

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FINDIK KURDU (*BALANINUS NUCUM* L.)'NUN BİYOLOJİSİ,
BAKTERİYAL FLORASI VE BİYOLOJİK MÜCADELE AJANLARININ
ARAŞTIRILMASI

78055

Biyolog Kazım SEZEN

78055

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"Yüksek Lisans (Biyoloji)"

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09. 02. 1998
Tezin Savunma Tarihi : 04. 02. 1998

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ



Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU



Jüri Üyesi : Doç. Dr. Mahmut EROĞLU



Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Fazlı ARSLAN



Trabzon 1998

ÖNSÖZ

Fındık kurdu (*Balaninus nucum* L.)'nun biyolojisi, bakteriyal florası ve patojenik ajanlarının araştırıldığı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a, tezin değerlendirilmesinde yardımcı olan değerli jüri üyeleri hocalarıma, bu çalışmayı yapabilmem için her türlü laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU'na ve çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca, bu projenin yürütülmesi için maddi destek sağlayan K.T.Ü. Araştırma Fonu'na (Proje no: 96.111.004.8) teşekkür ederim.

Kazım SEZEN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 Giriş.....	1
1.2. Fındık ve Ülke ekonomimizdeki Yeri.....	3
1.3. Fındık Zararlıları.....	4
1.4. Zararlı Böceklerin Ekonomik Etkileri.....	4
1.5. Fındık Zararlıları ve Ekonomik Etkileri.....	5
1.6. Zararlı Böcekler ile Mücadele	7
1.7. Fındık Zararlıları ile Mücadele Yöntemleri.....	8
1.7.1. Fındık Kurdu ile Yapılan Kimyasal Mücadele	9
1.8. Kimyasal Mücadele Yönteminin Ekonomik ve Çevresel Etkileri.....	10
1.8.1. Bitkiler Üzerine Olan Etkileri.....	10
1.8.2. Hayvanlar ve İnsanlar Üzerine Olan Etkileri.....	11
1.8.3. Kimyasalların Neden Olduğu Biyolojik Birikim.....	11
1.9. Biyolojik Mücadele.....	12
1.9.1. Türkiye'de ve Dünyada Etkili ve Güncel Olarak Kullanılan Biyolojik Mücadele Örnekleri.....	12
1.10. Böceklerde Rastlanılan Hastalık Oluşturabilen Ajanlar	15
1.11. Zararlı Böceklerin Bakteriyal Florası.....	17
1.12. Bakteriyal İzolatların İdentifikasyonları.....	18
1.12.1. Nümerik Taksonomi.....	18
1.12.2. Genetik Homoloji.....	22
1.12.3. Diğer Metodlar.....	22

1.13.	Çalışmanın Amacı.....	23
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	24
2.1.	Ergin ve Larvaların Temini.....	24
2.2.	Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar.....	24
2.2.1.	Besiyeriler.....	24
2.2.2.	Kimyasallar.....	25
2.2.3.	Ayıraçlar.....	25
2.3.	Fındık Kurdunun Biyolojisinin Araştırılması.....	25
2.4.	Fındık Kurdunun Bakteriyal Florasının Araştırılması.	25
2.4.1.	Bakteriyal Floranın Kantitatif Analizi.....	25
2.4.2.	Bakteriyal İzolatlarının Hazırlanması.....	26
2.4.3.	Bakteriyal İzolatların Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	26
2.4.3.1.	Basit Boyama.....	26
2.4.3.2.	Gram Boyama.....	27
2.4.3.3.	Spor Boyama.....	27
2.4.3.4.	Kapsül Boyama.....	27
2.4.3.5.	Hareket Testleri.....	28
2.4.4.	Bakteriyal İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	28
2.4.4.1.	Bakteriyal İzolatların Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....	28
2.4.4.2.	Bakteriyal İzolatların Büyüebildiği pH Aralıklarının ve Optimum pH'larının Belirlenmesi.....	29
2.4.4.3.	Bakteriyal İzolatların NaCl İhtiyaçlarının Belirlenmesi.....	29
2.4.4.4.	Bakteriyal İzolatların Lizozimde Büyüme Özelliklerinin Belirlenmesi.....	29
2.4.4.5.	Bakteriyal İzolatların Atmosferik Oksijen İhtiyaçlarının Belirlenmesi.....	30
2.4.4.6.	Nişasta Hidrolizi Testi.....	30
2.4.4.7.	Jelatin Hidrolizi Testi.....	30
2.4.4.8.	Karbohidrat Fermentasyonu Testleri.....	31
2.4.4.9.	Voges-Proskover Testi.....	31
2.4.4.10.	Sitrat ve Propionatı Kullanım Testi.....	32
2.4.4.11.	Nitratı İndirgeme Testi.....	32

2.4.4.12.	Katalaz Testi.....	32
2.4.4.13.	Oksidaz Testi.....	33
2.4.4.14.	Arginin Hidrolizi.....	33
2.4.4.15.	Tween 80 Hidrolizi.....	33
2.4.5.	Bakteriyal İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi.....	34
2.4.5.1.	Bakteriyal İzolatların Toplam Protein Profillerinin Belirlenmesi.....	34
2.4.5.1.1.	Protein Konsantrasyon Tayini.....	34
2.4.5.1.2.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	34
2.4.5.2.	Bakteriyal İzolatların Plazmid İçeriklerinin Belirlenmesi.....	35
2.4.6.	Fındık Kurduna Karşı Biyolojik Materyallerin İnsektisidal Etkilerinin Test Edilmesi.....	36
2.4.6.1.	İnsektisidal Aktiviteleri Test Edilecek Numunelerin Hazırlanışı.....	36
2.4.6.1.1.	Fındık Kurdundan Elde Edilen Bakteriyal İzolatların Bioassay İçin Hazırlanması.....	36
2.4.6.1.2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> 'e Ait <i>cryIV</i> Genlerini Taşıyan Rekombinant <i>Escherichia coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması.....	37
2.4.6.1.3.	<i>Autographa californica</i> Nuclear Polihedrozis Virüs'ün (AcNPV) Hazırlanması.....	37
2.4.6.1.4.	<i>Lymantria dispar</i> Nuclear Polihedrozis Virüs'ün (LdNPV) Hazırlanması.....	38
2.4.6.1.5.	<i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Çeşitli Suşlarına Ait Toksinlerin Hazırlanması.....	38
2.4.6.2.	Biyolojik Materyallerin Fındık Kurduna Karşı İnsektisidal Etkilerinin Test Edilmesi.....	38
3.	BULGULAR.....	39
3.1.	Fındık Kurdu (<i>Balaninus nucum</i>)'nun Biyolojisi.....	39
3.2.	Fındık Kurdunun Bakteriyal Florası.....	45
3.2.1.	Ergin ve larvaların Bakteriyal Florasının Kantitatif Analizi.....	45
3.2.2.	Bakteriyal İzolatların Elde Edilmesi.....	45

3.2.3.	Bakteriyal İzolatların Morfolojik ve Boyama Özellikleri.....	45
3.2.4.	Bakteriyal İzolatların Fizyolojik Özellikleri.....	47
3.2.5.	Bakteriyal İzolatların Biyokimyasal Özellikleri.....	49
3.2.6.	Bakteriyal İzolatların Moleküler Özellikleri.....	50
3.2.6.1.	Bakteriyal İzolatların Toplam Protein Profili.....	50
3.2.6.2.	Bakteriyal İzolatların Plazmid İçerikleri.....	52
3.3.	Bakteriyal İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.....	52
3.4.	Çeşitli Biyolojik Ajanların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.....	54
4.	TARTIŞMA.....	57
5.	SONUÇLAR.....	62
6.	ÖNERİLER.....	63
7.	KAYNAKLAR.....	64
8.	EKLER.....	70
8.1.	Besiyerilerinin Hazırlanışı.....	70
8.2.	Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı.....	71
9.	ÖZGEÇMİŞ.....	73

ÖZET

Fındık kurdu (*Balaninus nucum* L., Coleoptera, Curculionidae) dünyada ve Türkiye'de fındığa önemli ölçüde zarar veren bir böcektir. Türkiye'de her yıl yaklaşık %30-40 oranında ekonomik zarar oluşturmaktadır. Fındık kurduna karşı etkin bir biyolojik mücadele ajanı geliştirmek amacıyla düzenlenen bu çalışmada bu böceğin biyolojisinin aydınlatılması, mikrobiyal florasının belirlenmesi ve ayrıca, gerek yeni izole edilen bakterilerin ve gerekse literatürde mevcut olan biyolojik materyallerin böcek üzerindeki zararlı etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Bu amaçla, 1995-1996 yıllarında Trabzon yöresinden toplanan ergin ve larvalar laboratuvarında incelenmiştir. Böceğin biyolojik özellikleri, mikrobiyal florası ve çeşitli biyolojik materyallerin bu böceğe karşı olan insektisid etkileri test edilmiştir.

