bacillus spp.* were determined by using the standardized colorimetric identification system utilizing conventional biochemical tests. Later, 16s rDNA-based genetical identification of the *Bacillus thuringiensis (Bt)*. Were performed for reasons including its universal distribution among bacteria and the presence of species-specific variable regions in five isolates (%97-99 probabilities). PCR and agarose gel electrophoresis were applied to the identified *B. thuringiensis* isolates for determination of the presence of the pesticidal *cry* gene in the newly identified *Bt* isolates. The PCR product profiles showed the presence of pesiticial *cry* genes in two of the *Bt* isolates by comparison with our Standard *Bt* pesticide strain. After this molecular identification of the presence of *cry* genes as observed on the electrophoretic gel slabs, eventually, two new possible entomopathogenic *Bt* isolates (US19 and US20) to be used in a biological control, were obtained.

2018, 61 PAGE

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

## ÖNSÖZ

Çalışmalarım sırasında bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Necibe Canan USTA'ya ve değerli eşim Uzm. Bio. Ahsen Merve SÖYLEMEZ'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu tezi hazırlarken yardımını esirgemeyen; değerli ağabeyim Dr. Öğr. Üyesi Hakan İŞİDAN'a, Amasya'daki izolasyon ve laboratuvar çalışmalarında ki yardımlarıyla Biyolog Adnan PARLAK ve Uzm. Bio. Mustafa ÖZTÜRK kardeşlerime minnetle teşekkür ediyorum.

Hayatımın her aşamasında bana destek olan, varlıklarıyla bana güç veren mutluluğumun sebebi "AİLEM"e teşekkürü borç bilerek tezimi ithaf ederim.

**ÜZEYİR SÖYLEMEZ**  
**24 Aralık 2018**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER LİSTESİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>18</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>26</b>
3.1. Materyal .....	26
3.1.1. Bakteri örnekleri .....	26
3.1.2. Kimyasallar ve çözeltiler .....	26
3.1.3. Cihazlar .....	27
3.1.4. Çalışmada kullanılan primerler .....	28
3.2. Yöntem .....	29
3.2.1. Alınan örneklerden <i>Bacillus</i> cinsine ait bakterilerin izolasyonu .....	29
3.2.2. Bakteri tanımlamalarında kullanılan biyokimyasal ve fizyolojik testler .....	29
3.2.3. <i>Bacillus</i> türlerinin kolorimetrik tanımlaması .....	33
3.2.4. <i>Bacillus</i> izolatlarında yapılan moleküler testler .....	34
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>36</b>
4.1. Beş Farklı Bölgeden Alınan Örneklerden Bakteri İzolasyonu .....	36
4.1.1. Örneklem 1 (A) .....	36
4.1.2. Örneklem 2 (B) .....	36
4.1.3. Örneklem 3 (C) .....	37
4.1.4. Örneklem 4 (D) .....	37
4.1.5. Örneklem 5 (E) .....	38
4.2. İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik ve Mikroskopik Bulguları .....	39
4.3. İzole Edilen Bakterilerin Fizyolojik ve Biyokimyasal Aktivite Testleri .....	41



4.4. İzole Edilen Bakterilerin Kolorimetrik Tanımlamaları .....	42
4.5. İzole Edilen Bakterilerin 16s rDNA Sekans Analizi Sonuçları .....	43
4.6. 16s rDNA Sekans Analizi Neticesindeki Nükleotit Dizilimleri .....	44
4.7. <i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatların Cry Gen PCR ve Jel Elektroforezi .....	49
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>50</b>
5.1. Tartışma .....	50
5.2. Sonuç .....	51
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>53</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>61</b>



## SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\delta$	Delta
$\lambda$	Lambda
oC	Santigrad derece
bp	Baz Çifti
cry	Kristal
cyt	Sitolitik
dk	Dakika
gr	Gram
kg	Kilogram
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
L	Litre
McF	Mc Farland
$\mu$ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
Mbp	Mega baz çifti
mM	Milimolar
Md	Megadalton
M	Molar
N	Normal
rpm	Devir sayısı
%	Yüzde

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
AGE	Agaroz Jel Elektroforezi
AP	Amonyum per Sülfat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamit Tetra asetik asit
EtBr	Etidyum Bromür
ICP	İnsektisidal Kristal Protein
mRNA	Messenger (Haberci) Ribonükleik Asit
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Buyyon
PCR (PZR)	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
rDNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop
TCA	Triklor Asetik Asit
TAE	Tris Asetik Asit EDTA Tamponu
TE	Tris EDTA Tamponu
TEMED	Tetra Etilen Diamit
UV	Ultraviyole
VIP	Vejetatif İnsektisidal Potein

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1. <i>Bacillus cereus</i> türüne ait koloni morfolojisi .....	3
Şekil 1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> faz kontrast mikroskop görüntüsü .....	4
Şekil 1.3. <i>B. thuringiensis</i> 'in elektron mikroskop görüntüsü .....	5
Şekil 1.4. <i>Bacillus</i> türlerinde spor oluşumu .....	6
Şekil 1.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry1Aa proteininin yapısı .....	9
Şekil 1.6. Baklava dilimi şeklindeki kristal yapıların SEM görüntüsü .....	11
Şekil 1.7. <i>B. thuringiensis</i> 'in hedef böcek üzerindeki etki mekanizması .....	14
Şekil 3.1. Kanlı agarda Beta hemoliz zonlu koloniler .....	30
Şekil 3.2. Gram boyamada kristal viyole aşamasındaki preparatlar .....	31
Şekil 3.3. <i>Bacillus</i> tür tanımlaması yapılacak izolatların VITEK 2 cihazına yüklenmesi .....	33
Şekil 3.4. 16s rDNA PCR işlemi şematize gösterimi .....	35
Şekil 4.1. Agaroz Jel Elektroforez yürütmelerinde DNA bantları .....	43
Şekil 4.2. Agaroz Jel Elektroforez yürütmelerinde <i>cry</i> gen bantları .....	49

## ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Protoksinlerin ve toksinlerin moleküler büyüklüğü, multijenik yapısı ve etkilediği konakçı grupları .....	12
Çizelge 3.1. Bölge A örneklemi .....	36
Çizelge 4.2. Bölge B örneklemi .....	37
Çizelge 4.3. Bölge C örneklemi .....	37
Çizelge 4.4. Bölge D örneklemi .....	37
Çizelge 4.5. Bölge E örneklemi .....	38
Çizelge 4.6. Beş örneklem sonunda elde edilen izolatlar .....	39
Çizelge 4.7. İzolatlara ait makroskopik ve mikroskopik inceleme sonuçları .....	40
Çizelge 4.8. İzolatlara ait biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları .....	41
Çizelge 4.9. <i>Bacillus</i> türü izolatların VITEK 2 cihazı tanımlama sonuçları .....	42
Çizelge 4.10. <i>Bacillus</i> türü izolatların 16s rDNA analiz sonuçları .....	44
Çizelge 4.11(a). US20-A1 <i>Bacillus thuringiensis</i> baz dizilimi .....	44
Çizelge 4.11(b). US13-B4 <i>Bacillus cereus</i> , NA5 baz dizilimi .....	45
Çizelge 4.11(c). US10-B2 <i>Bacillus thuringiensis</i> baz dizilimi .....	45
Çizelge 4.11(d). US11-B2 <i>Bacillus thuringiensis</i> , GS2 baz dizilimi .....	45
Çizelge 4.11(e). US29-E10 <i>Bacillus pumilus</i> baz dizilimi .....	46
Çizelge 4.11(f). US27-E4 <i>Bacillus pumilus</i> , FJAT baz dizilimi .....	46
Çizelge 4.11(g). US28-E6 <i>Bacillus pumilus</i> baz dizilimi .....	46
Çizelge 4.11(h). US19-A1 <i>Bacillus thuringiensis</i> baz dizilimi .....	47
Çizelge 4.11(i). US2-A5 <i>Bacillus smithii</i> baz dizilimi .....	47
Çizelge 4.11(j). US7- A2 <i>Bacillus pumilus</i> baz dizilimi .....	47
Çizelge 4.11(k). US26-D5 <i>Bacillus thuringiensis</i> , INRS3 baz dizilimi .....	48
Çizelge 4.11(l). US17-D6 <i>Bacillus licheniformis</i> baz dizilimi .....	48

## 1.GİRİŞ

İnsanoğlu yaratılışından bugüne tarım ile yakın ilişki içerisinde. Dünyada bitki zararlılarında kalite ve ürün miktarının artırılmasına yönelik çalışmalar artarak devam etmektedir. Uygulanan sentetik/yarı sentetik bileşiklerin ve uygulama yöntemlerinin çevre üzerinde olumsuz etkiler meydana getirdiği bilinmektedir. Dünyada global çevre kirliliğinde ve biyoçeşitliliğın azalarak dengesinin bozunmasında sentetik/yarı sentetik kimyasal pestisitlerin önemi fark edildiğinden bugüne biyolojik/mikrobiyolojik pestisitlerin önemi artmıştır. Biyolojik kontrol, zararlı böcekler ile mücadele, kitle üremesi yapan veya yapma yeteneğinde olan böcek popülasyonlarının sayısının artmasını engellemek için gerçekleştirilen mücadele olarak bilinir. Bu amaçla uygulanan çeşitli mücadele yöntemleri vardır. Bu yöntemler; “Biyolojik/doğal mücadele kaynağınını Biyoloji ve Kimya gibi temel bilimlerden alan biyoteknolojik bir mücadele’dir. Biyolojik mücadele zararlı böcek popülasyonlarını ortadan kaldırmak yerine, zararlarını azaltmak için canlı organizmalar (mikroorganizmalar, predatörler, parazitoid böcekler, omurgasızlar, omurgalılar), feromonlar, böcek büyüme düzenleyicileri, bitkisel maddeler ve genetik kontrollerden faydalanılarak yapılan ekolojik ve ekonomik olmasının yanı sıra, oluşabilen karşı dirence de genetik rekombinasyon yöntemleri ile yeni alternatif toksin geliştirilebilmektedir (Demirbağ ve ark., 2008; Moar ve ark., 2017; Berry ve ark., 2018).

Biyolojik kontrolde prokaryotik ve ökaryotik birçok mikroorganizma türü kullanılmaktadır. Bunlar; bakteriler, virüsler, protozoa türleri ve nematodlardır. Bakteriyel pestisitler arasında en çok kullanılan biyolojik kontrol ajanları ise toprak grubu bakterileridir. Bu toprak grubu içerisinde yer alan *Bacillus* cinsi bakteriler Lepidoptera (kelebekler), Coleptera (kınkanatlılar) ve Diptera (sivrisinekler, sinekler) takımlarındaki böcekleri hedef aldıkları için önemli bir yer teşkil ederler (Suludere ve ark., 1992; Azizoğlu ve ark., 2012).

### Bacillus'ların Taksonomisi

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

### Bacillus'ların Genel Özellikleri ve Önemi

Günümüzde entomopatojen olarak olarak yaklaşık 100 den fazla bakteri türü tanımlanmıştır ancak, bunlar içerisinde ticari bakımdan *Bacillus* türleri mücadele ajanı olarak tercih edilmektedir. Bu bakteriler tarafından üretilen antibiyotik, enzim, toksinler ve bakteriyosinler gıda, ilaç, deterjan gibi birçok endüstriyel alanda kullanıldığı için büyük öneme sahiptirler. Genelde kolay üretilebilmeleri nedeniyle dikkat çeken türlerdir (Rosovitz ve ark., 1998). Yanısıra, spor oluşturma ve metabolizma faaliyetlerinin çeşitliliği nedeniyle önemli avantajlar sağlamaktadır (Wipat ve ark., 1999).

*Bacillus* türlerinde koloni özellikleri çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Besi yeri çeşidi, koloninin yaşı gibi özelliklere göre, düzgün ya da pürüzlü, yarı şeffaf veya opak koloni formasyonları görülmektedir. Koloni renkleri, kreme-beyaz, sarı tonları olabilir (Şekil 1.1). Birçoğu da pigment oluşturmamaktadır. Farklı besi yerlerinde bazı türleri mavi-siyah vb. pigmentler ürettikleri gözlenmiştir (Lereclus ve ark., 1982; Lacey ve ark., 1995).

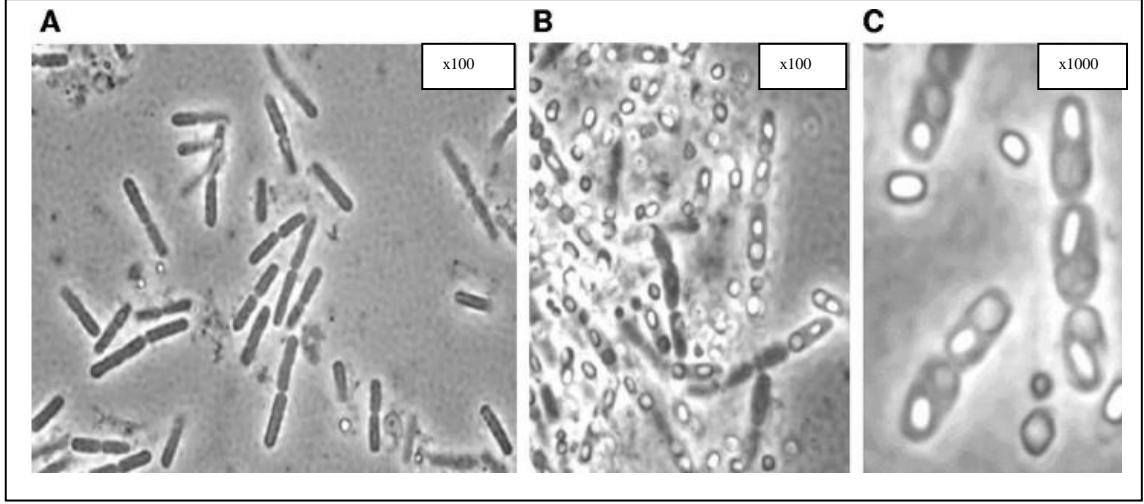


Şekil 1.1. *Bacillus cereus* türüne ait koloni morfolojisi (Anonim a)

Bazı *Bacillus* türleri dış yüzeylerindeki düzensiz polipeptid veya polisakkarit yapıda kapsül yapıları bulunur. Örneğin *B. anthracis*'de kapsül yapısı poli D-glutamik asit gibi bazı zayıf da olsa asidik yapılar içeren polisakkaritler bulunmaktadır ve bu virulans faktör taşımaktadır (Sneath, 1986; Öztürk, 2001)

*Bacillus* cinsinin asıl habitatu toprak olup sporları nedeniyle biyosferde birçok farklı alanlardan izole edilebilirler. Toprak mikroflorasında ki *Bacillus* türleri çeşitli (besin maddeleri açısından zengin ve fakir) topraklarda bulunabilmektedir. Örneğin; *B. polymyxa* ve *B. azotofixans* bitki rizosferinde gelişebilirken, *B. licheniformis*, *B. subtilis* ve *B. cereus* basit toprak ortamlarında gelişebilirler. *Bacillus* türleri çeşitli fizikokimyasal özellikte topraklarda geliştiği gibi akuatik ekosistemlerde de (deniz ve tatlı sularda ve sedimentlerinde) bulunabilirler. Uygun olmayan şartlarda büyüyebilme kapasitesinde olduklarından farklı ekosistemlerden izole edilebilirler (çok asidik ya da bazik pH, yüksek sıcaklık) (Rosovitz ve ark., 1998).



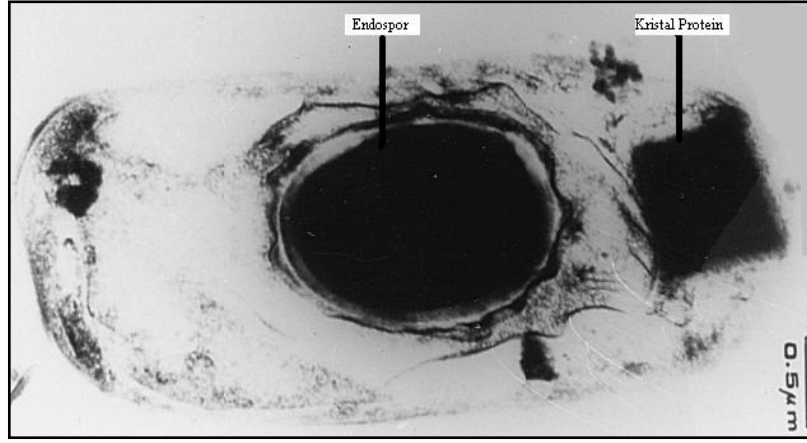


Şekil 1.2. *Bacillus thuringiensis* faz kontrast mikroskop görüntüleri, 48 saat (A) ve 7. gün (B ve C), (Swiecicka, 2008).

*Bacillus*'larda optimum büyüme sıcaklığı 25°C - 37°C arasında değişmekte olup; termofilik türler 75°C, psikofilik türleri ise 3°C' den düşük sıcaklık derecelerinde gelişebilmektedirler. Hem alkali hem de asidik ortamlarda (pH 2-10) gelişebilen türler de bulunmaktadır (Lereclus ve ark., 1982).

*Bacillus* türleri içerisinde biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan mikroorganizmaların %90'ını 1901'de Japon bakteriyolog Shigetane Ishiwata tarafından ipekböceği larvasından ilk kez izole edilen *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) oluşturmaktadır. 1911'de ise Emile Berliner Almanya'da bakterinin bilimsel tanımlamasını yapmıştır. 1916'da K. Aoki ve Y. Chigasaki, *B. thuringiensis*'in spor kültürlerindeki bir toksin yüzünden toksik aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır (Beegle ve Yamamoto, 1992; İnce ve ark., 2013).