Sonuç olarak, dişi ve erkek böceğin kanat uzunlukları (10 ± 0.8 mm ve 9.5 ± 0.3 mm), hortum uzunlukları (6 ± 0.4 mm ve 3.8 ± 0.2 mm), cinsiyet oranı (1/1), yumurta boyutları (0.795 ± 0.14 mm ve 0.525 ± 0.11 mm), larval dönemlere ait baş kapsül genişlikleri (512.5 ± 15 μ m, 800 ± 8 μ m, 1005 ± 10 μ m ve 1295 ± 6 μ m), ergin ve larva başına düşen toplam bakteri sayısı (1.41×10^{11} bakteri/ergin ve 1.8×10^9 bakteri/larva) tespit edildi. Larvalardan izole edilen 5 bakteriyal izolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterleri belirlendi. Bu özelliklerine göre bakterilerin *Bacillus sp.*, *Escherichia sp.*, *Micrococcus sp.*, *Serratia sp.* ve *Pseudomonas sp.* cinslerine ait oldukları tespit edildi. Ayrıca bu izolatlardan olan *Serratia sp.*'nin *B. nucum* larvaları üzerinde 3 günlük sürede %100'lük bir ölüm meydana getirdiği belirlendi. Diğer yandan insektisidal etkileri test edilen bazı materyallerin fındık kurdunu öldürücü etkilere sahip oldukları bulundu. 3 günlük sürede *B. nucum* üzerinde tespit edilen insektisidal etkiler, LdNPV %90, BTS-1 %90, PHE4-ADR %66, PHE4-AR %60, PHE4-AD %60, PHE4-A %56, AcNPV %60 ve HD-1 %70'dir.

**Anahtar Kelimeler: Fındık Kurdu, *Balaninus nucum*,
Bakteriyal Flora, Biyolojik Kontrol**

SUMMARY

Investigation of Biology, Bacterial Flora and Biological Control Agents of Hazelnut Beetle (*Balaninus nucum* L.)

Hazelnut beetle (*Balaninus nucum* L., Coleoptera, Curculionidae) is the most effective damager of hazelnut fruits in all over the world and in Turkey. It causes approximately 30-40% of economical damage per year in Turkey. Investigation of the biology and microbial flora of larvae and adults of *B. nucum*. were purposed in this study. Also, insecticidal activities of bacteria isolated from *B. nucum* and various effective biological agents recorded in the literature were tested against *B. nucum*.

For this purpose, we studied the larvae and adults collected from the vicinity of Trabzon in laboratory in 1995-1996. The biological features and bacterial flora of this insect were investigated. Also, insecticide effects of various biological agents and isolated bacteria against hazelnut beetle were tested.

As conclusion, we determined the lengths of forewing of adult female and male (10 ± 0.8 mm and 9.5 ± 0.3 mm), the lengths of rostrum (6 ± 0.4 mm and 3.8 ± 0.2 mm), sexual index (1/1), dimensions of egg (0.795 ± 0.14 x 0.525 ± 0.11 mm), dimension of head capsule of each instars (512.5 ± 15 μ m, 800 ± 8 μ m, 1005 ± 10 μ m and 1295 ± 6 μ m) and the numbers of total bacteria in larvae (1.8×10^9 bacteria/larva) and adults (1.41×10^{11} bacteria/adult). The morphological, physiological and biochemical characteristics of five isolated bacteria were also identified. According to determined features, the identified isolates placed into the genera of *Bacillus* sp., *Escherichia* sp., *Micrococcus* sp., *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. Among five bacterial isolates, it is determined that *Serratia* sp. causes 100% mortality on *B. nucum* larvae. It is also found that tested biological agents have mortality effects on *B. nucum* larvae. The insecticidal effects determined on *B. nucum* within three days are 90% with LdNPV and BTS-1, 66% with PHE4-ADR, 60% with PHE4-AR, PHE4-AD, 56% with PHE4-A, 60% with AcNPV and 70% with HD-1.

Key words: Hazelnut Beetle, *Balaninus nucum*, Bacterial Flora, Biological Control

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

- Şekil 1. Fındık kurdu (*Balaninus nucum*)'nun; A) Erkek ve dişi ergin böceğin görünümü, B) Yumurta koyma borusu içindeki yumurtaları, C) Fındıktan çıkartılmış bir yumurtasının görünümü, D) Fındık içindeki bir yumurtasının görünümü..... 41
- Şekil 2. Fındık kurdu (*Balaninus nucum*)'nun; A) Dört instarının genel görünümü (Sırasıyla 1, 2, 3 ve 4. instar), B) Fındık içinde beslenmekte olan 3. instar bir larvası, C) Dört instarlık gelişimini tamamlayan olgun larvanın toprağa girmek için fındık meyvasında açtığı delik..... 43
- Şekil 3. Fındık kurdu (*Balaninus nucum*)'nun; A) Larvanın toprakta kışı geçirdiği yuva, B) Sarıkaramuk adı verilen zarar şekli, C) Karakaramuk adı verilen zarar şekli..... 44
- Şekil 4. 1 numaralı izolatin oluşturduğu sporların görünümü..... 47
- Şekil 5. 1 numaralı izolatin oluşturduğu kapsülün görünümü..... 47
- Şekil 6. *B. nucum*'dan elde edilen izolatların toplam proteinlerinin %12'lik SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmesi..... 51
- Şekil 7. İzolatların plazmid içeriklerinin %0.7'lik agaroz jeldeki görüntüleri..... 52
- Şekil 8. Denenen bakteriyal izolatların *B. nucum* larvaları üzerinde oluşturduğu ölüm oranları..... 53
- Şekil 9. Normal larva ve 4 numaralı bakteriyal izolat ile enfekte olmuş larvaların görünüşleri..... 54
- Şekil 10. Denenen ajanların *B. nucum* larvaları üzerinde oluşturduğu ölüm oranları..... 56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1. Tespit edilmiş fındık zararlıları ve ait oldukları gruplar.....	4
Çizelge 2. Fındık zararlılarına karşı kullanılan çeşitli kimyasallara ait bazı örnekler.....	9
Çizelge 3. Fındık kurduna karşı kullanılan kimyasallar.....	10
Çizelge 4. Türkiye'de <i>B. thuringiensis</i> 'in uygulandığı zararlılar.....	13
Çizelge 5. Çeşitli baculovirüslerin etkili olduğu konaklar ve kullanım bölgeleri.....	14
Çizelge 6. <i>B. thuringiensis</i> 'in bazı genlerinin aktarılması ile elde edilmiş transgenik bitkiler.....	15
Çizelge 7. <i>Balaninus nucum</i> 'dan elde edilen bakteriyal izolatların morfolojik ve büyüme özellikleri.....	46
Çizelge 8. <i>Balaninus nucum</i> 'dan elde edilen bakteriyal izolatların fizyolojik özellikleri.....	48
Çizelge 9. <i>Balaninus nucum</i> 'dan elde edilen bakteriyal izolatların bazı biyokimyasal özellikleri.....	50
Çizelge 10. Elde edilen izolatların fındık kurdu larvaları üzerinde oluşturdukları ölüm oranları.....	53
Çizelge 11. <i>B. nucum</i> larvaları üzerinde denenen numunelerin oluşturdukları ölüm oranları.....	55

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AcNPV	: <i>Autographa californica</i> Nuclear Polyhedrosis Virus
<i>B. nukum</i>	: <i>Balaninus nukum</i>
BSA	: Bovine Serum Albumin
<i>B. thuringiensis</i>	: <i>Bacillus thuringiensis</i>
BTS-1	: <i>Bacillus thuringiensis</i> Taenebrionis Suşu
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
<i>E. coli</i> JM101	: <i>Escherichia coli</i> JM101
EDTA	: Etilen Diamintetraasetik Asit
HD-1	: <i>Bacillus thuringiensis</i> Harry Dumagae Suşu
LdNPV	: <i>Lymantria dispar</i> Nuclear Polyhedrosis Virus
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Fındık (*Corylus sp. L.*) Betulaceae familyası içinde yer alan çalı formunda çok yıllık bir bitkidir. Meyveleri nuks tipindedir. Bu cins içinde 25'i bulan yabancı türler Japonya'dan Kuzey Amerika'ya kadar uzanan ılıman iklim kuşağını ve Kuzey yarım küreyi kaplamaktadır (1). Ancak kültür formlarının kaynağını oluşturan en önemli türleri, Kuzey Anadolu dağları ve Kuzey geçit bölgelerinde yoğun olarak bulunmaktadır (2).

Fındık, ülkemiz için en önemli ihraç ürünlerinden biridir. Türkiye, dünya üzerinde en önemli fındık üreticisi ve ihracatçısı ülke konumundadır. Dünya fındık üretiminin %70'ini, fındık ihracatının ise %70-80'ini ülkemiz gerçekleştirmektedir (3).

Fındık kurdu (*Balaninus nucum L.*) Türkiye'nin fındık yetiştirilen yörelerinde ve özellikle de Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yaygın şekilde bulunur. Kendine yaşam yeri olarak orta ve yüksek kesimlerde, orman kıyısı ya da dik yamaçlı ve kuzey yönlü bahçeleri seçen fındık kurdu esas zararını ekonomik bakımdan en önemli olan fındık ürünü üzerinde yapmaktadır (4).

Bilindiği gibi, günümüzde yapılan tarımsal çalışmalarda başlıca amaç, dekara düşen ürün miktarını artırmaktır. İnsan nüfusunun her yıl hızla arttığını göz önüne alırsak, üretimin en azından bu artışı karşılaması gerekmektedir. Fındık üreten ülkeler arasında üretim ve ihracat bakımından ön sıralarda yer almamıza rağmen, birim alandan alınan ürün bakımından diğer ülkelerden geride bulunmaktayız. Bu durumun en önemli sebeplerinden biri fındık bitkisinin çok sayıda zararlısının olması ve bu zararlılarla gerektiği gibi mücadele edilemeyiştir. Bu zararlıların en önemlisi de fındık kurdu (*Balaninus nucum*)'dur. Bu konuyla ilgili olarak literatürde sadece fındık kurdunun zararı ve biyolojisi ile ilgili çalışmalara rastlanılmıştır. Ülkemizde ilk olarak fındık kurdunun biyolojisi Ural (4) tarafından araştırılmıştır. Ancak, yapılan bu çalışmada böceğin çeşitli biyolojik dönemlerine ait bazı bilgiler mevcut değildir. Örneğin; yumurta boyutları, yumurtanın fotoğrafı, ergin böcekleri

ayırmadaki en önemli faktör olan hortum uzunlukları, kanat uzunlukları, larval dönemleri belirlemede kullanılan baş kapsül genişlikleri, v.s. Dünyada fındık kurdu ile ilgili çalışmalar daha eskilere dayanmaktadır. Fransa'da 1949 yılında Martin (5), *B. nucum* üzerine çeşitli araştırmalar yapmıştır. Bu çalışmada sıcaklık ve nem gibi fiziksel faktörlerin *B. nucum* larvaları üzerindeki etkilerine bakılmış ve DDT ile yapılan ilaçlama zamanları hakkında çeşitli tespitler gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda özellikle 1987 ve sonrasında Barrios ve arkadaşları (6) *B. nucum*'a karşı çeşitli kimyasalların etkilerini araştırmışlardır. Özellikle acephate (%75), promecarb (%50) ve mecarbam (%50)'ın büyük oranda etkili olduğunu bulmuşlardır. Maesu ve arkadaşları (7) benzer bir çalışmayı 1988'de yapmışlardır. Rusya'da yine aynı yıl Tabamaishvili (8) fındık kurdunun kontrolü üzerine bir araştırma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada, o bölgede %70 zarar oluşturan *B. nucum* üzerinde denenen DPVP (dichlorvos)'nin %50, actellic (pirimiphos-methyl)'in %50 ve phosalone'nin ise %35 ölüm meydana getirdiği tespit edilmiştir. Polonya'da yapılan bir çalışmada fındığın fındık kurduna karşı dirençliliği ile ilgili çeşitli tespitler yapılmıştır (9). Araştırmada 10-19 yaş arasındaki fındık ağaçlarında yapılan incelemelerde fındık kurduna karşı dirençli 6 grup tespit edilmiştir.

Şu ana kadar yapılan çalışmalardan da anlaşıldığı gibi çalışmaların çoğunlukla kimyasal mücadele ile ilgili olduğu *B. nucum*'un bakteriyel florası ve ona karşı kullanılabilecek bir biyolojik ajanın araştırılmasına yönelik hiçbir çalışmanın bulunmadığı belirlenmiştir.

Eski yıllara oranla günümüzde yoğunluğu önemli ölçüde azalmış olan fındık kurdu, halen fındığın ana zararlısıdır. Bilindiği gibi, tüm bitki zararlılarına karşı olduğu gibi fındık kurduna karşı da mücadele, kimyasallarla yapılmaktadır. Kullanılan kimyasalların sadece zararlı böceklere değil, aynı zamanda zararsız hatta faydalı böcekleri ve diğer canlıları da etkilediği herkes tarafından çok iyi bilinmektedir. İnsektisidlerin etkilediği canlı gruplarını kısaca bitkiler, hayvanlar ve insanlar olarak gruplandırmak mümkündür. Kimyasalların tüm kötü etkileri göz önüne alındığında biyolojik mücadele bir kurtuluş yolu olarak görülmektedir.

Zararlı bir tür ile biyolojik mücadele yapılabilmenin önemli basamaklarından biri zararlı böceğin biyolojisinin çok iyi bilinmesidir. Uygulanacak olan biyolojik materyalin hangi dönemlerde ve nasıl

verilmesi gerektiğinin belirlenmesi için bu oldukça önemlidir. İkinci basamak ise biyolojik mücadelede kullanılacak ajanın tespit edilmesidir. Böyle bir ajanı tespit edebilmek için mevcut biyolojik ajanların insektisidal etkilerinin test edilmesi ve zararlı böcekte muhtemel hastalık oluşturabilen yeni bir patojenin araştırılması gerekmektedir.

Bu bilgiler ışığında çalışmadaki amacımız, ülkemiz ekonomisinde büyük bir yere sahip olan fındık ürünü üzerinde çok büyük zarar oluşturan fındık kurdu (*Balaninus nucum*)'nun zararı ve biyolojisi ile ilgili bilgileri tam olarak elde edebilmek, bakteriyal florasını belirlemek, floranın kantitatif analizini yapmak ve zararlıya karşı biyolojik mücadelede kullanılacak ajanları araştırmaktır. *B. nucum*'un bakteriyal florasının belirlenmesi ve bir biyolojik ajanın tespit edilmesiyle bu konudaki literatür bilgilerine yeni katkılar sağlanacaktır.