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*); Gram pozitif, çomak şekilli, aerobik olarak üreyen ve spor oluşturabilen böcek zararlıları üzerinde patojenite gösteren bir toprak bakterisidir. *Bt*'nin vejetatif hücrelerinin eni 1µm, boyu 5µm uzunluğunda olup hücre yüzeyi kısa flagellalarla çevrilidir (Sanahuja ve ark., 2011).

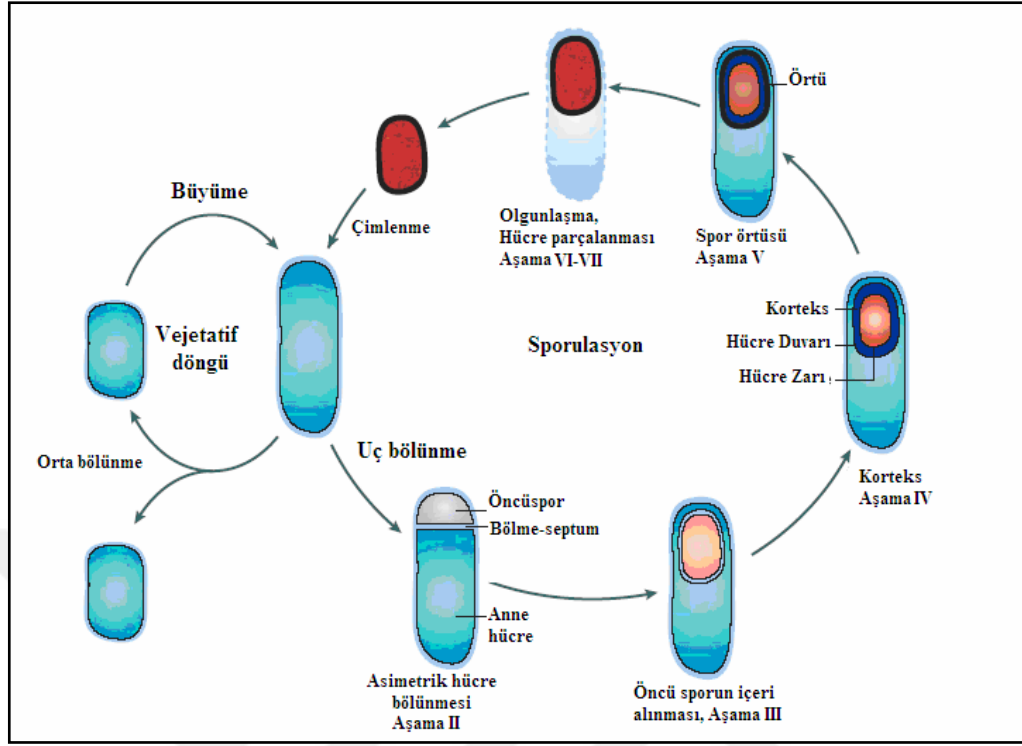


Şekil 1.3. *B. thuringiensis* 'in elektron mikroskop görüntüsü (Soberon ve ark., 2007).

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

#### *Bacillus* Türlerinde Spor Oluşumu

*Bacillus* türlerinin büyüme evresinin durgun fazında besin maddelerinin azalmasına bağlı olarak endospor oluşturmaları en önemli özelliklerinden biridir. Endospor oluşumunda spor oluşturan hücrelerin şekli ve sporangiyumlar *Bacillus* türleri için karakteristik özelliklerdir. Spor oluşumu sırasında bakteri hücresi içinde birçok değişiklikler gelişir. Bu esnada vejetatif hücrede aktif bulunan bazı genler aktivitelerini kaybederken, sporların oluşmasında fonksiyonel olan genler aktifleşir. İlk olarak nukleoidin etrafında çöküntü oluşturmak suretiyle katlanarak çevreleyen sitoplazmik zar bakteri içerisinde bir bölümde nukleoidi ayırır. Oluşan yeni çift zarın sentezlenmesi ile sporda oluşumu devam eder. Bu bölümlerden ilki genom kısmın bulunduğu protoplasttır. İçinde sitokrom hariç, tam bir genom, protein sentezi için gerekli bileşikler, çeşitli enzimler ve enerji oluşum sistemi bulunur. Sporların yapılarında bol miktarda kalsiyum dipikolinat bulunur. Bu sayede sıcaklığa karşı dirençli olmaları sağlanır. Sporlarda protoplastı çevreleyen spor duvarı peptidoglikan yapıdadır. Oluşacak bakterinin hücre çeperi buradan gelişir. Üçüncü kısım ise en kalın tabakası olan kabuk, yani korteks kısmıdır. Peptidoglikan tabakası farklı yapıdadır. Kabuk kısmının dışında proteinsel, keratine benzeyen bir kılıf ve en dışında ise yine bir glikoprotein yapıları olan ekzosporiyum bulunmaktadır (Bilgehan, 1992 ).



Şekil 1.4. *Bacillus* türlerinde spor oluşumu (Errington, J., 2003)

Endospor oluşturan *Bacillus* türleri çeşitli ortamlardan (ağaç ve diğer ürünlerin yaprak ve gövdelerinden düşen yaprak, sap vb içeren toprak kısımları), bitki kökleri- rizosferi, aquatik ekosistemlerden ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinden izole edilebildiği gibi sivrisinek, kelebek, sinek ve kınkanatlı larvalarından da izole edilebilirler (Sneath, 1986).

Endosporlar şekil olarak, elipsoidal veya oval yuvarlak olabilirler. Vejetatif hücrelerden kimyasal ve fiziksel strese dirençlilik, küçük yapılarda, optik kırılma ve kimyasal pozisyon gibi pek çok yönden farklılıklar gösterir (Fitz- James ve Young, 1969).

*Bacillus* sporları vejetatif hücrelerle kıyaslandığında sıcaklığa  $\times 10^5$ , UV ışınlarına  $\times 7-50$  daha dayanıklıdır. Sporu çevreleyen tabakalar (zar, kılıf, manto) kompleks yapılaşmaya sahip olduğundan, çeşitli kimyasal ajanlara karşı direnç geliştirebilirler (Rosovitz ve ark., 1998).

## Bacillus Türlerinin Genetik Yapısı

*Bacillus* genetiği çalışlarında sıklıkla kullanılan *B. subtilis* türü oldukça iyi tanımlanmış olup, genom büyüklüğünün 4,2 Mbp olduğu ve 4100 protein kodlayan gen içerdiği bildirilmiştir. Genel ve özel transdüksiyon, plazmid DNA aktarımı, plazmit ve bakteriyofaj vektörleri ile ilgili moleküler genetik araştırmalarda *B. subtilis* türünün yanı sıra *B. brevis*, *B. cereus* ve *B. coagulans* gibi türler de kullanılmaktadır (Öztürk, 2007).

*B. cereus*'un kromozomlarının NotI enzimi ile kesimi sonucunda oluşan parça uzunluklarına göre fiziksel haritası oluşturulmuştur. Bu fiziksel haritaya göre *B. cereus* kromozom büyüklüğünün yaklaşık olarak 5,7 Mbp olduğu belirlenmiştir. *Bacillus* cinsi içindeki DNA baz kompozisyonunun dağılımı, cinsin genetik dağılımı açısından ilginç sonuçlar vermektedir. Doğal cinste en fazla %10–15 aralığında olması gereken % G+C oranı *Bacillus* cinsi içinde %33 (*B. anthracis*) ile %69 (*B. thermocatenulatus*) arasında değişmektedir (Carlson ve ark., 1992).

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

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

## Bacillus thuringiensis Habitatları

*Bacillus thuringiensis* suşları genellikle topraktan, böceklerden, depolanmış ürünlerden ve ağaçların yapraklarından izole edilebilir. Çok sayıda *B. thuringiensis* suşu, ölü böceklerden izole edilmiş ve çoğu durumda da aynı böceğe karşı toksik aktivite göstermiştir. Bu organizmalar, konak böceklerin vücutları içinde çoğalırlar ve böcek larvası öldüğü zaman, ölü böcek vücutları kristal ve spor içerirler. *B. thuringiensis*

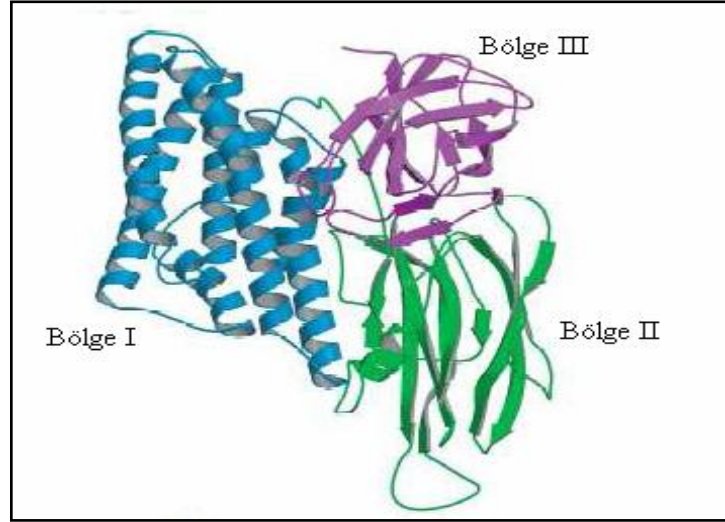
sporları toprakta da bulunabilirler ancak vejetatif büyüme, bakteri besinleri kullanınca meydana gelir (Bozlağan, 2006).

#### *Bacillus thuringiensis*'lerin Alt Türlerinin Sınıflandırılması

*B. thuringiensis*'in ayırt edilmesinde konak seçiciliği, alt türleri belirleyen H-serovarları ve cry genleri kullanılmaktadır. Son yıllarda alt türleri karakterize etmek için DNA parmak izi yöntemi de kullanılmaktadır (Hansen ve ark., 1998). Kullanılan fenotipik yöntemlerden birisi olan H-serotiplenme, *B. thuringiensis* izolatlarının sınıflandırılmasında önemli bir yöntemdir. Bu yöntem A. Bonnefoi ve H. Barjac (1963) tarafından geliştirilmiş ve o zamandan beri kullanılmaktadır. 2004 verilerine göre flagella H-serovarlarına bakılarak yapılan sınıflandırmada 80'den fazla *B. thuringiensis* alttürü tanımlanmıştır. Serovarların mevcut listesi Paris'deki Pasteur Enstitüsü'nden (Unite des Bacteries Entomopathogenes, Institut Pasteur, Paris, Fransa) elde edilebilmektedir (Tatar, 2008).

#### *Bacillus thuringiensis*'in İnsektisidal Proteinlerinin Yapısı ve Sınıflandırılması

*Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis*'in  $\delta$ -endotoksininin aktif kısmının kristal yapısı X-ışını kristalografisi ile belirlenmiştir (Li ve ark., 1991). Aktif toksin üç ayrı etkin bölgeden oluşmaktadır. Bölge I, böcek bağırsağına tutunma ve delik oluşumundan sorumlu olup, Bölge II ise böcek bağırsağının epitel hücrelerinin reseptörlerine bağlanma ile ilgili fonksiyonu sağlar. Bölge III'ün fonksiyonu hakkında bir görüşe göre Cry toksininin bağırsak proteazları tarafından sindirilmesini önlemesini sağladığı düşünülürken, başka bir görüşe göre de iyon kanallarının oluşumundan, reseptör bağlanmasından ve böcek özgünlüğünden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Rajamohan ve ark., 1998).



Şekil 1.5. *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa proteininin yapısı (Soberon ve ark., 2007).

İnsektisidal kristal proteinler (ICP), diğer adıyla Cry proteinler birçok zararlı böcek takımı larvaları üzerinde toksik etki göstermektedir. Bugüne kadar *Bt*'nin 700 cry geninin dizisi belirlenmiştir. Aminoasit benzerliklerine göre 72 farklı Cry protein grubu (Cry1, Cry2,...Cry72) tanımlanmış ve her bir Cry protein grubu, %40'dan daha az aminoasit benzerliği göstermektedir (Shu ve ark., 2013). Aynı protein grubu içinde yer alan gruplar (Cry1A, Cry1B vb.) en az %70 aminoasit benzerliği göstermektedir. Küçük harfle belirtilenler ise (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ab vb.) %70'den fazla, yanısıra %95'den az amino asit benzerliği göstermektedir (Shu ve ark., 2013). Cry2, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry4B, Cry4C, Cry4D, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19, Cry21, Cry24, Cyt1 ve Cyt2 grubu proteinler Diptera takımına etkilidir (Jouzani ve ark., 2008). En fazla çalışılan Cry protein grupları ise Cry2, Cry4 ve Cry11'dir (Azizoğlu, 2017).

Kristal proteinlerdeki Cry proteinler yüksek oranda seçicidirler (Schnepf ve ark., 1998). Farklı takımlarda yer alan zararlılar için patojenik yani insektisidal aktivite gösterirler (Höfte ve Whiteley, 1989; Feitelson ve ark., 1992). Cry protein genlerinin çeşitliliği, dağılımı ve diğer özellikleri, *cry* genlerini taşıyan bakteri hücrelerin izole edildikleri bölgelere göre farklılık gösterebilmektedir (Bravo ve ark., 1998; Uribe ve ark., 2003). Bu nedenle, yeni Cry protein genlerin ve farklı zararlı grupları için yüksek oranda toksik etkisi olabilen yeni Cry toksin proteinleri (*cry* toksin genleri) tanımlamak için dünyada *B. thuringiensis* suşları izole edilmektedir (Patel ve ark., 2011).

*Bacillus thuringiensis*'e ait  $\delta$ -endotoksinler, aktivitelere bakılarak beş önemli sınıfa ayrılırlar. Bu sınıflar;

- 1) Lepidoptera'lara özgün  $\delta$ -endotoksinler
- 2) Lepidoptera ve Diptera'lara özgün  $\delta$ -endotoksinler
- 3) Coleoptera'lara özgün  $\delta$ -endotoksinler
- 4) Dipteralara özgün  $\delta$ -endotoksinler
- 5) Nematod'lara özgün  $\delta$ -endotoksinler'dir.

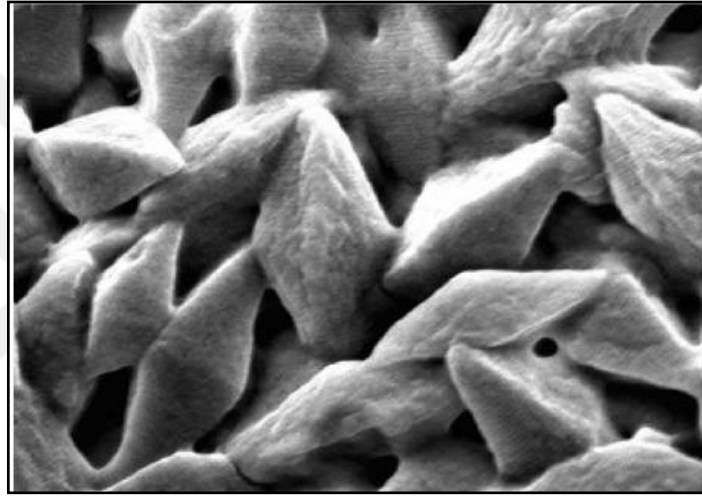
Sınıf 1'in cry genleri kristal inklüzyon içinde C-ucu ve N-ucunda korunan ve gömülü olarak bulunan aktif toksin ile 130-160 kDa büyüklüğünde protoksinleri kodlar Cry1A(a), 1A(b) ve 1A(c) proteinleri, %80'den fazla birbirlerine benzemektedirler. Cry1B ve Cry1C protoksinler sırasıyla %58 ve %67 oranında Cry1A(a) protoksinine benzerdir (Höfte ve Whiteley, 1989).

Sınıf 2'nin cry genleri 65 kDa'lık toksinlere dönüşebilen 70-71 kDa büyüklüğünde protoksinleri kodlarlar. Cry2A Lepidoptera ve Diptera larvalarına toksiktir, Cry2B ise sadece Lepidoptera larvalarına toksiktir. Bu iki toksin %87 oranında birbirine benzerdir. *Bacillus thuringiensis*'in cry3 genleri yaklaşık 73 kDa büyüklüğünde protoksinleri kodlamaktadırlar. Bu protoksinler proteolitik parçalanmada ilk olarak 67 kDa'lık büyüklüğe dönüşürler. Daha sonra larvanın bağırsağında 55 kDa'lık toksini oluştururlar (Carroll ve ark., 1989). Cry3A ve Cry3B proteinleri %75 oranında benzerdir (Donovan ve ark., 1992). Cry3B proteini, %74 oranında Cry3A'ya, %61 oranında Cry3B'ye ve %33 oranında Cry3C proteinlerine benzerlik gösterir (Bozlağan, 2006).

*Bacillus thuringiensis*'in cry4 (A,B,C,D) ve cyt genleri 20-140 kDa arasındaki proteinleri kodlarlar. Bu genlere sahip olan *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* suşları en az dört polipeptid oluştururlar. CytA, 4A ve 4D proteinleri arasında sinerjistik bir ilişki vardır. Cry4A proteini, Cry4B ile %54 oranında ve Cry4C ile %29 oranlarında birbirlerine benzerdir. Cry3 ve cry4 genlerinin cry1A genleri ile sadece %20 oranında benzerlikleri vardır (Bozlağan, 2006).

*Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* DSIR 732 tarafından üretilen 81.2 kDa'lık Cry5 protoksini hem Coleoptera (*Leptinotarsa decemlineata*) hem de Lepidoptera (*Ostrinia nubilalis*) türlerine karşı aktiftir fakat Lepidoptera türlerine karşı daha aktif olduğu bilinmektedir (Tailor ve ark., 1992).