1.2. Fındık ve Ülke Ekonomimizdeki Yeri

Fındık ülkemizin çeşitli yörelerinde ve özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yaygın olarak yetiştirilen bir üründür. 1990 yılı rakamlarına göre ülkemizde halen toplam 282.288.105 adet fındık ocağı bulunmaktadır (10). Buna karşılık yıllık üretim 375.000 ton düzeyindedir. Yaklaşık 450.000 aile bu tarımla uğraşmaktadır. Dünya fındık üretiminde ve ihracatında önemli bir yeri bulunan Türkiye'nin bir diğer önemli avantajı da fındık yetiştiren ülkeler içinde en erken hasat yapan ülke olmasıdır. 1978-1987 yılları arasında dünya fındık üretiminin yaklaşık %69'unu Türkiye karşılamıştır. Fındık tarımı cumhuriyetimizin 50. yılına kadar, Türkiye'nin döviz gelirlerinin ortalama 1/6'nı sağlamış ve bugün de, 500 milyon dolar sınırını zorlamakta ve tüm ihraç ürünlerimiz arasında 6. sırada yer almaktadır. Karadeniz bölgesinde yaklaşık 1.5 milyon insan bu tarımla geçimini sağlamaktadır. Fındığın bölge'ye getirdiği yıllık gelirin parasal karşılığı, 1986 yılı ürün ve fiyatlarıyla 300 milyon doları aşmaktadır.

1.3. Fındık Zararlıları

Bugüne kadar tespit edilmiş olan 15 adet fındık zararlısı mevcuttur (11). Bu zararlılar Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Tespit edilmiş fındık zararlıları ve ait oldukları gruplar

Zararlılar	Gruplar
Fındık kozalak akarı (<i>Eriophyes avellanae</i> NL.)	Acarina
Fındık kurdu (<i>Balaninus nucum</i> L.)	Coleoptera
Mayıs böceği (<i>Melolontha melolontha</i> L.)	Coleoptera
Dalkıran (<i>Xyleborus dispar</i> Fabr.)	Coleoptera
Kızılağaç böceği (<i>Agelastica alni</i> L.)	Coleoptera
Uçkurutan (<i>Obera lincaris</i> L.)	Coleoptera
Fındık yaprak deleni (<i>Anoplus roboris</i> Suf.)	Coleoptera
Fındık gal sineği (<i>Mikomyia coryli</i> Kieffer.)	Diptera
Fındık kokarcası (<i>Palamena prasina</i> L.)	Hemiptera
Kahverengi koşniller (<i>Parthenobcanium corni</i> Bouche) (<i>Parthenobcanium rufulum</i> Ckell.)	Homoptera
Fındık virgül kab. biti (<i>Lepidosaphes ulmi</i> L.)	Homoptera
Fındık yaprak biti (<i>Mizocallis coryli</i> G.)	Homoptera
Fındık filiz güvesi (<i>Gypsonoma dealbana</i> Fröhl.)	Lepidoptera
Kır tırtılı (<i>Lymantria dispar</i> L.)	Lepidoptera
Amerikan beyaz kele. (<i>Hyphantria cunea</i> Drury.)	Lepidoptera

1.4. Zararlı Böceklerin Ekonomik Etkileri

Küçük yaratıklar olmalarına rağmen, üreme enerjileri fevkalade büyük olan böcekler, insan ekonomi ve yaşantısına girmiş hayvanlar aleminin sayıca en zengin ve önemli varlıklarından biridir. Böceklerin ekonomik etkileri bitkiler, depolanmış mamüller, insanlar ve hayvanlar üzerinde olmak üzere farklı şekillerde olur.

Böceklerin bitkiler üzerindeki etkileri çeşitli yollarla meydana gelmektedir. Böcekler besinlerini çeşitli şekillerde alırlar. Bunun en basit, fakat önemli olanı, bitkinin dış ve iç kısımlarını yani meyva,

sürgün, yaprak, dal, kök ve odun kısımlarını yemek şeklinde olanıdır. Bitkiler incelenecek olursa böcek zararı sonucu oluşan birçok belirtiyeye rastlamak mümkündür. Örneğin; renk değişikliği, bazı kısımların yenmesi, dokularda galeri, gal ve şişkinliklerin olması, reçine sızıntıları v.s. Bitkilerde meydana gelen bu zararlar, onların meyva hasılatının azalmasına, gelişmemesine, deforme olmasına ve nihayet ölmelerine sebep olur.

Yapılan araştırmalar tarım ve hayvancılıkta en zararlı hayvanlar olan böceklerin, bitkilerde yıllık ürünün %10'u gibi büyük bir oranda zarar oluşturduklarını ortaya koymaktadır. Bu oran tropik bölgelerde %20'ye yükselmektedir. Örnek olarak, 1960'lı yıllarda Asya ve Afrika'da Sudan çekirgesi olarak bilinen *Schistocerca gregaria* ile *Locusta migratoria* gösterilebilir (12). Bu çekirgeler, bir km²'ye 120.000.000 (200 ton) adet düşecek şekilde, göç yolları üzerinde 100'lerce km²'lik alanda bitki örtüsünün yenebilecek tüm kısımlarını yemişlerdir. 1916 yılında ülkemizde çekirgelerin, bilhassa, Fas çekirgesi (*Dociostaurus maroccanus*)'nin Batı Anadolu'da yaptığı tahribat neticesinde 200.000 ton hububat ve 15.000 ton bakliyat yok olmuştur (13). Zarar o zamanki şartlarda 100 milyon mark olarak hesaplanmıştır.

Böceklerin yalnız ziraat ürünlerinde her yıl yaptıkları zarar İngiltere'de 30, Kanada'da 25 ve Avustralya'da 20 milyon Sterlin olarak hesaplanmıştır (13).

Böceklerin bitkilerde yaptıkları çok önemli bir zarar da, bitkilerin hastalanmalarına sebep olmalarıdır. Bugün hemen hemen 200'den fazla hastalığın böcekler tarafından nakledildiği bilinmektedir (13).

1.5. Fındık Zararlıları ve Ekonomik Etkileri

Fındık Kurdu: Beslenme ve yumurta bırakma yolu ile meyvelerde zararlı olan fındık kurdu fındığın meyve kabuğunu hortumunun ucunda bulunan dişleriyle kemirerek deler ve böcek kabuk içinde yumuşak etli kısımla beslenir. Bir böcek beslenme yolu ile yaklaşık 80 meyveye, bir dişi böcekte yumurta bırakma yolu ile yaklaşık 40 meyveye zarar verir. Buradan bir çift erginin ortalama 200 meyveye zarar verdiği anlaşılır. Basit bir hespla 200 dane fındığın yaklaşık 0.5 kg olduğu kabul edildiğinde, zararın boyutları daha iyi anlaşılabilir. 25 ocaktan meydana gelen yaklaşık 0.5 dekarlık bir alandan 10 çift böcek bulunabileceği

dikkate alınır, bu sayıdaki böceğin 2000 adet fındık danesine zarar verdiği, yani bununda yaklaşık 5 kg fındık ettiği, bu durumunda büyük bir ekonomik kayıba yol açtığı görülmektedir (11, 13, 14).

Fındık Kozalak Akarı: Sağlam sürgün ve meyva gözlerine girerek onların şişkinleşip kozalak şeklini almalarına sebep olur. En çok sürgün ucundan kozalak oluşur. Az oranda erkek organlar da zarar görürler. Genel olarak üç sürgünden biri meyva sürgünüdür. Sürgün ya da meyva verecek bu gözlerin zarar görmesiyle bitkide gelişme engellenir ve verim azalır. Doğrudan verimi etkilemesi nedeniyle, ekonomik olarak fındığın en önemli zararlılarından biridir (11, 13, 14).

Fındık Filiz Güvesi: Larvaların yaprak, püs ve gözlerdeki zararından başka, özellikle yeni sürgünlerin özüne girerek yaptığı kurumalar bazı yıllarda çok önemli boyutlara ulaşmıştır (11, 13, 14).

Kahverengi Koşniller: Yaprak ve sürgünlerde öz suyu emerek zarar verirler. Zarar sonucu bitki zayıflar, verim düşer ve bitkilerde kurumalar görülür (11, 13, 14).

Mayıs Böceği: Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yaygın olarak bulunan böceğin erginleri yaprak ve çiçeklerde, larvaları ise saçak ve kalın köklerde zararlı olurlar. Bir çok bahçede önemli derecede kurumlara neden olan böceğin zararı bazı yerlerde %50'lere ulaşır (11, 13, 14).

Virgül Kabuklu Biti: Ergin ve larvalar bitkinin öz suyunu emerek zayıflamasına, verimin azalmasına ve yoğun bulaşmalarda fındık dal ve ocaklarının kurumalarına neden olurlar (11, 13, 14).