Sınıf 1 ile 5 toksinleri aktif olmayan protoksin olarak oluşurlar ve toksinler proteolitik olarak aktif edilirler. Farklı büyüklükte amino asit dizilerine sahip olan bu proteinlerin yaygın proteaz işleyiş bölgelerini oluşturmak için nasıl katlandığı bilinmemektedir (Höfte ve Whiteley, 1989)



Şekil 1.6. Baklava dilimi şeklindeki kristal yapıların SEM görüntüsü (Öztürk, 2007)



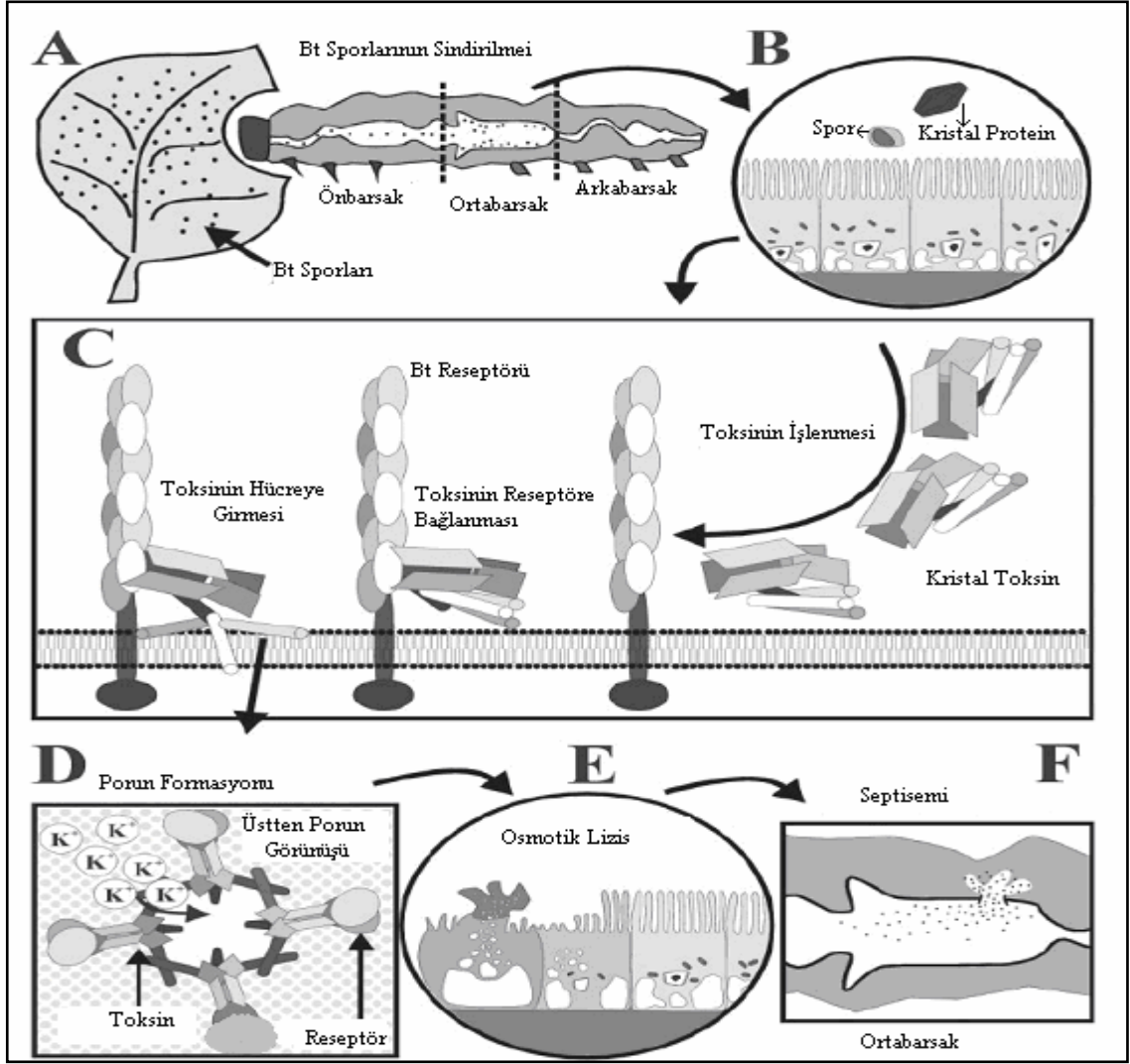
Çizelge 1.1. Protoksinlerin ve toksinlerin moleküler büyüklüğü, multijenik yapısı ve etkilediği konakçı grupları (Demirbağ ve ark., 2008)

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

## İnsektisidal Kristal Protein (ICP)'in Hedef Böceklerdeki Mekanizması

ICP'ler normal koşullar altında çözünmeden bulduklarından insanlar ve diğer yüksek organizma grupları için bir risk oluşturmazlar. Buna karşılık pH 9,5'de çözünebilir özellik taşıyan kristal proteinlerine yoğun bir insektisit özelliği kazandırmaktadır.  $\delta$ -endotoksinler bağırsakta çözünerek protoksine dönüşürler. Sonra bağırsak enzimleri tarafından protoksinler parçalanarak aktif toksinler elde edilir. Aktif toksinler bağırsak epitelyum hücrelerinin reseptörlerine tutunarak böceğin bağırsak duvarını felce uğratar ve burayı tahrip ederek gözenekler oluştururlar. Böylece bağırsakta bulunan besin artıkları böcek vücuduna ve kana karışır. Zehirlenen böcek, toksin aktivitesi sebebiyle hemen ölebileceği gibi 2-3 gün içerisinde kan zehirlenmesi sonucu da ölebilir. *B. thuringiensis*'in larvalar üzerinde sebep olduğu belirtiler; yavaş hareket etme, beslenmeyi bırakma, sıvı halde dışkı çıkarma, kusma ve vücut içeriklerinin kahverengiden siyaha dönüşmesi olarak sayılabilir (Knowles, 1994; Tatar, 2008).

Larvalar tarafından sindirimle alınan insektisidal kristal proteinler bağırsağın alkali ortamında çözülür ve proteazlar tarafından aktif hale getirilir. Aktif hale gelen proteinler daha küçük yapıda toksinlere dönüşür. Toksinler orta bağırsak silindirik epitel hücrelerinin zarlarında bulunan özel reseptörlere bağlanırlar. Epitel hücre zarlarında porlar ve iyon kanalları oluşturarak hücrelerin iyon ve su dengesinin değişmesine neden olurlar. Yüksek dozlarda toksin uygulanması sonucunda orta bağırsak epiteli parçalanır ve hızlı bir ölüm gerçekleşir. Daha düşük dozlarda ya da daha az duyarlı böceklerde ise bağırsak hücrelerinin zarar görmesi normal bağırsak salgısının durmasında etkilidir ve bu olay da sporların açılmasına izin verir. Vejetatif hücreler daha sonra içeri girerek septisemiye neden olurlar ve ölüm gerçekleşir (Mark ve Byron, 2003; Öztürk, 2007).



Şekil 1.7. *B. thuringiensis* 'in hedef böcek üzerindeki etki mekanizması

A) Larva tarafından sporlu *B. thuringiensis*' in ve kristal proteinlerin yenmesi  
 B) Orta bağırsakta protoksin halde bulunan kristal proteinlerin alkali ortamda çözünmesi  
 C) Orta bağırsak proteazları tarafından protoksinlerin toksin proteinlere dönüştürülmesi, toksin proteinlerin epitelium hücre zarındaki özgün reseptörlere bağlanması, toksinin hücre membranından içeriye girmesi  
 D) Porların ve iyon kanallarının oluşması  
 E) Epitel hücrelerinde osmotik dengenin bozulması sonucunda osmotik parçalanmanın gerçekleşmesi  
 F) Septisemi sonucunda ölümün gerçekleşmesi. (Öztürk, 2007)

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

Sporulasyon süresince, yüksek miktarda insektisidal parasporal kristal protein üretme yeteneğinde olan *B. thuringiensis* (Schnepf ve ark., 1998), zararlı populasyonlarını önemli ölçüde azaltarak doğal dengenin bozulmasını engellemektedir (Walker ve ark., 2003). Sporlanan hücrelerde bulunan bu parasporal kristal proteinler *B. thuringiensis*'in biyopestisit ve hedef zararlı için olan özgülüğünden sorumludurlar (Rie ve ark., 1990).

#### Mikrobiyal Pestisitler ile Mücadelede *Bacillus* Türleri

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde kimyasal ilaçların yerini biyoinsektisitler almıştır (Eski ve ark., 2015). Biyoinsektisitler üretimlerinin kolay ve sürekli olması, sadece hedef organizmaya etki etmeleri, zararlıların kontrolünde güvenilir olmaları, çevre kirliliği ile ilgili problemler yaratmamaları ve endosporlarının doğada uzun süre kalabilmeleri nedeniyle tercih edilmektedir (Smith, 1980).

Biyolojik mücadelede yararlanılan mikroorganizmalar, entomopatojen olarak da isimlendirilen patojen mikroorganizmalardır (Öncüer, 1997). Günümüzde üzerinde en çok araştırma yapılan ve en yaygın olarak kullanılan mikrobiyal temelli biyoinsektisit *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)'dir (Eski ve ark., 2015). Zararlıların kontrolünde en başarılı entomopatojen olarak kullanılan *Bt*, toplam insektisidal pazarın yaklaşık %2'lik kısmını oluşturmaktadır (Bravo ve ark., 2011).

*Bacillus thuringiensis* ürünleri kimyasal insektisitler ile kıyaslandığında, hedef organizmada daha az bir dirence neden olarak ortamda birikip toksik etki oluşturmadıklarından yarılanma ömürleri kısadır. Özgül böcek grupları üzerine etkili olduğundan hedef olmayan ve duyarlı olmayan organizmalar üzerinde etkisini

göstermez. *B. thuringiensis* insanda patojen olmadığı için zarar vermez. En önemlisi çevreyi kirletmez ve kullanımları güvenlidir. Bu nedenle çevresel dengeyi bozmayan bir alternatif mücadele yöntemidir (Chattopadhyay ve ark., 2004).

Ülkemizde de biyolojik mücadele ajanı olarak öngörülen *B. thuringiensis* bağ, meyve, narenciye ve depo zararlılarına karşı kullanılmakta olup bunun yanında biyolojik mücadele ajanı olarak izole edilen diğer *Bacillus* türlerinden *B. cereus*, *B. circulans*, *B. fribourgesis*, *B. lentimorbus*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. popilliae*, *B. subtilis*, *B. sphaericus* ve *B. weihenstephanensis*'in de kullanılabileceği belirlenmiştir (Sezen ve ark., 2007; Demirbağ ve ark., 2008).

### Probiyotik Olarak *Bacillus*'lar

Sağlıklı insanların gastrointestinal sistem (GİS)'inden izole edilen bazı *Bacillus* türlerinin karakterizasyonunun yapıldığı çalışmalarda, bu türlerin intestinal ortama iyi adapte oldukları yanında canlılıklarını da koruyabildikleri, GİS'de iyi kolonize olabildikleri ve insanlar için probiyotik suş olarak kullanılabilecekleri belirtilmiştir (Hong ve ark., 2009; Fakhry ve ark., 2008).

Önceleri *Bacillus* türü bakterilerin probiyotik olarak değerlendirilmeleri ile ilgili bazı soru işaretleri bulunmaktaydı. Bu bakterilerin toprak kökenli olup GİS'in normal florasında bulunmadığını ve bağırsak florasında olmayıp, sadece geçici bir süre için bulunabilen ve ayrıca aralarında patojenlerin de bulunduğu *Bacillus* türlerinin nasıl yararlı etki sağlayabileceği, daha da önemlisi güvenli olup olmayacağı endişesi mevcuttu (Hong ve ark., 2005; Sorokulova ve ark., 2008). Ancak son dönemlerde yapılan bazı çalışmalarda *Bacillus* türlerinin sadece toprak kökenli olmadığı, sporları aracılığıyla birçok ortamda canlılığını sürdürebildiği, sindirim yoluyla *Bacillus* sporlarını alan hayvanların GİS'inde bu bakterilerin canlılığını sürdürebildiği ve GİS kommensali olabileceği öne sürülmüştür. Hatta bu çalışmalarda toprak kökenli olarak bilinen *Bacillus* türlerine ait sporların sanılanın aksine, toprağa gaita aracılığı ile bulaşım toprakta miktarca artmasına sebep olduğu söylenmiştir (Hong ve ark., 2009).

Son zamanlarda *Bacillus* türlerinin sporları ve ürettikleri metabolitleri (enzimler, antimikrobiyal maddeler vb.) aracılığıyla probiyotik özellikler gösterebildikleri için bunların probiyotik olarak değerlendirilmeleri ile ilgili çalışmalar yapılmakta ve özellikle de bu bakterilerin insanların kullanımı için güvenli olup olmadığı araştırılmaktadır. Ülkemizde de yapılan bu alandaki çalışmalar; *Bacillus* türlerinin GİS'deki davranışları, probiyotik olarak etki mekanizmaları ve kullanım olanakları üzerine olmuştur (Erem ve ark., 2013).

### Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı yeni insektisidal *Bacillus* türleri bulabilmek adına, Amasya ilinde farklı istasyonlardan (meyve bahçelerinden; Akbilek mahallesi, Şeyhcu mahallesi, Hacılar mahallesi ve Merkez) alınan toprak, meyve ve yaprak örneklerinden *Bacillus* cinsine ait türlerin izolasyonlarını gerçekleştirme sonrasında insektisidal özellikte olanları belirlemektir. Bu amaçla, izolasyon sonrasında morfolojik (koloni, hemoliz), mikroskopik (endospor, basil, gram boyama), fizyolojik (hareket, aerob) ve biyokimyasal (katalaz, oksidaz, indol, kapsül) özellikleri belirlenen *Bacillus* türlerine ait izolatlarda moleküler çalışmalar (PCR, AGE, 16s rDNA sekans analizi) sonucunda endotoksin ve pestisit geni (*cry* gen) varlığını tespit etmektir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

*Bacillus thuringiensis* bakterisi ilk kez Japon bakteriyolog Shigetane Ishiwata tarafından 1901'de ipekböceği larvasından izole edilmiş olup bilimsel tanımlaması ise 1911 yılında Emile Berliner tarafından Almanya'da yapılmıştır. K. Aoki ve Y. Chigasaki'nin 1916'daki araştırmaları ile *B. thuringiensis*'in spor kültürlerindeki bir toksin madde yüzünden toksik etkiye sebep olduğu tespit edilmiştir (Beegle ve Yamamoto, 1992).

1980'li yılların sonuna kadar *B. thuringiensis* 'in uzun süredir pestisit amaçlı kullanılmasına rağmen böceklerde dayanıklılık meydana getirmediği düşünülmekteydi (Meeusen ve Warren, 1989; Beegle ve Yamamoto, 1992). Sonrasında bu bakterinin alttürlerinden yapılmış insektisitlerin kullanımı her geçen gün artmıştır. 1990'lı yılların başlarında en geniş çapta kullanılan ve mikrobiyal insektisit olan *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'den elde edilen spor- protein kristallerinden oluşan bir karışımın lepidopter (kelebek)'ler üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Tuncer ve Ecevit, 1994).

*Bacillus* cinsi bakterilerin insektisit olarak kullanımında bir çok avantaj ön plana çıkmaktadır. En önemli olan faktör ise yeni *Bacillus* izolatları elde edilerek insektisidal direncin çeşitli rekombinasyon yöntemleriyle birkaç toksin proteinle birlikte tek toksin olarak elde edilip zararlıya karşı kullanılabilmesidir. Ayrıca *Bacillus thuringiensis* ürünleri, hedef organizmada daha az bir dirence neden olarak ortamda birikip toksik etki oluşturmaları için yarılanma ömürleri kısadır. Sadece özgül hedef böcek grupları üzerine etkilidir. Hedef olmayan ve duyarlı olmayan organizmalar üzerinde etkisini göstermez. *B. thuringiensis* insanda patojen olmadığı için zarar vermez. Kullanılmasının en önemli sebebi çevreyi kirletmeyip ve kullanımının güvenli olması nedeniyle çevresel dengeyi bozmayan alternatif bir mücadele yöntemidir (Chattopadhyay ve ark., 2004).

*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'nin toksin sentezleyen genleri, doğada sadece Bermuda çimminin ksileminde bulunan *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*'e nakledilerek rekombinant *C. xyli* elde edilmiştir. Bu bakterilerin mısır bitkisine inokülasyonu sonucu bitkinin ksilemdeki özsuyunun mililitresinde 1 x 10<sup>10</sup> toksin sentezleyen bakteri

bulunmuştur. Ancak hedef alınan Mısır kurdu (*Ostrinia nubilalis*)'nun etkili bir kontrolü için bu düzeyin 10 katına gerek olduğu bildirilmiştir (Beegle ve Yamamoto, 1992).

*B. thuringiensis* 'in diğer insektisitlere olan bu üstün yönleriyle kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Genetik mühendisliğindeki gelişmeler ile *B. thuringiensis* genlerinin pamuk, tütün ve domates gibi önemli ürünlere ve bitkilerde yaşayan ve patojenik olmayan bazı bakterilere nakledilmesi ayrıca farklı konukçu spektrumuna sahip yeni ırkların geliştirilmesi bu bakterinin önemini artırmaktadır (Gasser ve Fraley, 1989; Lindow ve ark., 1986).

Bu bakteri (*Bt*)'nin biyoteknolojik çalışmalara konu olan diğer bir özelliği konukçu spektrumunun ve etkinliğinin artırılmasıdır. *B. thuringiensis*'in farklı varyeteleri tarafından üretilen kristaller farklı biyolojik aktiviteye sahip olup, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* lepidopterlere karşı etkili diptere karşı ise etkisiz veya çok az etkilidir. Buna karşılık subsp. *israelensis* diptere karşı, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ise coleopterlere etkilidir (Kirschbaum, 1985; Beegle ve Yamamoto, 1992).

Domates ve tütün bitkilerine *B. thuringiensis*'in toksin sentezleyen genleri transfer edilerek bitkisel dokularında toksin sentezlenmesi sağlanmıştır (Vaeck ve ark., 1987; Perlak ve ark., 1990). Sonraki yıllarda ise yapılan çalışmalarda bu genler lahanaya, pamuk ve soya fasulyesine de aktarılmışlardır (Beegle ve Yamamoto, 1992).

*Bacillus* cinsi içinde yer alan *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. sphaericus*, *B. popilliae*, *B. circulans*, *B. polymyxa*, *B. lentimorbus*, *B. megaterium* ve *B. fribourgesis* gibi türler de böceklerden izole edilerek ve izole edildikleri konak üzerinde insektisidal etkilere sahip oldukları belirlenmiştir (Thiery ve Frachon, 1997).

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

Bazı üretici firmalar *B. thuringiensis*'te doğal olarak bulunan plazmit değişim sistemini kullanarak yeni gen kombinasyonları içeren izolatlar meydana getirmişlerdir. Bunlardan



Condor adı verilen üründe iki ayrı izolatin etkinliği bir preparatta toplanarak Kır tırtılı (*L. dispar*)'na karşı normal bir preparattan 7.5 kat daha yüksek etkinlik saptanmıştır. Foil adı verilen preparatta ise patatesten lepidopterler ve coleopterlere ayrı ayrı etkili olan varyeteler aynı yöntemle bir üründe toplanmıştır (Beegle ve Yamamoto, 1992).

Diğer bir üretici firma ise biyolojik olarak kapsüllenmiş iki ürün elde etmiştir. Bunlardan MVP lepidopterlere, M-Trak ise coleopterlere karşı geliştirilmiştir. Bu yöntemde *Pseudomonas fluorescens*'in patojen olmayan bir ırkına lepidopter ve coleopterlere karşı etkili *B. thuringiensis* toksin genleri ayrı ayrı transfer edilerek, bakteri içinde toksin üretimini takiben *P. fluorescens* hücreleri sıcaklık veya kimyasal maddelerle öldürölmüştür. Böylece bu bakteri kristal toksinlere bir kapsöl vazifesi görerek diğer *B. thuringiensis* preparatlarına oranla iki kat daha uzun süre kalıcılığa sahip olduğu saptanmıştır (Beegle ve Yamamoto, 1992; Tuncer ve Ecevit, 1994).

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

Erzurum ili ve çevre ilçelerinde (Aşkale, Pasinler, Tortum ve Oltu) baklagil yem bitkilerinde zararlı olan *Curculionidae* familyasına ait bazı böceklerden entomopatojen bakteriyel mikroorganizmalar izole edilerek tanımlanması yapılmıştır. İzolasyonu yapılan 88 bakteri izolatu içerisinde biyopestisit olarak 3 adet *Bacillus thuringiensis*, 3 adet *Bacillus pumilus*, 4 adet *Brevibacillus brevis*, 4 adet *Paenibacillus* spp. ve 2 adet *Serratia* spp., olmak üzere izolatlar elde edilmiştir. Elde edilen entomopatojenlerin hedef doğrultusunda tanısı yapılmış olup, özellikle baklagil yem bitkilerinde zararlı olan *Curculionidae* familyasına (coleoptera) ait bazı zararlılara karşı biyopestisit olarak kullanılabileceği söylenmiştir (Dadaşoğlu., 2016).

Kayseri ilinin farklı bölgelerinden alınan toprak örneklerinden 60 farklı *Bacillus* spp. izolatu elde edilerek bunların 17'sinin cry1 geni taşıdığı tespit edilen çalışmada, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve diğer izolatlardan yaklaşık 19 kb büyüklüğünde plazmit bantları elde edilmiştir. Standart suş ve diğer izolatların *Ephestia kuehniella* ve *Plodia interpunctella* larvaları üzerinde öldürücü etki gösterdikleri tespit edilmiştir. *Ephestia kuehniella* larvalarına karşı I36, I37 ve I40 izolatlarının  $10^6$  spor-kristal  $\text{mL}^{-1}$  konsantrasyonları uygulandığında toksik etkilerinin standart suşa göre daha yüksek olduğu belirlenmiş ve aynı izolatların *Plodia interpunctella* larvalarına karşı da etkili oldukları gözlenmiştir. Sonuç olarak I36, I37 ve I40 izolatlarının düşük dozlarda diğer izolatlarla kıyaslandığında daha etkili olduğu görülmüştür (Bozlağan ve ark., 2010).

Aydın ili incirlik alanlarından yapılan örneklemlerden elde edilen doğal *B. thuringiensis* izolatlarından bazılarının, *Tetranychus urticae* (Acarina), *Ceroplastes rusci* (Homoptera) ve *Ceratitis capitata* (Diptera) üzerindeki toksik etkisi araştırılarak *T. urticae* nimfleri üzerinde 31 doğal *B. thuringiensis* izolatının spor-kristal karışımının etkisi incelenmiştir. Bu izolatlardan %58'inin %15 ve altında, %42'sinin de %16 ile %30 arasında düşük ölüm oranına neden olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, bazı *B. thuringiensis* izolatlarının özellikle *T. urticae* nimflerinin büyümelerini geciktirici biyopestisit geliştirilmesinde belli bir potansiyele sahip olabildiklerini göstermektedir (Alper ve ark., 2013).

Entomopatojen bakteri olan *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) ürünleri yıllardır Batı Nil Virüs'ünün başlıca vektörü olan *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) kaynaklı hastalıkların mücadelesinde kimyasal pestisit kullanımının azaltılması için etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Azizoğlu'da yaptığı çalışmada da 14 farklı yerel *Bt* izolatının hastalıklı *C. pipiens* larvaları üzerindeki biyolojik mücadele potansiyeli araştırılarak, dipteralara özgü Cry gen taşıyan 14 farklı *Bt* izolatının spor-kristal protein karışımı ( $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) *C. pipiens*'in son dönem larvalarına uygulanmıştır. Uygulanan izolatlar arasında *BtSY50.4* olarak adlandırılan spor-kristal protein karışımının % 80 larval ölüme sebep olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak *BtSY50.4* izolatının *C. pipiens* üzerindeki etkinliği göz önüne alındığında biyolojik mücadele açısından önemli olduğu belirtilmiştir (Azizoğlu., 2017).

Topraktan doğal *Bacillus thuringiensis* suşlarının izolasyonu, karakterizasyonu ve *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarına karşı biyolojik aktivitesinin araştırıldığı çalışmada; 5 doğal *Bacillus thuringiensis* izolatları toprak örneklerinden izole edilerek *E. kuehniella* larvaları için patojen olan F21, F16 ve F19 doğal *Bt* izolatları yaklaşık olarak 130 kDa ve 65 kDa ağırlığında protein bantları oluşturan küresel, baklava dilimli ve yuvarlak yapılı inklüzyonlar üretmekte olduğu görülmüş. LC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 1.08, 1.48 ve 2.17 olarak belirlenmiştir. Bulgularda F21 ve F19 izolatları sırasıyla %83 ve %80 ölüm oranları ile *E. kuehniella* larvalarına karşı oldukça yüksek bir toksik etki gösterdiği bulunmuştur. Sonuç olarak *Bacillus thuringiensis* izolatları F21 ve F19 yeni bir insektisit olarak biyopestisitlerin üretimi için kullanılabileceği önerilmiştir (Öztürk ve ark., 2009).

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

Yeni toksin kombinasyonlarıyla beraber *Bacillus* suşlarını tanımlamak için yapılan bir çalışmada ise 26 adet *Bacillus* cinsi bakteri Trabzon ilinde bulunan depolardan izole edilmiştir. 16S rDNA sekans analizi ve cry gen içeriği tespit edildikten sonra *Bacillus thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. atrophaeus*, *B. megaterium* ve *Lysinibacillus sphaericus* türlerinin varlığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak en yüksek insektisidal etkinin *Bacillus thuringiensis* türünde olduğu tespit edilmiştir (Demeli ve ark., 2014).

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

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*'nin Salkım Güvesi (*Lobesia botrana*) ve predatörlerine karşı etkilerinin araştırıldığı çalışmada bağlarda faydalı böceklerin popülasyon değişimine bakılmıştır. Bunun sonucunda; arazi çalışmalarında 100 salkımdaki bulaşıklık oranına bakıldığında *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* kullanılan bağ alanında bulaşıklık oranının kontrol alanına göre daha fazla olduğu bu nedenle uygulanan *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* dozunun 100 lt'ye 75g değil de 100g kullanılması sonucuna varılmıştır. Faydalı tür sayısı oldukça az ve popülasyon yoğunluğu en fazla olan predatörler *Chrysoperla carnea* ve *Coccinella septempunctata* olmuştur (Aslan ve Güzel., 2009).

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

Mevcut çalışmada Artvin Şavşat ladin ormanlarında zarara neden olan küçük ladin arısı (*Pristiphora abietina*)'na karşı Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerarifolium* tohumu) bitkisi ve *Bacillus thuringiensis* (Dipel DF) biyopestisitlerinin *P. abietina* üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Laboratuvar şartlarında, *P. abietina*'nın larvalarına karşı farklı dozlarda Pyrethrum ve *B. thuringiensis* biyopestisitleri uygulanmıştır. Pyrethrum'un 150 ml/100 lt dozu ile 300 ml/100 lt dozunun etkinliklerinin aynı olduğu görülmüştür. Analiz sonucunda Pyrethrum'un 600 ml/100 lt dozu ile Dipel DF 100 gr/100 lt dozunun etkinliği de benzer bulunmuştur. Sonuç olarak, kullanılan her iki biyopestisit de *P. abietina*'nın larvalarına karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Göktürk., 2017).

Mevcut çalışmada *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)'te Cry genlerinin toksinlere karşı birçok direnç mekanizmalarından ABC taşıyıcısının ABCC2 modifikasyonu keşfedildiği çalışmada proteinsel yapıda olan taşıyıcıya amino asit eklenmesi veya çıkarılması birkaç Lepidopter türünde Cry1Ab ve Cry1Ac toksinlerine karşı yüksek seviyede direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu mutasyonların Cry1C'ye çapraz direnç sağladığının kanıtı olduğu belirtilmiştir. Farklı bir ABC taşıyıcısında meydana gelen mutasyon Cry2A toksinlerine karşı tamamlayıcı direnç üretmiştir. ABC taşıyıcılarının üst familyası hücrede bulunan ksenobiyotiklerin ve endojen bileşiklerin atımından sorumlu olup direnç olarak kimyasal insektisitlerin detoksifikasyonunu sınırlamıştır. *Bt* eklenmiş ürünlerde bu taşıma mekanizması (ATP-swith) toksinlere karşı toleransı artıracığı belirtilmiştir (Heckel, 2015)

Coleopterlere karşı özellikle de *Agelastica alni* 'ye karşı etkili bir pestisit geliştirmek için gürgen ve fındık bitkilerine karşı insektisidal etkisi olan 21 *Bacillus* türleri izole edilmiştir. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* 'in *A. alni* üzerinde en yüksek insektisidal etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir (Eski ve ark., 2015)

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*)'in farklı suşları parasporal kristal üretme yeteneğinde olup bu kristallerin böcek ve omurgasızların larvalarında toksik etki yaparak konakçının hızlı bir şekilde ölümüne sebep olduğunu göstermek amaçlı yapılan çalışmada güvede doğal izolatları toplanarak virülansları çalışılmıştır. *Bt*'ler topraktan izole edilip 72 saatlik larval ölümlere bakılmıştır. SDS-PAGE jel analizi ile 2 izolat grubunda sırasıyla 121,1 kDa ve 108,9 kDa moleküler ağırlıkta protein gözlenmiş olup bu sonuçlar protein birikimi ile izolatların virülansı arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Ayrıca 9 suşun

*Plutella xylostella*'da yüksek toksik etkiye sahip olduğunu göstermiş ve *Bt*'nin Lepidopterlerde insektisidal kontrol ajanı olarak kullanılabilceğini kanıtlanmıştır (Khoramnezhad ve ark., 2015).

Yapay 7 farklı besin kullanıldığı mevcut çalışmada *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* ile *Vanessa atalanta* larvaları enfekte edilerek protein, karbonhidrat, tannik asite etkileri araştırılmıştır. Bakteri ile enfekte edilen larvalarda 3. günde maksimum ölümler görüldüğü belirtilerek bu ölümlerin büyük bir çoğunluğunun protein bakımından az beslenen larvalarda olduğu ispatlanmıştır (Yanar ve ark., 2015).

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

Farelere oral olarak *B. subtilis* sporlarının verildiği bir çalışmada; farelerin dışındaki spor sayısının, farelere orijinal olarak verilen spor sayısından daha fazla olmasının ancak sporların intestinal sistemde vejetatif hale geçip çoğaldıktan sonra tekrar sporlaşması ile açıklanabileceği ileri sürülmüştür. (Hoa ve ark., 2001, Erem ve ark. 2013).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bakteri örnekleri

Bu çalışmada kullanılan bakterilerin izolasyonu Amasya ilinin farklı lokasyonlarından (Akbilek, Şeyhcu, Hacılar ve merkez) alınan toprak, meyve, yaprak ve bitki örneklerinden izole edilmiştir. Hastalıklı olduğu ön görülen (çürük, nekroz, kurtlanma vs.) meyve, yaprak ve bitki örnekleri ile toprağın üst yüzeyi temizlendikten sonra steril spatula ile 5 cm derinlikten yaklaşık 10 gram alınan toplam 70 adet örnek steril plastik poşetlere konularak +4°C'de laboratuvarında *Bacillus* izolasyonları için saklanmıştır (Kim ve ark., 1998).

##### 3.1.2. Kimyasallar ve çözeltiler

- Nutrient Buyyon (NB) sıvı besi yeri (gr/lt): 13 gr nutrient buyyon distile su içerisinde çözdürülerek son hacim 1 litreye tamamlandı.
- Nutrient Agar (NA) besi yeri (gr/lt): 28 gr nutrient agar distile suda çözdürülerek son hacim 1 litreye tamamlandı.
- Tris-EDTA (TE) tamponu: 10 mM Tris, 1 mM EDTA
- STE tamponu: 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)
- Lizozim çözeltisi: 10 mg/ml olacak şekilde Tris-EDTA tamponu içerisinde hazırlandı.
- Fenol / kloroform / izoamilalkol (25/24/1) çözeltisi: 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlanmıştır. Çözelti bir gece 4°C'de bekletildikten sonra kullanıldı.
- Etil alkol (%70, %96): İzole edilen DNA'ları yıkamak için kullanıldı.
- 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 su içerisinde çözülerek hacim 1 litreye tamamlandı.
- Agaroz: %0,8'lik ve %2'lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlandı.
- Yükleme tamponu: 40 gr sukroz, 0,025 gr bromofenol mavisi, 0,25 gr ksilen siyanol 100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

- RNaz çözeltisi (10 mg/ml): 0,01 M sodyum asetat (pH 5,2) çözeltisi içinde çözülüp 15 dk 100°C'de bekletildi ve oda sıcaklığında yavaş yavaş soğutuldu. Çözeltinin pH'sını ayarlamak için 1 M Tris-HCl (pH 7,4) çözeltisinden 0,1 hacim ilave edilmiş ve karıştırılarak -20°C'de saklandı.
- Boyama tamponu: 300 ml stok boya çözeltisi, 35 ml 10 N (w/v) KOH, 25 ml %100 (w/v) TCA karıştırılarak hazırlandı.
- Etidyum bromür (EtBr): 10 mg/ml derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edildi.

### 3.1.3. Cihazlar

Çalışmalarda kullandığımız cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

- Mikroskop (Olimpia ve ZEISS)
- İnkübatör / Etüv (Nüve)
- Güvenlik kabini (KOJAIR)
- Otoklav (Nüve)
- DNA izolatör (QIAcube)
- DNA PCR (BIO-RAD)
- Bakteri tanımlama cihazı (VITEK 2 Compact - BIOMERIUX)
- Karıştırıcı / vorteks
- McFarland (McF) ölçüm cihazı (Densichek plus - BIOMERIUX)
- Agaroz jel elektroforezi (BIORAD)
- Ultraviyole (UV) cihazı
- Dipfriz ve buzdolabı (Arçelik)
- Santrifüj (Nüve - NF120)
- Benmari / su banyosu (Allsheng)



### 3.1.4. Çalışmada kullanılan primerler

Kromozomal DNA izolasyonunda kullanılan primerler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

- *Bacillus* türleri ribotiplendirme amaçlı primerler:

<u>Evrensel Numarası</u>	<u>Sekans Dizilimi</u>
1. 27F (16S Evrensel Bakteri Primeri):	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
2. 519B R (16S Evrensel Bakteri Primeri):	5'-GTATTACCGCGGCKGCTG-3'
3. 1492R (16S Evrensel Bakteri Primeri):	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

- Kristal toksin tayininde kullanılan *Bt* primerleri :

<u>Sıra</u>	<u>Sekans dizilimi</u>	<u>SPE (%)</u>	<u>AE (%)</u>
<u>1.</u>	1 5_-TATGCWCAAGCWGCCAATYTWCATYT-3	90	90
	5 5_-GGRATAAATTCAATTYKRTCWA-3_		
<u>2.</u>	2 5_-TTTAGATATTGTTGCAWTATKKYC-3_	68	98
	5 5_-GGRATAAATTCAATTYKRTCWA-3_		
<u>3.</u>	1 5_-TATGCWCAAGCWGCCAATYTWCATYT-3_	46	100
<u>4.</u>	5_-CATAACGTAGWYTTAYCTKAWT-3_		

- SPE: tek başına verimlilik

- AE: birikmiş verimlilik

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Alınan örneklerden *Bacillus* cinsine ait bakterilerin izolasyonu

*Bacillus* cinsine ait bakteri türlerinin izolasyonu için nutrient agar (NA) besiyeri kullanıldı. Amasya iline ait farklı lokasyonlardan alınan toprak örneklerinin 1 gramı, içinde 9 ml steril serum fizyolojik çözeltilisi bulunan deney tüplerine aktarıldı. Vortekste 1 dk karıştırıldı. Örnekler su banyosunda 80°C’ de 60 dk tutularak vejetatif bakteri formlarının ölmesi ve ortamda bu bakterilerin sporlu formlarının kalması sağlandı. Örneklerden 10<sup>-1</sup>’den 10<sup>-7</sup>,ye kadar seri seyreltmeler hazırlanarak, 10<sup>-3</sup> seyreltmeden itibaren NA besiyerine yayma plak yöntemiyle 0,1 ml ekimler yapıldı ve 30°C’de 5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda *Bacillus* morfolojisine benzeyen (büyük, beyaz, opak vb.) koloniler seçildi. Seçilen bu koloniler NA besi yerine tek koloni ekim yöntemi ile ekilerek saf kültürler elde edilip NB sıvı besi yerine ve yatık agara aktarıldı. Örnekler kullanılana kadar yatık agarda buzdolabında +4 °C’de muhafaza edildi (Kim ve ark., 1998).