Dalkıran: Doğu Karadeniz Bölgesi fındık bahçelerinde yaygın olarak bulunur. Ergin dişiler, fındık dallarında galeriler açarak dallarda zayıflamaya, kırılmaya ve kurumlara neden olurlar. Özellikle bakımsız bahçelerde çok önemli zarar oluştururlar (11, 13, 14).

Kır Tıltır: Fındık bahçelerinde az zarar oluşturur. Daha çok meyva ve orman ağaçlarında zararlı olurlar. Ancak salgınları sırasında fındık yapraklarını yiyerek önemli zararlar oluşturduğu bilinir (11, 13, 14).

Fındık Kokarcası: Erginler ve nimfler meyvelerde emme yaparlar. Böylece sarı karamuk, buruşuk ve şekilsiz iç, lekeli iç şeklinde zarar oluştururlar (11, 13, 14).

Kızılağaç Böceği: Larvalar ve erginler yaprakta zarar oluştururlar. Ekonomik açıdan zararları fazla önemli değildir (11, 13, 14).

Gal Sineği: Çok yoğun olarak bulunduğu zaman zararı önemli düzeylere ulaşır. Larvalar, yaprakta damarlar boyunca, meyvede ise zulf üzerinde galler oluşturur (11, 13, 14).

Uçkurutan: Larvalar fındık sürgünlerinin içinde galeriler açarak kurumalara neden olurlar. Fındık dışında ceviz, gürgen, kızılağaç ve karaağaçta da zararlı olurlar (11, 13, 14).

Yaprak Delen: Özellikle tomurcuklarla beslenirler. Yumurta koyduğu damarlar kurur ve kırılır. Larvalar da galeri açarak büyük zarara sebep olurlar (11, 13, 14).

Yaprak Biti: Tomurcuk ve yapraklarda emme yaparlar. Gelişen yaprakların emilen kısımları yırtılarak delikler oluşur (11, 13, 14).

Amerikan Beyaz Kelebeği: Larvalar yaprağı hafifçe kıvrırarak ince ağ ipleriyle kapatırlar. Sonra diğer yaprakları ağlarla birleştirerek topluca beslenirler. Özellikle yaprağın alt ve üst epidermisini yerler ve yaprağın sadece damarları kalır. Ağaçlarda tüm yaprakları ve meyveleri yiyerek çok büyük ekonomik zarar oluştururlar (11, 13, 14).

1.6. Zararlı Böcekler ile Mücadele

Zararlılar ile mücadele, çoğu kitle üremesi yapan veya yapma yeteneğinde olan böcek popülasyonlarının sayısının artmasını engellemek için gerçekleştirilen mücadele olarak tanımlanabilir. Zararlılar ile mücadele çeşitli şekillerde olmaktadır.

Doğal Mücadele (Çevre Direnci): İnsan oğlunun herhangi bir yardımı olmadan doğal kuvvetlerle böcek popülasyonlarının kontrol altında tutulması olayıdır. Çevre direncinin bir sonucu olarak böceklerin önemli bir kısmı ya çoğalmadan ya da çoğaldıktan sonra ölür (15, 16).

Yasal Mücadele: Yasal yollardan yararlanılarak zararlıların yayılmalarını önlemektir. Örneğin, karantina, ambargo, muayene veya sertifika uygulamak gibi (15, 16).

Mekanik Mücadele: Böcekleri toplamak, pusuya düşürmek, yem tuzakları kurmak, feromonları kullanmak, tuzak odunları hazırlamak veya gıda değiştirmeyi yapmak suretiyle gerçekleştirilir (15, 16).

Fiziksel Mücadele: Böceklerin yakılması, sıcaktan ve nemden yararlanılarak böceklerin öldürülmesi, elektrik veya radyoaktivite kullanarak böceklerin kısırlaştırılması işlemlerini içerir (15, 16).

Kültürel Mücadele: Toprak bakımı, işlenmesi ve gübrenmesi, yabancı ot ve artıkların temizlenmesi ve bitki nöbetleşmesi gibi toprakla ilgili yapılması gereken işleri kapsar (15, 16).

Kimyasal Mücadele: Bilindiği gibi, 100'lerce sentetik organik toz (kuru) veya sulu halde pestisidlerin kullanılması suretiyle yapılan mücadeledir (15, 16).

Biyolojik Mücadele: Böcek popülasyonlarını dolayısıyla böcek zararını azaltmak için canlı organizmalardan yararlanılarak yapılan mücadele biyolojik mücadele olarak bilinmektedir (15, 16).

1.7. Fındık Zararlıları ile Mücadele Yöntemleri

Mücadelenin esas amacı meyvelerin zararlılardan korunmasıdır. Çoğu zararlılara karşı olduğu gibi fındık zararlılarına karşıda esas olarak kimyasal mücadele yapılmaktadır (17). Fındık zararlılarına karşı kullanılan bazı kimyasallar Çizelge 2'de gösterilmektedir.

Çizelge 2. Fındık zararlılarına karşı kullanılan çeşitli kimyasallara ait bazı örnekler

Etkili Madde Adı ve Oranı	Formulasyonu	Dozu Dekara
Diazinon 200 g/l	EC	300 ml
Azinphos methyl 200 g/l	EC	300 ml
Malathion 200 g/l	EC	700 ml
Triflumuron % 25	WP	60 g
Omethoate 500 g/l	SL	150 ml
Carbaryl % 85	WP	150 g
Endosülfan 360 g/l	EC	300 ml
Methiocarb % 2	Toz	3 kg
Promecarb % 50	WP	100-150 gr
Chlorpyrifos % 25	WP	15 g
Dioxacarb % 50	WP	100 g
Carbosulfan 250 g/l	EC	125 ml

EC: Suda homojen dağılan sıvı formülasyonlar,

WP: Islanabilir toz formülasyonlar,

SL: Suda çözünen konsantre formülasyonlar

1.7.1. Fındık Kurdu ile Yapılan Kimyasal Mücadele

Özellikle fındık kurdu için yapılan kimyasal mücadele öncesi bir önsayım yapılması gerekir (18). Bunun için 3x3.5 m'lik beyaz bir örtü en uygunudur. Sayımda 10-30 ocakta darbe yapılmalıdır. Sakin yağışsız günlerde sabah erken ve akşam üzeri yapılması daha uygun olan sayımda 10 ocaktan 2'den fazla ergin düşerse ilaçlama yapılması gerekir. İlaçlama bahçelerdeki hakim çeşidin meyveleri 3-4 mm iriliğe geldiği zaman (yaklaşık Nisan sonunda) yapılmalıdır. İlaçlamadan sonra 7-10 gün içinde bir kontrol sayımı daha yapılmalıdır. Eğer aynı sayıda böcek düşerse tekrar ilaçlama yapılmalıdır.

Çizelge 3. Fındık kurduna karşı kullanılan kimyasallar

Etkili Madde Adı ve Oranı	Formülasyonu	Dozu Dekara
Chlorpyrifos ethyl % 2	Toz	70 g
Carbaryl % 85	WP	150 g
Carbaryl % 5	Toz	3 kg
Methiocarb % 2	Toz	3 kg
Methiocarb % 50	WP	150 g
Dioxacarbe % 50	WP	100 g
Dioxacarbe % 3	Toz	3 kg
Promecarb % 50	WP	100-150 gr
Promecarb % 5	Toz	3 kg
Furathiocarb % 5	EC	100 ml
Carbosulfan 250 g/l	EC	125 ml
Carbosulfan 480 g/l	EC	60 ml
Carbosulfan % 2	Toz	3 kg

EC: Suda homojen dağılan sıvı formülasyonlar,
WP: Islanabilir toz formülasyonlar

1.8. Kimyasal Mücadele Yönteminin Ekonomik ve Çevresel Etkileri

1.8.1. Bitkiler Üzerine Olan Etkileri

İnsektisidler genellikle bitkilerin yaprak ve yeni sürgünlerinde yanma denilen bir takım lekeler ile renk değişimlerinin meydana gelmesine ve kurumalarına yol açmaktadırlar. Bazen kullanılan insektisidlerden biri bitkiler üzerinde zararlı olmazken iki preparat aynı anda uygulandığında çok tehlikeli olabilmektedir. Özellikle dinitro bileşikleri ile yapılan ilaçlamalarda bitkiler çok etkilenmektedirler (19).