### 3.2.2. Bakteri tanımlamalarında kullanılan biyokimyasal ve fizyolojik testler

*Bacillus* izolatları tanımlaması için; aerobite, hemoliz, hareketlilik tespiti yanında indol, katalaz, koagülaz, oksidaz testleri ile kapsül, spor ve gram boyamaları yapılmıştır.

#### Hemoliz Tayini

Bakterilerin hemoliz yeteneği kanlı agar besi yeri kullanılarak test edilebilmektedir. Hemoliz testi, daha çok 18 – 24 saatlik bakteri kültüründen hazır ticari kanlı agar besi yerine tek koloni düşürülecek şekilde öze ile sürülerek ekim yapıldı ve optimum sıcaklık (35°C)’ta 1-5 gün süre ile inkübe edildi. Besi yerinde gelişen koloniler, etrafında oluşturduğu hemoliz zonu yönünden her gün incelenerek kanlı agar besi yerinde koloni etrafında oluşan zonlar Beta hemoliz (Sekil 3.1) veya Alfa hemoliz olarak değerlendirildi.



Şekil 3.1. Kanlı agarda Beta hemoliz zonlu koloniler

### Gram Boyama

Temiz lamlar üzerinde 1 damla steril fizyolojik su ile kültürden alınan koloni muhafaza edilerek yayıldı hava da kurutmaya bırakıldı. Kuruması sonrası preparat 1-2 kez bek alevinden geçirilerek sabitlemesi yapıldı. Bu hazırlanmış preparatın üzerine tüm çözeltileri hazır ticari kitler halinde kullanılmış olan gram boyama seti (RTA) prosedürüne göre; ilk önce kristal viyole damlatılıp 1 dk beklenildi (Şekil 3.2). Distile su ile yıkandı. Sonrasında lugol çözeltisi damlatılarak 1 dk beklemenin ardından distile su ile yıkandı. Preparatın üzerine %96'lık etil alkol damlatılıp 30 sn bekleme sonrasında distile su ile yıkandı. Son olarak sulu fuksin damlatılarak 40 sn bekletildi ve distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlara immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta 100'lük objektifte incelendi. Pembe renkli bakteriler Gram negatif olarak değerlendirildi. Mor renkli bakteriler Gram pozitif olup çomak şekilliler *Bacillus* cinsi özelliğinde ayırt edildi.



Şekil 3.2. Gram boyamada kristal viyole aşamasındaki preparatlar

### Hareket Tespiti

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

### Kapsül Boyama

Temiz bir lam üzerine %6 glikoz solüsyonundan konularak, kültürden alınan mikroorganizma ile karıştırıldı. Bu karışıma 1 damla çin mürekkebi ilave edilerek homojen bir hale getirildi. Diğer bir lamın kısa kenarı ile ince bir tabaka halinde yayılıp havada kurumaya bırakıldı. Preparat metil alkol ile tespit edilerek, metil violet solüsyona konarak 2 dk bekletildi. Su ile yıkanıp kurutuldu. Mikroskopta immersiyon yağı eşliğinde incelenip siyah zeminde beyaz kapsül varlığına bakıldı (Bilgehan, 1995).

### Spor Boyama

Sporların görülmesi amacıyla en yaygın olarak kullanılan yöntem Schaffer-Fulton yöntemidir. Temiz bir lam üzerine 1 damla steril fizyolojik tuz çözeltisi damlatılıp bunzen bek alevinde sterilize edildi. Soğuması için beklendi. Besi yerinden bir miktar kültür alınıp steril su ile karıştırıldı. Kuruması için bir süre beklemenin ardından pens

yardımıyla ucundan tutulan lam bunzen alevinden 20 kez geçirildi ve üzeri kurutma kağıdı ile kaplandı. Üzerine hazır ticari malachit yeşili çözeltisi dökülüp preparat 5 dk hafif alev üzerinde ısıtıldı. Yavaş bir şekilde musluk suyu ile 10 sn yıkandı. Karşıt boyama için safranin ile 15 sn boyanması sağlandı ve su ile yıkanarak kurutma kağıdı ile kurutuldu. İmmersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifte incelendi. Sporlar yeşil basiller kırmızı pembe olarak görüldü (Bilgehan, 1995).

*Bacillus* izolatları endospor izlemesi faz kontrast mikroskop incelemesi ile yapıldı.

### İndol Testi

NA'dan öze ile alınan koloni örnekleri steril kurutma kağıdı üzerine sürülerek yayım yapılarak ve üzerine ticari kovacs ayırıcı damlatıldı. Kırmızı renk oluşması indol pozitif sonuç olarak değerlendirilirken kırmızı renk oluşturmayan izolatlar indol negatif olarak kaydedildi (Bilgehan, 1995).

### Katalaz Testi

İncelenecek kültürümüzden öze ile alınan örnek temiz bir lam üzerine sürülüp 1-2 damla üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılması sonrası hava kabarcıklarının çıkışı Katalaz pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

### Koagülaz Testi

Lamda koagülasyon testi için temiz bir lam üzerine 1 damla steril fizyolojik su koyularak besi yerinden 1-2 koloni alındı. Sıvı ile bir süspansiyon yapıp 1 damla steril taze plazma konuldu. Homojenize edilmesi sonrası 10-30 saniye içinde kümeleşme oluşması koagülaz pozitif kabul edilirken kümeleşmenin olmaması koagülaz negatif değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

## Oksidaz Testi

Bir parça steril filtre kağıdı oksalat solüsyonu ile ıslatılarak filtre kağıdının mavi renk vermemesine dikkat edilip öze ile kanlı agardaki aktif kolonilerden bir miktar alınarak filtre kağıdının üzerine yayıldı. En geç 60 sn içerisinde mavi veya mor renk oluşumu oksidaz pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

### **3.2.3. *Bacillus* türlerinin kolorimetrik tanımlaması**

Morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testler sonrasında *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenen 21 izolatın kolorimetrik olarak tür tanımlamaları Amasya Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışıldı. BIOMERIUX prosedürüne derişimi cihazda 0.55 McF'de ayarlanan kültürler bakteri tanımlama cihazı VITEK 2 Compact Alert (Şekil 3.3) veri tabanına göre *Bacillus* tür tanımlamaları yapıldı.



Şekil 3.3. *Bacillus* tür tanımlaması yapılacak izolatların VITEK 2 cihazına yüklenmesi

### 3.2.4. *Bacillus* izolatlarında yapılan moleküler testler

#### Bakteri DNA İzolasyonu

Bakterilerin kromozomal DNA izolasyonları Maniatis'e göre yapılmıştır. *Bacillus* izolatları 5 ml'lik nütrient buyyon (NB) sıvı besiyerine ekilerek ve 31°C'de 24 saat inkübasyon sonrası hücre kültürleri ependorf tüplerde santrifüj edilerek (13.000 rpm, 2 dk) çöktürüldü ve besiyeri uzaklaştırıldı. Elde edilen ilk pelletler 500 ml STE tamponunda ikinci kez çözülerek, her bir tüp 10 µg lizozimde 37°C'de bir saat bekletildi. Sonrasında, her bir tüp 0,1ml 3 M sodyum asetat eklenerek 65°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine 500 µl fenol / kloroform / izoamilalkol (25/24/1) çözeltisi ilave edilerek 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstteki sıvı kısım steril tüplere alındı. Üzerine 2 ml etil alkol (%96) eklenerek -20°C'de 30 dk derin dondurucuda inkübe sonrasında santrifüj edilerek (13.000 rpm) bakteri DNA'sı pellet halinde elde edildi. DNA'lar %70'lik etil alkol ile yıkanarak kurutuldu. Elde edilen DNA pelletleri 60 µl TE tamponu (10 mM Tris, 1 mM EDTA) içerisinde, kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

#### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Sekans analizleri için yapılan PCR protokolü aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

95°C 5 dk / 1 defa (Ön Isıtma Aşaması )

95°C 45 sn  
60°C 45 sn  
72°C 1 dk } 35 defa

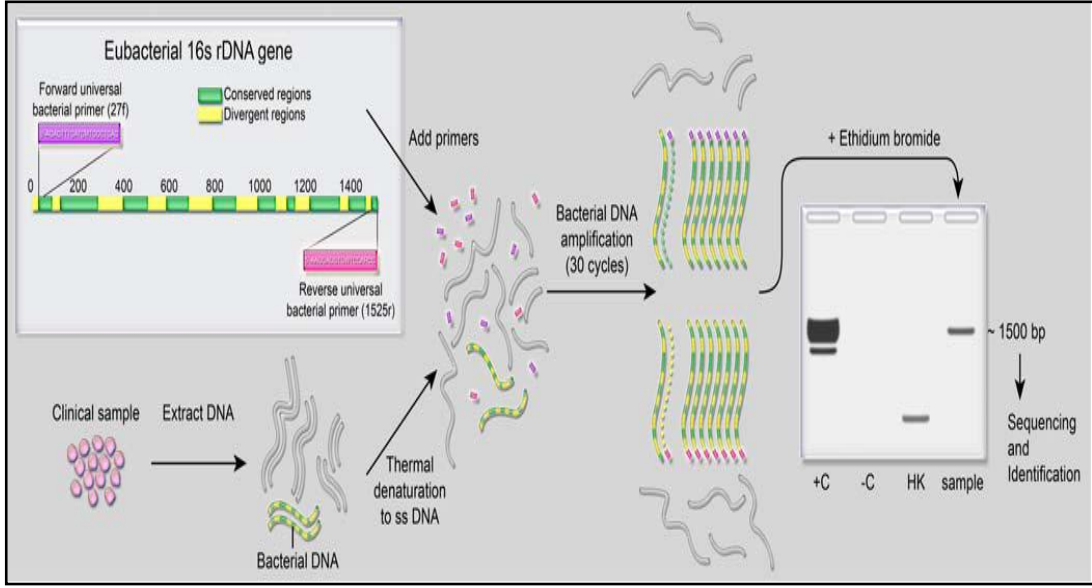
72°C 10 dk / 1 defa (Son Uzama Aşaması)

*Bt* primerleri ile *Cry* gen tesbiti için yapılan PCR protokolü aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

98°C 2 dk / 1 defa (Ön Isıtma Aşaması )

98°C 10 sn  
55°C 30 sn  
72°C 1 dk } 35 defa

72°C 5 dk / 1 defa (Son Uzama Aşaması)



Şekil 3.4. 16s rDNA PCR işlemi şematize gösterimi (Anonim, b)

### Agaroz Jel Elektroforezi (AGE)

Bakteri DNA'ların yürütülmesinde 1xTAE tamponu içinde kaynatılarak çözüldükten sonra etidyum bromür (EtBr) ilave edilerek hazırlanmış %0,8'lik agaroz jel kullanıldı. Kullanılan elektroferez (BIORAD) yatay konumda olup jel plaklarının büyüklüğü 70x70 mm'dir. Elektroferez işleminden önce RNA'nın parçalanması için plazmit DNA'lara 1 µl RNaz çözeltisi ilave edildi. 1 saat 37°C' de inkübasyona bırakıldı. Örneklerin 20 µl'si boyama tamponu ile boyanmış ve hazırlanan jele yüklendi. Yüklenen örnekler 1xTAE tamponu içinde 70 V'ta 3-3,5 saat süre ile yürütüldü. Yürütme işleminin sonunda plazmit DNA'ların görüntülenmesi ultraviyole cihazında UV ışık altında yapıldı (Maniatis ve ark., 1989). Jellerin fotoğrafları dijital olarak bilgisayar ortamında çekildi.



## 4. BULGULAR

*Bacillus* cinsine ait bakteri türlerinin izolasyonu için nutrient agar (NA) besi yeri kullanıldı. Amasya iline ait farklı lokasyonlardan (Akbilek, Şeyhcui, Hacılar ve merkez) örneklem yapılarak, sırası ile bu bölgelerden alınan örnekler belirli bir kodlama ile işaretlendi.

Saf kültür olarak elde edilen bakteriler çeşitli tanımlama testlerine (morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler) tabi tutularak örneklemin yapıldığı bölgelere göre bakteri *Bacillus* cinsi bakteriler test sonuçları aşağıdaki çizelgede örneklem alanına göre gösterilmiştir.

### 4.1. Beş Farklı Bölgeden Alınan Örneklerden Bakteri İzolasyonu

#### 4.1.1. Örneklem 1 (A)

Bakteri izolasyon örneklemini yaptığımız 1. Bölgemiz (A) Akbilek mevkiinde bulunan bahçeden beş farklı örnek alınmış ve alınan bu örneklerden bakteri izolasyonu yapılarak sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Bölge A örneklemleri

Yer No.	Örneklem Türü	Sporlu Bakteri İzolatları
A1	Elma Meyve	US19, US20
A2	Toprak	US5, US6, US7, US8
A3	Elma Yeşil Yaprak	-
A4	Elma Kuru Yaprak	US23, US24
A5	Toprak+Meyve+Yaprak	US1, US2, US3, US4

#### 4.1.2. Örneklem 2 (B)

Bakteri izolasyon örneklemini yaptığımız 2. Bölgemiz (B) Şeyhcui mevkiinde bulunan bahçeden elde edilen 4 farklı örnek alındı ve bakteri izolasyonu yapılarak sonuçlar Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

#### Çizelge 4.2. Bölge B örneklemi

Yer No.	Örneklem Türü	Sporlu Bakteri İzolatları
B1	Elma Meyve	US21, US22
B2	Toprak	US9, US10, US11
B3	Elma Yeşil Yaprak	-
B4	Toprak+Meyve+Yaprak	US12, US13, US14

#### 4.1.3. Örneklem 3 (C)

Bakteri izolasyon örnekleme yaptığımız 3. bölgemiz (C) Hacılar mevkiinde bulunan bahçeden 3 farklı örnek alınmış ve izolasyon sonuçları Çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

#### Çizelge 4.3. Bölge C örneklemi

Yer No.	Örneklem Türü	Sporlu Bakteri İzolatları
C1	Elma Meyve	-
C2	Elma Kuru Yaprak	-
C3	Elma Yeşil Yaprak	-

#### 4.1.4. Örneklem 4 (D)

Örneklem bölgemizin 4.’sü (D) Amasya merkezde bulunan mesken aralarından 6 farklı örnek alındı ve bakteri izolasyonu yapılarak sonuçlar Çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

#### Çizelge 4.4. Bölge D örneklemi

Yer No.	Örneklem Türü	Sporlu Bakteri İzolatları
D1	Karışık Kuru Yaprak	-
D2	Elma Yaprak	-
D3	Ayva Yaprak	-
D4	Kayısı Yaprak	-
D5	Nar Yaprak	US25, US26
D6	Toprak	US15, US16, US17, US18

#### 4.1.5. Örneklem 5 (E)

Örneklem Bölgemizin 5.'si (E) Şeyhçi bölgesinde bulunan mesken aralarından 10 farklı örnek alındı ve bakteri izolasyonu yapılarak sonuçlar Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Bölge E örneklemeleri

Yer No.	Örneklem Türü	Sporlu Bakteri İzolatları
E1	Karışık Kuru Yaprak	-
E2	Kayısı Meyve	-
E3	Kayısı Yaprak	-
E4	Nar Yaprak	US27
E5	Elma Yaprak	-
E6	Elma Meyve	US28
E7	Ceviz Yaprak	-
E8	Ayva Yaprak	-
E9	İğde Meyve	-
E10	İğde Yaprak	US29

Beş farklı bölge alan örneklerden bakteri izolasyonu yapılan mevkiler ve her mevkiye ait örnekleri içeren tablo Çizelge 4.6'daki gibidir.

Çizelge 4.6. Beş örneklem sonunda elde edilen izolatlar

Sayı	İzolat No.	Yer No.	Örnek	Yer Mevki
1	US1	A5	Toprak+Meyve+Yaprak	Akbilek Bahçe
2	US2	A5	Toprak+Meyve+Yaprak	Akbilek Bahçe
3	US3	A5	Toprak+Meyve+Yaprak	Akbilek Bahçe
4	US4	A5	Toprak+Meyve+Yaprak	Akbilek Bahçe
5	US5	A2	Toprak	Akbilek Bahçe
6	US6	A2	Toprak	Akbilek Bahçe
7	US7	A2	Toprak	Akbilek Bahçe
8	US8	A2	Toprak	Akbilek Bahçe
9	US9	B2	Toprak	Şeyhcuı Bahçe
10	US10	B2	Toprak	Şeyhcuı Bahçe
11	US11	B2	Toprak	Şeyhcuı Bahçe
12	US12	B4	Toprak+Meyve+Yaprak	Şeyhcuı Bahçe
13	US13	B4	Toprak+Meyve+Yaprak	Şeyhcuı Bahçe
14	US14	B4	Toprak+Meyve+Yaprak	Şeyhcuı Bahçe
15	US15	D6	Toprak	Merkez Mesken
16	US16	D6	Toprak	Merkez Mesken
17	US17	D6	Toprak	Merkez Mesken
18	US18	D6	Toprak	Merkez Mesken
19	US19	A1	Elma Meyve	Akbilek Bahçe
20	US20	A1	Elma Meyve	Akbilek Bahçe
21	US21	B1	Elma Meyve	Şeyhcuı Bahçe
22	US22	B1	Elma Meyve	Şeyhcuı Bahçe
23	US23	A4	Elma Kuru Yaprak	Akbilek Bahçe
24	US24	A4	Elma Kuru Yaprak	Akbilek Bahçe
25	US25	D5	Nar Yaprak	Merkez Mesken
26	US26	D5	Nar Yaprak	Merkez Mesken
27	US27	E4	Nar Yaprak	Şeyhcuı Mesken
28	US28	E6	Elma Meyve	Şeyhcuı Mesken
29	US29	E10	İğde Yaprak	Şeyhcuı Mesken

#### 4.2. İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik ve Mikroskopik Bulguları

Bakteri üremesi olan örneklerden farklı mevkilere ait 29 farklı izolatın morfolojik ve mikroskopik yönden incelenmesi sonucunda Çizelge 4.7'deki gibi belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. İzolatlara ait makroskobik ve mikroskobik inceleme sonuçları

İzolat No.	Yer No.	NA kolonileri (beyaz)	Hemoliz (Kanlı Agar)	Gram Boyama	Mikroskobik Şekil	Endospor
US1	A5	Püsküllü	-	Pozitif	Çubuksu	-
US2	A5	Parlak	Alfa	Pozitif	Çubuksu	-
US3	A5	Mat - Kaplamalı	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US4	A5	Mat	-	Pozitif	Çubuksu	-
US5	A2	Sümüksü	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US6	A2	Püsküllü	Beta?	Pozitif	Çubuksu	-
US7	A2	Parlak	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US8	A2	Mat	Beta	Pozitif	Çubuksu	-
US9	B2	Mat - Kaplamalı	Beta	Pozitif	Çubuksu	-
US10	B2	Parlak	Alfa	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US11	B2	Parlak - Küçük	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US12	B4	Mat – Büyük	Beta	Pozitif	Çubuksu	-
US13	B4	Parlak - Ortaboy	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US14	B4	Püsküllü	Beta	Pozitif	Çubuksu	-
US15	D6	Mat – Kaplamalı	Beta	Pozitif	Kokobasil	Sporlu
US16	D6	Mat – Büyük	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US17	D6	Sümüksü – Büyük	Beta	Pozitif	Çubuksu	-
US18	D6	Küçük Beyaz	Beta	Pozitif	Çubuksu	-
US19	A1	Orta boy- Beyaz	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US20	A1	Büyük Beyaz	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US21	B1	Küçük Beyaz	Beta	Pozitif	Çubuksu	-
US22	B1	Büyük Beyaz	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US23	A4	Mat - Büyük	Beta	Pozitif	Çubuksu	-
US24	A4	Sümüksü - Büyük	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US25	D5	Mat – Ortaboy	-	Pozitif	Çubuksu	-
US26	D5	Sümüksü - Büyük	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US27	E4	Sümüksü – Orta boy	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US28	E6	Sümüksü – Orta boy	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu
US29	E10	Sümüksü – Orta boy	Beta	Pozitif	Çubuksu	Sporlu

### 4.3. İzole Edilen Bakterilerin Fizyolojik ve Biyokimyasal Aktivite Testleri

Morfolojik ve yapısal yönden incelenen 29 farklı izolat biyokimyasal ve serolojik aktivite testlerine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. İzolatlara ait biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları

İzolat No.	Yer No.	Oksijen (Aerop)	Hareket	Kapsül	Katalaz	Oksidaz	İndol
US1	A5	+	+				
US2	A5	+	+				
US3	A5	+	+	Yok	+	+	Negatif
US4	A5	+	+		+	+	Negatif
US5	A2	+	+	Yok	+	+	Negatif
US6	A2	+	+		+	+	Negatif
US7	A2	+	+	Yok	+	+	Negatif
US8	A2	+	+		+	+	Negatif
US9	B2	+	+		+	+	Negatif
US10	B2	+	+	Yok	+	+	Negatif
US11	B2	+	+	Yok	+	+	Negatif
US12	B4	+	+		+	+	Negatif
US13	B4	+	+	Yok	+	+	Negatif
US14	B4	+	+		+	+	Negatif
US15	D6	+	+	Yok	+	+	Negatif
US16	D6	+	+	Yok	+	+	Negatif
US17	D6	+	+				Negatif
US18	D6	+	+				Negatif
US19	A1	+	+	Yok	+	+	Negatif
US20	A1	+	+	Yok	+	+	Negatif
US21	B1	+	+		+	+	Negatif
US22	B1	+	+	Yok	+	+	Negatif
US23	A4	+	+		+	+	Negatif
US24	A4	+	+	Yok	+	+	Negatif
US25	D5	+	+				
US26	D5	+	+	Yok	+	+	Negatif
US27	E4	+	+	Yok	+	+	Negatif
US28	E6	+	+	Yok	+	+	Negatif
US29	E10	+	+	Yok	+	+	Negatif

#### 4.4. İzole Edilen Bakterilerin Kolorimetrik Tanımlamaları

Biyokimyasal ve fizyolojik testleri sonucunda *Bacillus* cinsine ait olduğu kanısına varılan 23 farklı izolatlarımız Amasya Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan ve bakterileri kolorimetrik yönden inceleyerek tür tanımlaması yapan Vitek 2 Compact (Biomeriux) cihazında tanımlamaları yapılarak *Bacillus* cinsine ait bakteriler tanımlandı.

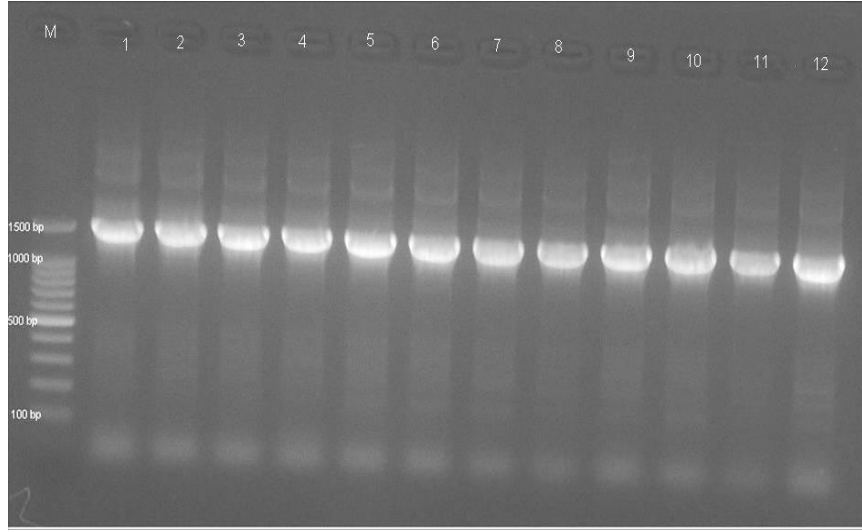
Elimizdeki 23 izolattan US1, US3, US6, US23' ün Vitek 2 Compact cihazı ile *Bacillus* cinsine ait olarak tanımlanamadığı çalışmada *Bacillus* türlerinde tanımlanan 19 izolatın kolorimetrik yönden tanımlaması sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir. *Bacillus cereus* grubu olarak 3 ortak tür arasında sonuç alınan US10, US11, US13, US16, US19, US20 ve US26 izolatlarında kesin tanımlama için moleküler tanımlama önerilmiştir.

Çizelge 4.9. *Bacillus* türü izolatların VITEK 2 cihazı tanımlama sonuçları

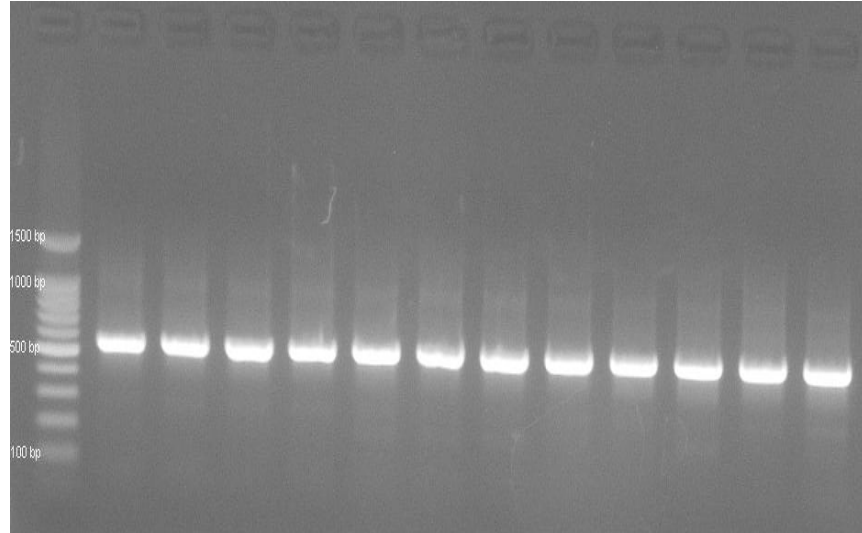
İzolat no.	Mevki	VITEK2 %'si	Kolorimetrik Tanımlama Sonucu (VITEK 2 COMPACT)
US2	A5	0,95	<i>B. smithii</i>
US5	A2	0,98	<i>B. pumilus</i>
US7	A2	0,96	<i>B. pumilus</i>
US8	A2	0,94	<i>B. megatorium</i>
US10	B2	0,99	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides ?</i>
US11	B2	0,99	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides ?</i>
US13	B4	0,99	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides ?</i>
US15	D6	0,95	<i>B. subtilis</i>
US16	D6	0,99	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides ?</i>
US17	D6	0,96	<i>B. licheniformis</i>
US19	A1	0,99	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides ?</i>
US20	A1	0,99	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides ?</i>
US21	B1	0,89	<i>B. pumilus</i>
US22	B1	0,93	<i>B. pumilus</i>
US24	A4	0,90	<i>B. lentus</i>
US26	D5	0,99	<i>B.cereus, B.thuringiensis., B. mycoides ?</i>
US27	E4	0,96	<i>B. pumilus</i>
US28	E6	0,90	<i>B. pumilus</i>
US29	E10	0,95	<i>B. pumilus</i>

#### 4.5. İzole Edilen Bakterilerin 16s rDNA Sekans Analizi Sonuçları

Vitek 2 Compact cihazında çalışılan *Bacillus* türü olarak tanımlanmış 19 izolattan kesin tür tanımlaması için Trabzon Su Ürünleri Enstitüsü Viroloji Laboratuvarında DNA izolasyonları (Şekil 4.1) yapılan entomopatojen özelliği olduğu düşünülen 12 izolatın 16s rDNA sekans analizi sonuçlarında belirlenen tür listesi aşağıda Çizelge 4.10'da verilmiştir.



a



b

Şekil 4.1(a,b). AGE yürütmelerinde DNA bantları: a) 1465 bp, b) 492 bp.



Çizelge 4.10. *Bacillus* türü izolatlar 16s rDNA analiz sonuçları (DETA-GEN, Kayseri)

Sıra No	İzolat Kodları	Tanım Kodları	Bakteri Türleri	Tanımlama %'si
1	US20-A1	-	<i>Bacillus thuringiensis</i>	%97
2	US13-B4	<u>GQ280810.1</u>	<i>Bacillus cereus</i> , NA5	%99
3	US10-B2	<u>AB680181.1</u>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	%99
4	US11-B2	<u>JN816401.1</u>	<i>Bacillus thuringiensis</i> , GS2	%99
5	US29-E10	<u>EU982476.1</u>	<i>Bacillus pumilus</i>	%99
6	US27-E4	<u>JN540803.1</u>	<i>Bacillus pumilus</i> , FJAT	%99
7	US28-E6	<u>EU369175.1</u>	<i>Bacillus pumilus</i>	%98
8	US19-A1	-	<i>Bacillus thuringiensis.</i>	%99
9	US2-A5	-	<i>Bacillus smithii</i>	%97
10	US7- A2	<u>EU373436.1</u>	<i>Bacillus pumilus</i>	%99
11	US26-D5	<u>FJ601899.1</u>	<i>Bacillus thuringiensis</i> , INRS3	%99
12	US17-D6	-	<i>B. licheniformis</i>	%97

#### 4.6. 16s rDNA Sekans Analizi Neticesindeki Nükleotit Dizilimleri

16s rDNA sekans analizi neticesinde tür seviyesinde tanımlanan 12 *Bacillus* türü izolata ait baz dizilimleri DETA-GEN (Kayseri) firmasında ayrıca yaptırıp alınmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11(a). US20-A1 *Bacillus thuringiensis* baz dizilimi

<p>GTAACACGTGGGCAACCTGCCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTTCTTTCT  CGCATGAGAGAAGATGGAAAGACGGTTTACGCTGTCACTTATAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGG  TAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA  GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGAA  GAAGGCCTTCGGGTCGTAAGTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCAGAGTAACTGCTGGTACCTTGACGGTACC  TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG  GGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAC  TGGGGAACCTTGAGTGAGAAAGAGAAAGTGAATTCCTCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACAC  CAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC  CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGTGCTGCAGCTAACGCATTA  AGCACTCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC  ATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTC  CCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA  ACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA  AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGC  TGCAAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCCATAAAGCCATTCTAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCATGAA  GCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA  CCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCGG</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Çizelge 4.11(b). US13-B4 *Bacillus cereus*, NA5 baz dizilimi

```
GAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCTAGTTGAAT AAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCA ACCGTGGAGGGTCAATTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCGGTCTGTAACAGACTGAGGCGCGAAAAGCGTG GGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCT TTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGG GGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG AAAACCCCTAGAGTAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCGACGTCGTA GA GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACCTAAAGGTGACT GCCGTTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGG CTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT TGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAA
```

Çizelge 4.11(c). US10-B2 *Bacillus thuringiensis* baz dizilimi

```
TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATA CCGGATAAYATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGC ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGC AACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCTAGTTGAATAAGC TGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACGTAAGGTGGTGGCAAG CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGT GGAGGGTCAATTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAG CAAAACAGGATTAGTACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGT GCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGC CCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAA CCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGT TGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTAAGGTGACTGCGG TGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG GACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCA ACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC ACACCGCCCGTACACCACGAGAGT
```

Çizelge 4.11(d). US11-B2 *Bacillus thuringiensis* , GS2 baz dizilimi

```
GAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCC GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAYATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTA TGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG ACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACA AGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA AAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGAAATCCATG TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCGGTCTGTAACAGACTGAG GCGCGAAAAGCGGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAG AGGGTTTCCGCCCTTAGTGTGAAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAAC TC AAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG TCTTGACATCCTCTGAAAACCTTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC AGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGC ACTCTAAGGTGACTGCCGCTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG CTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTTCTCA GTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAA
```

Çizelge 4.11(e). US29-E10 *Bacillus pumilus* baz dizilimi.

```
GGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTC
CGGAAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTT
ACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACCGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAGTGTAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAA
CAAGTGCAAGAGTAACCTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAAACCTGGGAAAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCAC
GTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGTACGCTGA
GGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTA
GGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAAAGACTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACAGTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT
CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTYAGTTGGG
CACTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCAAAAATCTGTTCTC
AGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA
TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAA
```

Çizelge 4.11(f). US27-E4 *Bacillus pumilus*, FJAT baz dizilimi

```
AGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAAACCGGAGCTAATAC
CGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCA
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCA
ACGCCGCTGAGTGATGAAAGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGGCAGAGTAACCTGCTC
GCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAACCGCACGGCTTACCTAGCTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTAGGTGACTGCCAAGCG
TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCKGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGG
GAGGGTCAATTGAAAACCTGGGAAAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGC
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTG
CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCTGACAACC
CTAGAGATAGGGCTTTCCTTCCGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTCCAGCATTACAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCAAGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA
CAGAACAAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCATAAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAAC
TCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
ACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTTCGGTGAGG
```

Çizelge 4.11(g). US28-E6 *Bacillus pumilus* baz dizilimi

```
GCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGG
AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAG
ATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAAGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
GCGAGAGTAACCTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGC
CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAAACCTGGGAAAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTA
GCGGTGAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAG
CGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGG
GTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAAAGACTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
GACATCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGC
TCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGTTGGGCACT
CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTA
CACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCATAAATCTGTTCTCAGTT
CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCGTACACC
```

Çizelge 4.11(h). US19-A1 *Bacillus thuringiensis* baz dizilimi

```
TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAACGAAGAAGGCCCTTCGGGTCTGAAAGT
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCAGAGTAACTGCTGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGG
TTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGAGGGTTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGA
GGAAAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTG
GTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACG
GCCGAAGGCTGAAAACCTCAAATTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGTGCTGA
AGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCA
CAAGCGGTGGAGTGTGGTTAATTGGAAGCAAGCAAGCAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCCTA
GAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
```

Çizelge 4.11(i). US2-A5 *Bacillus smithii* baz dizilimi

```
GCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGG
GAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTGAACTGCATGGTTCGAAATTGAAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATG
GATGGACCCGCGTCGATTAGCTAGTTGGTGGTACCGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGAC
GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAGGCTTTCGGGTCTGAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG
TGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGC
GGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAG
GGTTTCCGCCCTTATGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAA
AGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCT
TGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
CTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCAC
TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACAGTGTACAATGGACGGTACAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTCTCAGT
TCGGATTGTAGGTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
GTTCCCAGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGTAA
```

Çizelge 4.11(j). US7- A2 *Bacillus pumilus* baz dizilimi

```
GAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTAC
AGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGTGTCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGG
ACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTGCAGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCCGGCTAACCGGGGAGGGTTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGTGAATTCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAG
GAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAG
GGGGTTTCCGCCCTTATGTGCTGACGTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAAACCT
AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGG
TCTTGACATCCTCTGACAACCCCTAGAGATAGGGCTTTCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
AGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGC
ACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
CTACACAGTGTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAAATCCATAAATCKGTTCTCA
GTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCAGGCTTGTACACACCGCC
```

Çizelge 4.11(k). US26-D5 *Bacillus thuringiensis*, INRS3 baz dizilimi

```
TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAYATTTTGA
AACTGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAACGGGTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
ATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGT
ACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGG
AAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGGGAAAGGAGGAACACCAGGGA?GG
CGACTTTCGGTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGKGCCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGG
GGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTC
GAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAG
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTT
GATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAATCATCATGCCCTTATGACTGGGCTACACAGTGTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGG
TGGAGCTAATCTCATAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
```

Çizelge 4.11(l). US17-D6 *Bacillus licheniformis* baz dizilimi

```
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGGGAGG?AACACCAGTGG
CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGT?AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACT
CCGCTTGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCG
GGGCGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGGCGAACAAGGGCAGCGAAGC
CGCGAGGCTAAGCCAATCCCAAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAAT
CGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTACACCACGAGA
GT
```

#### 4.7. *Bacillus thuringiensis* İzolatların *Cry* Gen PCR ve Jel Elektroforezi

16s rDNA sekans analizleri sonucunda *Bacillus thuringiensis* olduğu bilinen izolatlarda entomopatojenite tesbiti için *cry* gen *Bt* primerlerine göre Agaroz jel elektroforezi ve bantlanma karşılaştırması yapıldı.