1.8.2. Hayvanlar ve İnsanlar Üzerine Olan Etkileri

Kullanılan insektisidler belirli dozlarda hayvanlar ve insanlar üzerinde zararlı etkiler yaparlar. Tehlikeye en çok maruz kalan kişiler ilacı kullanan veya bu işle meşgul olan kişilerdir. İlaç uygulanan alanda kısa bir süre sonra hayvan otlatılırsa, zehir hayvanın bünyesine taşınır. Ayrıca arazideki ilaç hemen peşi sıra yağan bir yağmurla derelere ve oradanda denizlere taşınır. Burada balıkların yapısına giren kimyasallar beslenme yolu ile insanlara kadar ulaşır. Önemli diğer bir konuda ilaçlı meyve ve sebzelerin çok iyi temizlenmeden yenmemesidir.

İnsanlar ve hayvanlar üzerinde en etkili bileşikler, başta arsenik olmak üzere fosfor asidi ester preparatları, DDT ve toxaphen gibi klorlu hidrokarbonlardır. Bu bileşikler özellikle insanda, beyin, karaciğer, böbrek ve yağ dokusunda birikerek önemli hasarlara yol açar (16).

1.8.3. Kimyasalların Neden Olduğu Biyolojik Birikim

Bazı kirleticilerin hava, su ve toprakta düşük miktarlarda bulunsalar bile, besin zincirlerinin birbirini izleyen halkalarındaki tüketicilerde giderek artan yoğunluklarda bulunması olayına "biyolojik birikim" denir.

Biyolojik olarak biriktirilen maddelerin başlıcaları, DDT ve poliklorürlü bifeniller gibi sentetik organik kimyasallar, bazı radyoaktif maddeler ve bazı ağır metallerdir. DDT ve türevleri olan klorlu hidrokarbonlar cinsinden tarım ilaçlarının önemi ekosistemlerde çok uzun süre kalma ve yayılabilme özelliklerinden gelir.

Biyolojik birikimin etkilerinin değişik organizmalarda ve durumlarda farklı biçimlerde ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Bu tür maddelerin insan dokularında da biriktiği gözlenmekte, bu da insan sağlığı açısından kuşku yaratmaktadır. Örneğin, yapılan çalışmalarla yüksek poliklorürlü bifenil oranları ile karaciğer kanseri arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir (20). Aynı şekilde fındık kurdu için arazilere uygulanan ilaçların hepsinin içeriğinde DDT ve türevleri mevcuttur. Bu maddelerin fındık bahçelerinde çok yaygın şekilde kullanıldığı göz önüne alınırsa nasıl bir tehlikeyle karşı karşıya kalındığı daha iyi anlaşılmış olur.

1.9. Biyolojik Mücadele

Biyolojik mücadelede ilk kayıtlar, M. S. 900-1200 yılları arasında rapor edilmiştir (21). Geçmiş çok eskilere dayanan mücadele de ilk olarak amfibiler, kuşlar ve memeliler kullanılmıştır. Son yıllarda ise bu canlıların yerini özellikle nematodlar, bakteriler ve virüsler almıştır.

Zararlı böceklerle mücadele amacıyla kullanılan organizmalar büyük çeşitlilik gösterir. Bunlar; nematodlar, örümcekler, akarlar, hidralar, planaria'lar, balıklar, amfibiler, kuşlar, memeliler, funguslar, protozoalar, bakteriler ve virüslerdir (15, 16, 21, 22, 23).

Kullanılan organizmalara örnek vermek gerekirse, nematodlardan günümüzde halen daha *Neoplectana corpocapsae* nematodu ile *Achromobacter nematophilus* bakterisinden hazırlanan preparat Biotrol adı altında ticari olarak üretilip *Chilo sp.*, *Sesamia sp.* (Lepidoptera) ve patates böceğine (*Leptinotarsa decemlineata*) karşı kullanılmaktadır (16). Akarlar dan özellikle *Phytoseiulus persimilis*, Avrupa ülkeleri, ABD ve Rusya'da seralarda kırmızı örümceklere karşı etkili sonuç vermektedir (22). Balıklardan *Gambusia affinis* sivrisinek larvalarına karşı, *Bufo marinus*'da şeker kamışı zararlısı *Strategus sp'*ye karşı kullanılmaktadır. Kuşlardan özellikle sığırcık, leylek, ağaçkakan ve iskete'den yararlanılmaktadır. Memelilerden kirpi, yarası, porsuk ve köstebek gibi hayvanlardan faydalanılmaktadır. Bakterilerden özellikle *Bacillus thuringiensis* ve *B. papilliae* kullanılmaktadır. *B. thuringiensis* daha çok zararlı lepidopter larvalarına karşı kullanılmakla birlikte, son yıllarda çeşitli suşların farklı böcek grupları üzerinde etkili oldukları bulunmuştur (23). Mantarlardan özellikle Boverin ticari adıyla üretilen *Beauveria bassiana*, lepidopter ve coleopterlere karşı etkilidir. Virüslerden ticari olarak hazırlanan preparatlar özellikle lepidopter ve hymenopterlere karşı uygulanmaktadır. Virüslerin son yıllarda coleopterlere de etkili oldukları bulunmuştur (15, 16).

1.9.1. Türkiye'de ve Dünyada Etkili ve Güncel Olarak Kullanılan Biyolojik Mücadele Örnekleri

Türkiye'de şu anda biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan en önemli ve güncel örnek *Bacillus thuringiensis*'dir. Özellikle bu bakteriden hazırlanan preparatlar bağ, meyve ve narenciye zararlılarına

karşı kullanılmaktadır ve bir çok firma *B. thuringiensis* içeren çok çeşitli ilaçlar geliştirmiştir. *B. thuringiensis*'in kullanıldığı zararlılar Çizelge 4'de özetlenmektedir (17).

Çizelge 4. Türkiye'de *B. thuringiensis*'in uygulandığı zararlılar

Zararlılar		Gruplar
Lahana yaprak güvesi	(<i>Plutella xylostella</i> L.)	Lepidoptera
Altın kelebek	(<i>Euproctis chrysorrhoea</i> L.)	Lepidoptera
Salkım güvesi	(<i>Lobesia botrana</i> Schiff.)	Lepidoptera
Amerikan beyaz kele.	(<i>Hyphantria cunea</i> Drury)	Lepidoptera
Elma ağ kurdu	(<i>Yponomeuta malinellus</i> Zell.)	Lepidoptera
Yüzük kelebeği	(<i>Malacosoma neustria</i> L.)	Lepidoptera
Harnup güvesi	(<i>Ectomyelois ceratonia</i> Zell.)	Lepidoptera
Kır tırtılı	(<i>Lymantria dispar</i> L.)	Lepidoptera
Limon çiçek güvesi	(<i>Prays citri</i> Mill.)	Lepidoptera

Dünyadaki uygulamalarda ise *B. thuringiensis* ve *B. papilliae* bakterileri kullanılmaktadır. Son yıllarda lepidopter ve dipterler üzerinde etkili olan *B. thuringiensis*'in coleopterler üzerinde de etkili olduğu bulunmuştur. Özellikle *B. thuringiensis* var. *israelensis* sivrisinek ve karasinek, *B. thuringiensis* var. *sphaericus* sivrisinek, *B. thuringiensis* var. *sandiego* patates böceği larvalarına karşı kullanılmaktadır (15, 16).