Kontrol olarak *Bacillus thuringiensis* subs. *israilensis* suşları kullanılmış ve Bt1, Bt2 ve Bt3 olarak numaralanmıştır. *Bacillus thuringiensis* olarak tanımladığımız izolatlarımızdan US10(B2), US11(B2), US19(A1), US20(A1) ve US26(D5) kullanılmıştır.

Kontrol olarak kullanılan Bt1’de 900 bp ve 700 bp civarı iki bant, Bt2 ve Bt3’te 1000 bp civarı birer bant gözlenirken, izolatlarımızdan US19 ve US20’de 1500 bp civarı bantlar gözlenmiştir. US10, US11 ve US26’da ise bant gözlenmemiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Agaroz jel elektroferez yürütmelerinde *cry* gen bantları

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1. Tartışma

*Bacillus* izolatların gram boyama ve koloni morfolojilerinin literatürde yer alan *B. thuringiensis* morfolojisine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak morfolojik karakterizasyonun çok güvenilir bir yöntem olmadığı genelde bilinmekle birlikte, ana gruplara ayırmada önemlidir (İriarte ve ark., 2000). *B. thuringiensis* izolatlarının birbirlerinden farklı morfolojik özelliklere sahip olduğu gözlenebilmektedir. İzole edilen birçok suşun birbiriyle karıştırılması, suşlar arasında ayırım geliştirmek ve suşların teşhisinin doğruluğunu ispatlamak zorunluluğunu gündeme getirmiştir. Ancak, sınıflandırma için geliştirilen morfolojik ve biyokimyasal testler yanında fenotipik özellikler suşların ayırımı için yeterli olmadığından değişik yöntemler geliştirilmiştir (Shareef ve ark., 1991). Bu sebeple çalışmamızda morfolojik ve mikroskopik özellikleri ile fizyolojik ve biyokimyasal aktivite testleri sonrasında kolometrik tanımlamaya ilaveten moleküler tanımlamalara da yer verilmiştir.

*B. thuringiensis*'in insektisidal aktivitesinin, sporulasyon sırasında parasporal kristal formda proteinleri sentezleyebilme yeteneğinden dolayı olduğu bildirilmiştir. Bu kristal proteinler plazmit DNA üzerinde yerleşen *cry* genler ile sentezlenmektedir. Yapılan çalışmalar *cry* gen çeşitlerinin insektisidal aktivitede önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu yüzden bir *B. thuringiensis* suşunun *cry* gen içeriğinin tanımlanması o suşun insektisidal potansiyelinin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Son yıllarda *B. thuringiensis* izolatlarının *cry* geni içeriklerinin belirlenmesi için PCR'a dayalı yöntemler kullanılmaktadır (Gleave ve ark.,1993; Jain ve ark. 2017).

Literatürde *B. thuringiensis* suş karakterizasyonu için önemli bir yöntem olduğu vurgulandığından, bu tez çalışmasındaki *B. thuringiensis* izolatlarının entomopatojenik  $\delta$ -endotoksin (*cry*) gen taraması yapılarak tanımlanmıştır.

Ribozomal DNA genleri (rDNA) (16s, 23s ve 5s) bakterilerde yüksek derecede korunmuş bölgeler olup bunlar arasında özellikle de 16s rDNA genleri bakteri türleri arasında filogenetik yakınlığın belirlemek için oldukça sık kullanılmaktadır (Rainey ve ark.,1994) 16s rDNA dizi analizinin tür ya da cins seviyesinde bilinmeyen bakterilerin

tanımlanması ve sınıflandırılması için kesin bir yöntem olduğu düşünülmektedir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012). Bizim çalışmamızda bu yöntemler kullanılarak Amasya yöresinin farklı lokasyonlarından izole ettiğimiz *Bacillus* türü izolatların (US19 ve US20) entomopatojen *cry* gen varlıkları incelenerek belirlenmiştir.

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde tarım alanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olan zararlı böcekler ile mücadele kullanılan kimyasal ilaçların ekosistemde meydana getirmiş olduğu zararlı etkiler nedeniyle alternatif yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerin en önemlisi de “biyolojik mücadele”dir. Biyolojik mücadelede bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar ve protozoa grubuna ait organizmalar biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır (Demirbağ ve ark. 2008).

Entomopatojenik bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış ve hala yapılmaktadır. Tarım alanlarında ve ormanlarda zarara yol açan böcekler etkisiz hale getirme cabaları günümüzde farklı ülkelerde yeni mikrobiyal ticari ürünler elde edebilme yolunda devam etmektedir. Bu anlamda *B. thuringiensis* bakterisinin ve bakteride bulunan kristal yapıda toksin üreten *cry* genlerinin moleküler düzeyde aydınlatılması büyük önem taşımaktadır (Tatar, 2008).

Entomopatojen bakteriler arasında, toprak grubu bakteriler gelecekte en çok önem arz edecek biyolojik kontrol ajanlarıdır. Özellikle *Bacillus* grubu bakteriler önemli bir yer teşkil ederler. Çalışmamızda elde ettiğimiz *B. thuringiensis* izolatlar (US19 ve US20)’ın potansiyel bakteriyel pestisit olabileceği yapılan moleküler analizlerle gözlenmiştir. Bu nedenle ülkemiz potansiyel bakteriyel biyopestisit izolasyonlarına katkı sağlanmıştır.

## 5.2. Sonuç

Bu çalışmada Amasya iline ait farklı lokalitelerden (Akbilek, Şeyhçui, Hacılar, Merkez) alınan toprak, meyve, yaprak örneklerinden bakteri izolasyonu sonrası biyokimyasal ve fizyolojik testlere tabi tutularak sınıflandırılması yapılmıştır. Bunu takiben Vitek 2 Compact (Biomeriux) kolorimetrik tanımlama cihazı ile tür tanımlamaları yapıldı. Kesinlik açısından moleküler tanımlama için DNA’ları izole edilen *Bacillus* türü izolatlar 16s rDNA sekans analizine tabi tutuldu ve bakterilerin tür teşhisleri kesinleştirildi. Neticede; “*B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pumilus*, *B.*



*smithii*, *B. megatorium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*” türlerine ait izolatlar elde edildi. *Bacillus thuringiensis* türüne ait olduğu bilinen izolatlarda entomopatojenlik araştırması için *cry* gen taraması yapıldı.

Sonuç olarak :

- a) 5 farklı bölgeden toplanan 70 örnekten yapılan ekimler sonrası morfolojik özellikler göz önüne alınarak *Bacillus* cinsine ait olabileceği düşünülen 29 izolat elde edilmiştir. Çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik testlere tabi tutulan bu izolatlardan 23 tanesinin *Bacillus* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Tür teşhisi için kolorimetrik tanımlamaya tabii tutulan 23 izolatın 19’unun *Bacillus* türlerinden olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan 1 izolatı *B. smithii*, 1 izolatı *B. megatorium*, 1 izolatı *B. subtilis*, 1 izolatı *B. licheniformis*, 1 izolatı *B. lentus*, 7 izolatı *B. pumilus* olarak tanımlanırken, 7 izolatın ise 3 tür (*B. cereus*, *B. mycooides*, *B. thuringiensis*) arasından biri olabileceği sonucu Vitek 2 Compact veri tabanı sonuçlarına göre elde edildi.
- b) 12 izolat için Moleküler tanımlama testleri yapıldı. 16s rDNA sekans analizleri sonrası baz dizilimleri ve kesin tür tanımlamaları (%97-99) yapılmıştır.
- c) Moleküler testler sonucu (16s rDNA PCR, sekans analizi, AGE) Amasya ili Akbilek mevki’den alınan örneklerden elde edilen 2 izolatta (US19 ve US20) *cry* gen varlığı tespit edilmiştir.
- d) US19 ve US20 (*Bacillus thuringiensis*) olarak isimlendirilen bu izolatların kimyasal ilaçların ekosistemde meydana getirmiş olduğu zararlı etkileri ile kıyaslandığında alternatif bir yöntem olarak biyopestisit olarak kullanılabilmesi önerilmiştir.
- e) *Bacillus* izolatlarının gram boyama ve koloni morfolojilerinin literatürde yer alan *Bacillus* cinsi morfolojik özelliklerine benzerlik gösterdiği görülmüştür.
- f) Morfolojik özelliklerin ve biyokimyasal testlerin bakteri cinsi tanımlamasında tek başına yeterli olmadığı, tür tanımlamaları için kolorimetrik tanımlama ile beraber yapılması gerektiği literatürle paralel bir şekilde ön görülmüştür.
- g) Ülkemiz ve Amasya bölgesindeki potansiyel bakteriyel biyopestisit izolasyonlarına katkı sağlanmıştır.

## KAYNAKLAR

- Adang, M.J., Brody, M.S., Cardineau, G., Eagan, N., Roush, R.T., Shewmaker, C.K., Jones, A., Oakes J.V. ve McBride K.E., 1993. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIIIa gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol. Biol.*, 21, 1131-1145, U.S.A.
- Anonim a, <https://pictures.doccheck.com/>, (01.11.2018).
- Anonim b, <https://www.docstoc.com/docs/111158839/Bacterial-Samples>, (05.05.2012).
- Alper, M., Güneş, H., Civelek, H.S., Dursun, O. ve Eskin A., 2013. Doğal *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bacillales: Bacillaceae) izolatlarının *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae), *Ceroplastes rusci* L. (Homoptera: Coccidae) ve *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)'ya karşı toksik etkileri. *Türk. entomol. bült.*, 3(2), 75-87, Muğla.
- Arslan, S., 2010. *Lactobacillus rhamnosus*'un Sünme (Rope) hastalığı etkeni olan *Bacillus* cinsi bakteriler üzerine inhibitör etkisinin unlarda araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üni. Tıp Fak., Adana.
- Aslan, M.M. ve Güzel, G. 2009. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*'nin Salkım Güvesi (*Lobesia botrana* (Den. ve Schiff.)) (Lepidoptera: Tortricidae) ve yararlılara karşı etkilerinin araştırılması. *KSÜ. Doğa Bil. Derg.*, 12(2), 44-51, Kahramanmaraş.
- Azizoğlu, U., Yılmaz, S., Ayvaz, A., Karabörklü, S. ve Akbulut, M. , 2011. Characterization of local *Bacillus thuringiensis* isolates and their toxicity to *Ephesia kuehniella* (Zeller) and *Plodia interpunctella* (Hübner) larvae, Egypt. *J. Biol. Pest. Control*, 21(2), 143-150.
- Azizoğlu, U., Bulut, S. ve Yılmaz, S. (2012). Organik tarımda biyolojik mücadele; entomopatojen biyoinsektisitler. *Erciyes Üni., Fen Bil. Enst. Derg.*, 28(5), 375-381, Kayseri.
- Azizoğlu, U., 2017. Hastalık taşıyıcısı *Culex pipiens* (Diptera:Culicidae)'in biyolojik mücadelesinde yerel *Bacillus thuringiensis* izolatlarının kullanılabilir potansiyelinin araştırılması. *Iğdır Üni. Fen Bil. Enst. Der.*, 7(1), 47-53.
- Beegle, C.C. ve Yamamoto, T., 1992. Invitation Paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development, *Can. Entomology*, 124, 587-616, U.S.A.
- Bağcı, H., Shareef, S. R. ve Özdamar, K., 1991. *Bacillus thuringiensis* varyetelerinin sınıflandırılmasında sayısal taksonominin uygulanması, *Doğa Tr. J. of Biology*, 5, 70-81, Ankara.
- Bilgehan, H., 1992. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Barış Yayınları, İzmir.
- Bilgehan, H., 1995. Klinik Mikrobiyoloji ve Tanı, Barış Yayınları, İzmir.
- Bozlağan, İ., 2006. Kayseri'den alınan toprak örneklerinden elde edilen *Bacillus thuringiensis* suşlarının izolasyonu, tanımlanması ve bazı zararlı böcek türleri üzerindeki toksik etkilerinin araştırılması". Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üni. Fen Bil. Enst., Kayseri.
- Bozlağan, İ., Ayvaz, A., Öztürk, F., Açık, L., Akbulut, M. ve 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. Agricult. and Forestry*, 34, 145-154, Kayseri.
- Berry, C. ve Board, J., 2018. The use of structural modelling to infer structure and function in biocontrol agents. *Journal of Invertebrate Pathology* 142, 23-26.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A. ve Nuñez-Valdez,

- M. E. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. Applied and environmental microbiology, 64(12), 4965-4972.
- Bravo, A., Gill, S.S. ve Soberon, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon, 49, 423-435.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S. ve Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. Insect biochemistry and molecular biology, 41(7), 423-431.
- Bone, L.W., 1989. Activity of commercial *Bacillus thuringiensis* preparations against *Trichostrogylus colubriformis* and *Nippostrrogylus brasiliensis*, J. Invertb. Pathol., 53(2), 276- 277.
- Bonnefoi, A. ve Barjac, H., 1963. Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la determination de l'antigene flagellaire. Entomophaga 8, 223-229.
- Bülbüloğlu, O., 2000. Çesitli toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus thuringiensis*'lerin izolasyonu, karakterizasyonu ve insektisidal etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ. Fen Bil. Enst., Trabzon.
- Carlson, C. R., Gronstad, A. ve Kolsto, A. B., 1992. Physical maps of the genomes of three *Bacillus cereus* strains. Journal of Bacteriology, 174 (11), 3750-3756.
- Carroll, J., Li, J., ve Ellar, D. J., 1989. Proteolytic processing of a coleopteran-specific  $\delta$ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Biochemical journal, 261(1), 99-105.
- Chang, Y. H., Shangkuan, Y. H., Lin, H. C. ve Liu, H. W., 2003. PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells, Applied and Enviromental Microbiology, 69 (8), 4502-4510, U.S.A.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Banerjee, R.K., 2004. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. Curr. Sci. 87(1), 44-53.
- Çetinkaya, E., Ayhan, K., 2012. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. Karaelmas Fen ve Mühendislik Derg., 2(1), 53-62, Ankara.
- Dadaşoğlu, F., 2007. Sera ve tarla zararlılarına karşı etkili biyoajan bakteri strainlerinin izolasyonu ve tanısı. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üni. Fen Bil. Enst., Erzurum.
- Dadaşoğlu, F. ve Dadaşoğlu, E., 2016. Baklagil yem bitkilerinde zararlı olan Curculionidae familyasına ait bazı türlerden entomopatojen bakterilerin izolasyonu ve tanısı. Turkish Journal of Science, 1(1), 20-27, Erzurum.
- De Barjac, H., 1981. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In H. D. Burges (ed.), Microbial control of pests and plant diseases, 1970 - 1980. Academic Press, Inc. Ltd., Londra.
- Demeli, M., Demirbağ, Z. ve Sezen, K., 2014. Isolation and characterization of *Bacillus* from some warehouses in Trabzon. Journal of Applied Biological Sciences, 8 (2), 69-80.
- Demirbağ, Z. Nałçacıoğlu, R., Katı, H., Demir, İ., Sezen, K. ve Ertürk, Ö., 2008, Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele. Esen Ofset, Trabzon.
- Doğanlar, M., Yıldırım, A.E. ve 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, Hatay.
- Donovan, W. P., Rugar, M. J., Slaney, A. C., Malvar, T., Gawron-Burke, M. C. ve Johnson, T. B., 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species. Applied and Environmental Microbiology, 58(12), 3921-3927.
- Ecevit, O., 1988. Zirai mücadele ilaçları ve çevreye olan etkileri. 19 Mayıs Üni.