Bakteriler dışında güncel olarak özellikle virüslerde kullanılmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar ile daha çok lepidoptera ve hymenoptera grupları üzerinde etkili olan virüslerin coleoptera grubu üzerinde de etkili olduğu bulunmuştur. Böcek kontrolü için kullanılan virüsler *Baculoviridae*, *Reoviridae*, *Poxviridae*, *Picornaviridae*, *Densoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* ve *Iridoviridae* familyalarına aittir (24). Bunlardan *Baculoviridae* familyası üyeleri sadece arthropodlarda enfeksiyon oluşturmalarından dolayı, omurgalılar ve diğer gruplarda enfeksiyon oluşturanlara oranla daha avantajlıdır (24). Virüsler, böcek ve akarların toplam 400'e yakın türünden izole edilmişlerdir. Son yıllarda bazı böcek virüsleri bitkiler ve orman zararlılarına karşı mücadelede kullanılmaktadır. Amerika Birleşik

Devletleri'nde en az 3 tür baculovirus arazide kullanılmak üzere ticari olarak üretilmektedir (15). Üretilen tüm virüslerin teşhisi, aktivitesi, memelilere karşı toksisitesi ve patojenitesi araştırılmaktadır. Çizelge 5'de kullanılan baculovirus örnekleri görülmektedir.

Çizelge 5. Çeşitli baculovirüslerin etkili olduğu konaklar ve kullanım bölgeleri

Konukçu	Uygulama Alanı	Virüs Grupları
Coleoptera Scarabaeidae <i>Oryctes rhinoceros</i> (Hindistan ceviz ağacı böc.)	Pasifik	Nuklear Polyhedrosis Virüs (NPV)
Hymenoptera Diprionidae <i>Gilpinia hercyniae</i> (Avrupa ladini testere arısı)	Avrupa, Kuzey Amerika	NPV
Lepidoptera Tortricidae <i>Argyrotaenia velutinana</i>	Kuzey Amerika	Granulosis Virüs (GV)
<i>Choristoneura fumiferana</i>	"	NPV, GV, Sitoplazmik Virüs (CPV)
<i>Heliothis zea</i> (Amerikan yeşil kurdu)	Kuzey ve Güney Amerika	NPV
<i>Phthorimaea operculella</i> (Patates kurdu)	Pasifik, Kuzey Amerika	GV

Böceklere karşı mücadele de diğer bir önemli nokta ise rekombinant DNA teknolojisi tekniklerini kullanarak çeşitli genlerin

bitkilere aktarılması olayıdır ki böyle bitkiler "transgenik bitkiler" olarak adlandırılır.

Bu teknoloji ile elde edilmiş bazı bitkiler Çizelge 6'da gösterilmektedir (15).

Çizelge 6. *B. thuringiensis*'in bazı genlerinin aktarılması ile elde edilmiş transgenik bitkiler

Aktarılan Genler	Bitki	Kontrol Edilen Böcekler
<i>cryIA</i> (b)	Tütün	<i>Manduca sexta</i>
<i>cryIA</i> (a)	Tütün	<i>Heliothis virescens</i>
<i>cryIA</i> (c)	Domates	<i>Keiferia lycopersicella</i> <i>Heliothis zea</i>
<i>cryIA</i> (b)	Pamuk	<i>Trichoplusia ni</i>
<i>cryIA</i> (c)	Pamuk	<i>Spodoptera exigua</i>
<i>cryIA</i> (b)	Patates	<i>Phthorimaea operculella</i>
<i>cryIIIA</i>	Patates	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>

1.10. Böceklerde Rastlanılan Hastalık Oluşturabilen Ajanlar

Her geçen gün kimyasalların kötü etkilerinin daha iyi anlaşılmasıyla birlikte bir biyolojik ajan tespit edebilmek için yapılan araştırmaların böcek patojenlerinin belirlenmesi üzerinde oldukça yoğunluk kazandığı görülür.

Böceklerde muhtemelen bulunabilen ajanlar şunlardır:

Virüsler: Virüslerin mevcudiyetinde hücrelerdeki bozulma ve parçalanma çok net olarak görülür, özellikle hipodermis tabakasında kristal benzeri virüs inklüzyon yapıları böceğin vücut sıvısında mevcuttur. Polyhedra olarak bilinen polihedral inklüzyonlar, 0.5-1.5 μm boyundadırlar. Oval inklüzyonlar ise granül olarak adlandırılır ve yaklaşık 0.5 μm çapındadırlar. Özellikle malpigi tüpündeki organik

olmayan kristallerin polyhedralarla olan benzerliğine her zaman dikkat edilmelidir. Polyhedraları görebilmek için esas olarak trakeal matriks, hemositler ve hipodermisin incelenmesi gerekir (25). 1983'de Mitchell ve arkadaşları (26) küçük mısır sapı kurdundan (*Elasmopalpus lignosellus*) bir Entomopoxvirüs izole etmişler ve bu virüsün karakterizasyonunu yapmışlardır. 1989'da Triggiani (27) *Tortrix viridana* L. popülasyonundan bir nuclear polyhedrozis virüs teşhisi gerçekleştirmiştir. 1994'de Vargas-Osuna ve ark. (28) *Ocnogyna baetica*'dan yeni bir baculovirüs izole etmiş ve tanımlamışlardır. 1995'de Liao ve ark. (29) *Culicoides oxystoma*'dan bir akabane virüs izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bunlara ilave olarak şu ana kadar pek çok böcek virüsü izole edilmiştir (15, 16, 24).

Riketsialar: Küçük, sık sık polimorfizm gösteren yaklaşık 0.5 μm çaplı çubuk şeklinde mikroorganizmalardır. Böceklerin vücut sıvısında bulunurlar (25).

Bakteriler: Böceklerde bulunan en karışık patojen gruplarından. Bakteriler böceğin normal florasında bulunur, bazıları da böceklerde çeşitli hastalıklara sebep olurlar. Özellikle spor oluşturan bakteri infeksiyonları böcekler için öldürücüdür (25). 1972'de Lipa ve Wiland (30) birkaç Lepidoptera larvasından 11 tür bakteri (*Alcaligenes recti*, *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacterium maris*, *Aerobacter cloaceae*, *Aerobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Escherichia freundii*, *Escherichia sp.*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* ve *Pseudomonas fluorescens*) izolasyonu ve karakterizasyonu yapmışlardır.

Mantarlar: Kısa ve uzun hifler halinde hemolenf içinde görülebilirler. Enfeksiyonda hifler zamanla kütikülayı saracağından tespiti diğer gruplara göre daha kolay olmaktadır (25). 1971 yılında *Agrotis c-nigrum* L., *A. exclamationis* L. ve *A. segetum* Schiff. 'dan 7 tür mantar izole ve karakterize edilmiştir (31).

Protozoalar: Mikroskop altında tükrük bezi, bağırsak epiteli ve diğer organlarda küçük veya büyük siyah noktalar halinde görülürler. Amöba ve gregarinlerin vejetatif safhaları bağırsak ve dokularda incelenip görülebilir. mikrosporların boyu birbirinden oldukça farklılık gösterir. Örneğin; 3-6 μm , 10-20 μm , 30-60 μm gibi (25). 1991'de Lipa ve Hokkanen (32) *Meligethes aeneus* F. (Coleoptera)'dan bir haplosporodan ve birde mikrosporodan izole ve teşhis etmişlerdir.

Nematodlar: Ölü böceklerde gelişmesinin çeşitli safhalarında olan çok sayıda nematod belirlenebilir. Böceğin ölümünden sonra nematodlar böceği parçalayarak dış ortama çıkarlar (25).

Keneler: Özellikle böceğin vücut kısımlarından, trakelerde ve kütikula üzerinde bulunurlar. Buralarda tüm gelişim safhalarını görmek mümkündür (25).

1.11. Zararlı Böceklerin Bakteriyal Florası

Şu ana kadar yapılan çalışmalarla böceklerden izole edilebilen bakteriyal türler genel olarak 8 cinste toplanır.

Pseudomonas: Düz veya hafifçe kıvrık olan çubuk şeklindeki hücreler $0.5-1.0 \times 1.5-5.0 \mu\text{m}$ boyutlara sahiptir. Birçok tür karbon kaynağı olarak poly- β -hydroxybutyrati kullanır. Gram (-) olan hücreler spor oluşturmaz. Çoğu türler büyüme faktör ihtiyacı göstermezler. Doğada yaygın şekilde bulunan türlerden bazıları insan, hayvan va bitkiler için patojenik olabilirler. Patojenik türler böcek bağırsağında enfeksiyon oluştururlar (33).