- Yayımları, 5-8, Samsun.
- Eski, A., Demir, İ., Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2015. An effective biopesticide production, from a local *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* against *Agelastica alni* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae. 5<sup>th</sup> Entomopathogenes and microbial control congress, 09-11 September 2015, Ankara.
- Erem, F., Küçükçetin, A. ve Certel, M., 2013. *Bacillus* türlerinin probiyotik olarak değerlendirilmesi. GIDA (2013), 38(4), 247-254.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nature Reviews Microbiology, 1(2), 117.
- Fakhry, S., Sorrentini, I., Ricca, E., De Felice, M. ve Baccigalupi, L., 2008. Characterization of spore forming *Bacilli* isolated from the human gastrointestinal tract. Journal of applied microbiology, 105(6), 2178-2186.
- Feitelson, J. S., Payne, J. ve Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. Nature Biotechnology, 10(3), 271.
- Fitz-James, P.C. ve Young, F.E., 1969. Morphology Sporulation, the bacterial space (editors) in Gould and Hurst, Academic Press, 39-72, London and New York.
- Gasser, C. S. ve Fraley, R. T., 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. Science, 244(4910), 1293-1299.
- Glare, T. R. ve O'Callaghan, M., 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety, John Wiley and Sons, Ltd., 1-40, Chichester, New York.
- Gleave, A.P., Williams, R. ve Hedges, R.J. 1993. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of cryV-like insecticidal protein genes and characterization of a cryV gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*", Appl. Environ. Microbiol., 59, 1683-1687, Auckland, Yeni Zelanda.
- Göktürk, T., 2017. Pyrethrum ve *Bacillus thuringiensis* biyopestisitlerinin *Pristiphora abietina* (Christ, 1791) (Hymenoptera: Tenthredinidae) üzerindeki etkisi. Artvin Çoruh Üni. Orman Fak. Derg., 18 (1), 83-87. Artvin.
- Han, C.S., Xie, G., ve Challaconbe, J.F., 2006. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol., 188(9), 3382-3390.
- Hansen, B.M., Damgaard, P.H., Eilenberg, J. ve Pedersen, J.C., 1996. *Bacillus thuringiensis* ecology and environmental effects of its use for microbial pest control" (Environmental Project No.316). Ministry of Environment and Energy, Danish Environmental Protection Agency, Copenhagen, Danimarka.
- Heckel, D.G., 2015. The expanding role of ABC proteins in *Bacillus thuringiensis* toxin mode of action: Mechanisms and resistance management. 5<sup>th</sup> Entomopathogenes and microbial control congress, 09-11 September 2015, Ankara.
- Ho, T.T., Duc, L.H., Istitato, R., Baccigalupi, L., Ricca, E., Van, P.H. ve Cutting, S.M., 2001. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model. Appl Environ Microb, 67 (9): 3819-3823.
- Hong, J. H., Kim, J. Y. ve Hur, S. H., 2005. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. Biotechnology letters, 27(5), 313-316.
- Hong, H. A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E. ve Cutting, S. M., 2009. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. Research in microbiology, 160(6), 375-379.
- Höfte, H., ve Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*", Microbiol. Rev., 53, 242-255, London.
- Ibarra, J. E., Rincon, M. C., Orduz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R.,

- Regis, L., Oliveira, M. F., Lanz, H., Rodriguez, M. H., Sanchez, J., Pena, G. ve Bravo, A., 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species, Applied and Environmental Microbiology, 69(9), 5269–5274, U.S.A.
- Iriarte, J., Bel, Y., Porcar, M., Ferrandis, M.D., Dumanoir, V.D., Lecadet, M-M., Ferre J., ve Caballero, P., 2000. Characterization of *Bacillus thuringiensis* serotype *balearica* (Serotype H48) and ser. *navarrensis* (Serotype 50): Two Novel Isolated in Spain. Curr. Microbiol., 40, 17-22, İspanya.
- İnce, H. Ö., Bahadıroğlu, C., Toroğlu, S. ve Bozdoğan, H., 2013. Genetiği değiştirilmiş mısır bitkisinin zararlı lepidopterlere karşı direnci üzerine değerlendirmeler. Nevşehir Bilim ve Tekn. Derg., 2(1),78-89. Kahramanmaraş.
- Jain. D., Sunda, S.D., Sanadhya, S., Nath, D.J. ve Khandelwal, S.K., 2017. Molecular characterization and PCR-based screening of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* strains. 3 Biotech. 2017 May, 7(1), 4.
- Kaur, S., 2000. Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides. World J. Microbiol. Biotechnol., 16, 781-793.
- Khoramnezhad, A., Talaei-Hassanloui, R. ve Ghasemi-Kahrizeh. A., 2015. Relatedness of protein profile and toxicity of some Iranian *Bacillus thuringiensis* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae). 5<sup>th</sup> Entomopathogenes and microbial control congress, 09-11 September 2015, Ankara.
- Kim, H. S., Lee, D. W., Woo, S. D., Yu, M. Y. ve Kang, K. S., 1998. Distribution, serological identification, and PCR analysis *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea, Current Microbiology, 37, 195-200.
- Kirschbaum, J. B., 1985. Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control. Annual review of entomology, 30(1), 51-70.
- Knowles, B. H., 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. In Advances in insect physiology, 24, 275-308.
- Kronstad, J. W. ve Whiteley, H. R., 1986. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. Gene, 43, 29–40.
- Lacey, L. A. ve Goettel, M. S. 1995. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. Entomophaga, 40, 3-27
- Lambert, B., Theunis, W., Aguda, R., Audenhove, K.V., Decock, C., Jansens, S., Seurinck, J. ve Peferoen, M., 1992. Nucleotide sequence of gene *cryIII*D encoding a novel coleopteran-active crystal protein from strain BTI109P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Gene 110, 131-132, İngiltere.
- Lereclus, D., Lecadet, M. M., Ribier, J. ve Dedonder, R.(1982). Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. Molecular and General Genetics MGG, 186(3), 391-398.
- Li, J., Carroll, J. ve Euar, D.J., 1991. Crystal structure of the insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature, 353, 815-821, United Kingdom.
- Lindow, S.E. ve Massion, C.L., 1986. Effects of *Sphacelotheca holci* infection on morphology and competitiveness of johnsongrass (*Sorghum halepense*). Weed Science, 34, 883-888.
- Maniatis, T., Fritsh, E. F. ve Sambrook, J., 1989. In molecular cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor, 1-25, New York.
- Mark, E. W. ve Byron, A. W., 2003. *Bt*: Mode of action and use. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 54, 200–211, U.S.A.
- Meeusen, R. L. ve Warren, G., 1989. Insect control with genetically engineered crops. Annual Review of Entomology, 34(1), 373-381.

- Moar, W., Berry, C. ve Narva, K., 2017. The structure/function of new insecticidal proteins and regulatory challenges for commercialization. *Journal of Invertebrate Pathology* 142, 1-4.
- Noguera, P.A., Ibarra, J.E., 2010. Detection of new *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* by use of a Novel PCR primer system. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept. 2010, 6150-6155, Meksika.
- Öncüer, C., 1997. Tarımsal Zararlılarla Biyolojik Savaş: Temel Bilgiler. Adnan Menderes Üni. Yayınları, Aydın
- Öztürk, F., (2001). Malathion ve gamma radyasyonun kırma biti (*Tribolium confusum* J. du Val.)'nin gelişim evreleri üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üni., Fen Bil. Enst., Kayseri.
- Öztürk, F., 2007. Ankara'daki topraklardan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması, moleküler düzeyde tiplendirilmesi ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Gazi Üni. Fen Bil. Enst., Ankara.
- Öztürk, F., Açık, L., Ayvaz, A., Bozdoğan, B., ve Suludere, Z., 2009. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from soil and bioactivity against *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Turk. J. Biochem*, 33(4), 202-209.
- Parry, J. M., Turnbull, P. C. B. ve Gibson, J. R., 1983. A colour atlas of *Bacillus* species. Wolfe Medical Publications, Ltd., Londra.
- Patel, D., Jha, C. K., Tank, N. ve Saraf, M. 2011 . Growth enhancement of chickpea in saline soils using plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31, 53–62.
- Perlak. F.J., Deaton R.W., Armstrong. T.A., Fuchs. R.L., Sims. S.R., Greenplate. J.T. ve Fischhoff D.A., 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology*, 8, 939–943.
- Pichhardt, K., 2004. Gıda Mikrobiyolojisi Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar. Literatür Yayınları, 176-178.. Manisa.
- Prieto - Samsonov, D.L., 1997. *Bacillus thuringiensis* from biodiversity to Biotechnology, *JIMB*, 19(3), 202-219.
- Rainey, F.A., Fritze, D. ve Stackebrandt, E., 1994. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 1994 Jan 15, 115(2-3), 205-11.
- Rajamohan, F., Lee, M.K. ve Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action . *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Academic Pres, 60. New York.
- Raymond, B., Johnston, P.R., LeRoux, C.N., Lereclus, D. ve 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*. 9nd Edition, Volume 2, by edited Collier L., Balows, A. and Susman, M., Oxford University Pres, 709-730, New York.
- Rostas, K., Dobritsa, S. V., Dobritsa. A. P., Konez, C. ve Alfoldi, L., 1980. Magacinogenic plasmid from *Bacillus megaterium* 216, *Molecular & General Genetic*, 180(2), 323-329, İsveç.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., ve Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant biotechnology journal*, 9(3), 283-300.
- Schnepf, E., Crickmore N., Van rie J., Lereclus D. ve Baum J., 1998. *Bacillus*

- thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. R. 62, 775-806.
- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2007. Adi Mayıs Böceği (*Melolontha melolontha*, Coleoptera: Scarabaeidae)'nin biyolojik kontrol ajanının araştırılması. Ekoloji Derg., 16, 34-40, Trabzon.
- Sezen, K., Muratoğlu, H., Nalçacıoğlu, R., Mert, D., Demirbağ, Z. ve Katı, H., 2008. A highly pathogenic *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* from European shot-hole borer, *Xyleborus dispar* Fabricius (Coleoptera: Scolytidae). The Royal Society of New Zealand, 36, 77-84.
- Shareef, S. R., Bagsi, H. ve Ozdomar, K., 1991. Application of numerical taxonomy in classification of varieties of *Bacillus thuringiensis*. Doğa Türk Boil. Derg., 15, 70-81.
- Smith, I., Paress, P., Cabane, K. ve Dubnau, E., 1980. Genetics and physiology of the relsystem of *Bacillus subtilis*. Molecular and General Genetics MGG, 178(2), 271-279.
- Sneath, P. H. (1986). Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2, 1104-1207.
- Soberon, M., Bravo, A. ve Gill, S.S., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control, Toxicon, 49, 423-435.
- Swiecicka, I., Bideshi, D.K. ve Federici, B.A., 2008. Novel isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* that produces a quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to larvae of *Trichoplusia ni*. Applied and Environmental Microbiology, Feb. 2008, 923-930, USA.
- Suludere, Z., Kalender, Y., Çakmakçı, L., Alten, B., Ayvalı, C. ve Çetinkaya, G., 1992. Türkiye'nin çeşitli yörelerinden izole edilen bazı *Bacillus sphaericus* ve *Bacillus thuringiensis* suşlarının spor ve parasporal kristallerinin elektron mikroskopuyla incelenmesi. Doğa-Tr. J. of Agriculture and Forestry, 16, 1-14, Ankara.
- Tamez - Guerra, P., Iracheta, M. M., Pereyra - Alférez, B., Galán - Wong, L. J., Gomez-Flores, R., ve Galán-Wong, L.J., 2004. Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* strains toxic for Lepidopteran Rodríguez-Padilla C. and Coleopteran larvae, J. Invertb, Pathol., 86 (1-2), 7-18, 2004.
- Tatar, D.M., 2008. *Bacillus thuringiensis* Xd3'e ait cry3Aa geninin klonlanması, karakterizasyonu ve ekspresyonu. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üni., Fen Bil. Enst., Trabzon.
- Travers, R.S., Martin, P.A.W. ve Reichelderfer, C.F., 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp., Appl. Environ. Microbiol., 53, 1263-1266, Maryland, U.S.A.
- Taylor, L.R., Tippett, J., Gibb, G., Pells, S., Jordan, L., ve Ely, S., 1992. Identification and characterisation of a novel *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin entomocidal to Coleopteran and Lepidopteran larvae. Mol. Microbiol., 6, 1211-1217, Berkshire, İngiltere.
- Tekin S., 2012. Kahramanmaraş ili sınırları içerisindeki değişik habitatlardan izole edilen *Bacillus thuringiensis* suşlarının karakterizasyonu ve tarımsal zararlılar üzerindeki etkinliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üni., Fen Bil. Enst., Kayseri.
- Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Thiery, I. ve Frachon, E., 1997. Bacteria identification, isolation, culture and

- preservation of entomopathogenic bacteria. In Lawrence A Lacey. Manual of Techniques in Insect Pathology, Cap. III-1, Biological Techniques Series, Academic Press, 55-75, London.
- Thompson, M.A., Schnepf, H.E. ve Feitelson, J.S., 1995. Structure, function and engineering of *Bacillus thuringiensis* Toxins, in: Setlow, J.K. (ed.), Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 17, 99-117, New York.
- Tuncer, C., Ecevit, O., 1994. *Bacillus thuringiensis* ürünleri ve böceklerde dayanıklılığın önemi. Türk. Entomol. Derg., 1994, 18(2), 119-128, Samsun.
- Turanlı, F., Gümüş, E. ve Güzel, B., 2012. *Bacillus thuringiensis* ile neem ekstraktlarının ve karışımlarının etkinlikleri üzerinde incelemeler. Türk. Entomol. Derg., 36 (3), 433-439, İzmir.
- Turnbull, D. H., Bloomfield, T. S., Baldwin, H. S., Foster, F. S. ve Joyner, A. L. 1995. Ultrasound backscatter microscope analysis of early mouse embryonic brain development. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(6), 2239-2243.
- Uribe, D., Martinez, W. ve Ceron, J., 2003 . Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. Journal of Invertebrate Pathology, 82(2), 119-127.
- Uygun, N., 2002. Zararlılara karşı biyolojik mücadelede gelişmeler. Türkiye 5. Biyolojik Mücadele Kongresi, 4-7 Eylül 2002, Erzurum.
- Uzuner, S., Güner, B.G., Ayar, Ö., ve Yaman, M., 2017. Biyolojik mücadelede kullanılan entomopatojenlerin arılar üzerine etkileri. Arıcılık Arş. Derg., 9 (1), 9-19.
- Vaeck M., Reynaerts A., Höfte H., Jansens S., De Beuckeleer M., Dean C., Zabeau M., Van Montagu M. ve Leemans J., 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature, 328, 33-37.
- Van Rie, J., McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Barnett, B. D., ve Van Mellaert, H., 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 247(4938), 72-74.
- Vural, N., 1996. Toksikoloji, Çevremizde ve Endüstride Bulunan Önemli Toksik Maddeler , Ankara Üni. Basımevi, 344-401, Ankara.
- Walker, E., Pitchard, C., ve Forsythe, S., 2003. Food handlers' hygiene knowledge in small food businesses. Food Control, 14, 339-343.
- Wipat, A. ve Harwood, C. R. 1999. The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium. FEMS Microbiology Ecology, 28(1), 1-9.
- Yaman, M., ve Demirbağ, Z., 1998. Biyolojik ajanların insektisidal etkilerini belirleme yöntemleri . Ekoloji Çevre Derg., 29 (8), 11-14.
- Yanar, O., Aliyeva, R., ve Topkara, E.F., 2015. The effects of diet quality on the survival of *Vanessa atalanta* larvae infected by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. 5<sup>th</sup> Entomopathogenes and microbial control congress, 09-11 September 2015, Ankara.
- Yılmaz, M., 2003. Topraktan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi, plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Gazi Üni. Fen Bil. Enst., Ankara.
- Yılmaz, S., 2011. Çeşitli habitatlardan izole edilen *Bacillus thuringiensis* suşlarının moleküler karakterizasyonu ve bazı zararlı böceklere karşı mücadelede kullanımı. Doktora Tezi, Erciyes Üni., Fen Bil. Enst., Kayseri, 2011.
- Yılmaz, S., Demirezen, N., Azizoglu, U., Karabörklü, S., Ayvaz, A., Akbulut, M. ve



- Tekin, S., 2011. Identification of some cry1 genes and toxicity determination in *Bacillus thuringiensis* isolates obtained from mills and warehouses in Turkey. J. Biol. Pest. Control, 21(2), 189-195, Egypt.
- Yılmaz, S., Ayvaz, A., Akbulut, M., Azizoğlu, U., ve Karabörklü, S., 2012. A novel *Bacillus thuringiensis* strain and its pathogenicity against three important pest insects. J. Stored Prod. Res., 51, 33-40.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Üzeyir SÖYLEMEZ
Doğum Tarihi ve Yeri	25.05.1982 – Polatlı/ANKARA
Bölüm / Alanı	Biyoloji, Moleküler Mikrobiyoloji
Yabancı Dili	İngilizce
E-mail	<a href="mailto:biyomann@gmail.com">biyomann@gmail.com</a>

### Eğitim Bilgileri

<u>DERECE</u>	<u>EĞİTİM BİRİMİ</u>	<u>BÖLÜM</u>	<u>MEZUNİYET</u>
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat	Biyoloji ABD	2018
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Kayseri	Biyoloji	2008
Ön Lisans	Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir	Tıbbi Lab.	2002
Lise	Laborant Meslek Lisesi, Ankara	Laborant	1999

### İş Deneyimi

<u>KURUMU</u>	<u>GÖREV YERİ</u>	<u>GÖREV YILI</u>
Sağlık Bakanlığı /657	Ankara, Polatlı Devlet Hastanesi	2014 – devam
Sağlık Bakanlığı /657	Ankara, Nallıhan Devlet Hastanesi	2012 - 2014
Sağlık Bakanlığı /657	Amasya, S. Ş. Devlet Hastanesi	2009 -2012
Sağlık Bakanlığı /657-4b	Amasya, Kadın Doğum Çocuk Hast.	2006-2009