Bacillus: Çubuk şeklinde ve düz olan hücrelerin boyutları $0.5-2.5 \times 1.2-6 \mu\text{m}$ 'dir. Hücreler sık sık çiftler ve zincirler halinde bulunurlar. Hücre uçları yuvarlak veya köşeli olabilir. Gram (+) olan hücreler hareketlidir ve endospor oluştururlar. Cins içerisinde aerobik ve fakültatif anaerobik türler bulunur. Bu cinse dahil birkaç tür omurgalılar ve omurgasızlar için patojeniktir. Patojenik türler özellikle spor ve parasporal kristaller oluşturan türlerdir. Bu türler ürettikleri kristaller ile böcekler üzerinde öldürücü etkiye sahiptirler (34, 35).

Micrococcus: Hücreler küresel, $0.5-2.0 \mu\text{m}$ çapında, genellikle ikili, dördü ve düzensiz gruplar halinde bulunurlar. Hareketsiz olan hücreler gram (+)'dir. Hücreler spor oluşturmazlar. Çoğu türler karotinoid pigmenti üretirler. Tüm türler %5 NaCl ihtiva eden ortamlarda büyüyebilir. Optimum büyüme sıcaklıkları $25-37^\circ\text{C}$ derece arasında değişir. Bazı türler fırsatçı patojendirler (36).

Serratia: Basil hücreler $0.5-0.8 \mu\text{m}$ çapında, $0.9-2.0 \mu\text{m}$ uzunluğundadır. Gram (-) ve hareketli olan türler fakültatif anaerob'durlar. En iyi $30-37^\circ\text{C}$ arasında büyürler. D-Glukoz ve diğer karbohidratlar türler tarafından asid üretimi ile katabolize edilir. Bazı türler patojendirler (30, 35, 37).

Escherichia: Hücreler basil, 1.1-1.5x2.0-6.0 μm boyutlarında, genellikle tek ve çiftler halinde bulunurlar. Fakültatif anaerobik olan hücrelerin bazıları hareketli bazıları ise hareketsizdir. Bu cinse dahil bazı türler fırsatçı patojen olarak bilinir (37).

Alcaligenes: Bu cins basil, kokko basil ve kokkus türler içerir. Hücre boyutları 0.5-1.0x0.5-2.6 μm 'dir. Hücreler genellikle tek tek bulunur. Gram (-) olan hücreler hareketlidirler. Optimum sıcaklığı 20-37°C'dir. Genellikle toprak ve suda yaygın olarak bulunurlar. Tüm cins bireyleri zorunlu aerobiktirler (33).

Brevibacterium: Hücreler büyük kokkus ve kokkoid uçlarla sonuçlanan kısa basillerdir. 0.6-1.0 μm çapındaki hücrelerin boyları değişkendir. Hücreler hareketsiz, gram (+), aerobik ve sporsuzdur. Optimum büyüme sıcaklıkları 20-30°C veya suşlara bağlı olarak 37°C olabilir (38).

Aerobacter: Hücreler kısa basil formundadır. Hareketli ve gram (-) olan hücreler agar üzerinde beyaz koloniler oluşturur. Pigment üretimi meydana gelmez. Optimum büyüme sıcaklıkları 20-30°C'dir (38).

1.12. Bakteriyal İzolatların İdentifikasyonları

1.12.1. Nümerik Taksonomi

Morfoloji: Bakterilerin tür tayinlerinde ilk olarak ortaya çıkarılması gereken özellik, hücre şeklidir. Hücre şeklinin ortaya çıkarılması için basit boyama yapılır ve mikroskop altında incelenerek hücre şekli ortaya çıkarılır (39).

Boyama: Bakteriyolojide kullanılan en önemli ayırt edici boyamalardan birisi, gram boyamadır. Bu boyamanın sonucuna göre, hücre duvarının özelliğine bağlı olarak bakteri hücreleri gram pozitif ve gram negatif olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Ayrıca değişken özellik gösteren veya reaksiyon vermeyen organizmalar da bu boyama neticesinde belirlenirler. Bu özellik, mikroorganizmaların sınıflandırılmasında kullanılan çok önemli ve gerekli olan bir özelliktir (34).

Diğer bir önemli boyama türü spor boyamadır. Bir grup bakteri, karşılaştığı uygun olmayan şartlarda hayatını devam ettirebilmek için

endospor olarak adlandırılan, dayanıklı, dinlenme formu olan yapılar oluşturmaktadır. Endosporlar, bakteri hücresi içerisinde meydana gelen, ısıya karşı oldukça dirençli ve kaynama ile dahi kolaylıkla ölmeyen dayanıklı yapılardır. Bir bakterinin endospor oluşturup oluşturmadığının bilinmesi ve endosporun pozisyonu taksonomik olarak önemlidir. Endospor, hücrenin merkezinde ise merkezi endospor, ucunda kutba yakın ise terminal endospor ve uçlarla merkez arasında ise subterminal endospor olarak adlandırılır (34).

Çoğu prokaryotik hücreler yüzeylerinde sümüksü veya sakız gibi yapışkan maddeler meydana getirirler. Bu yapışkan maddeler, ekstrasellular polisakkaritten oluşmaktadır. Meydana gelen bu yapılara "kapsül" veya "yapışkan tabaka" denilmesine rağmen, daha genel bir terim olarak bunlara "glikokaliks" adı verilmektedir. Glikokaliks tabakası, bakterilerde birçok fonksiyonu yerine getirmektedir. Bakterinin dışındaki bu polisakkarit tabaka, patojenik mikroorganizmaların konaklarına tutunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bilindiği gibi kapsüle sahip olmayan mikroorganizmaların patojenite meydana getirmek için konak hücreye girip, hastalık oluşturmaları zordur. Ayrıca polisakkarit tabakası bir miktar suyu da bağlayabildiğinden, glikokaliks tabakasının kurumaya direnç sağlanmasında da önemli olduğu bilinmektedir (54).

Büyüme: Bakterilerin inoküle edildikleri besiyeri (gerek katı ve gerekse sıvı ama, özellikle katı besiyeri)'de oluşturduğu koloni morfolojisi, pigment oluşumu ve üreme süresi gibi karakterler (34).

Fizyoloji: Bakterilerin sınıflandırılmasında, büyüdükleri ve yaşadıkları ortamın pH'ı, tuzluluğu, sıcaklığı ve oksijen miktarı gibi kriterler kullanılan özelliklerden bazılarıdır.

Sıcaklık, hücresel enzimler üzerinde etkili olarak, kimyasal reaksiyonların hızını etkilemektedir. Genellikle, bütün hücre tiplerinde enzimatik aktivitelerin meydana geldiği optimum sıcaklık 20-40°C civarındadır. Düşük sıcaklıklar, enzim aktivitesini yavaşlatır ya da inhibe eder, bu münasebetle hücre metabolizması da yavaşlar ya da durur. Buna bağlı olarak, hücre büyümesi yavaşlar ya da inhibe olur. Yüksek sıcaklıklar pıhtılaşmaya sebep olduğundan, ısıya dayanıksız olan enzimler, dönüşümsüz olarak denatüre olurlar (40). Enzim aktivitesini etkileyen diğer bir faktör de pH'dır. Hücrelerin genellikle yaşayabildikleri optimum pH, nötral pH olan 7'dir. pH'da meydana gelen artış ve düşüşler

hücrel enzimlerin bozulmasına neden olur. Bu yüzden, büyüme hızı ve hayat etkilenmiş olur (34).

Çoğu hücrelerin hayatlarını devam ettirebilmeleri için, gerekli olan gaz atmosferik oksijendir. Mikroorganizmalar atmosferik oksijen ihtiyaçlarına göre aeroblar, mikroaerofiller, tamamen anaeroblar, aerotolerant anaeroblar ve fakültatif anaeroblar olarak gruplandırılmaktadırlar. Oksijenin varlığında solunum için gerekli olan enzimlerden mahrum olan anaerobik bakteriler anaerobik şartlarda solunum olayını meydana getirmektedir (34).

Biyokimya: Biyokimyasal katalizörler olarak bilinen enzimler, hem hücre içinde hem de hücre dışındaki olayları katalizleyerek biyokimyasal aktiviteleri meydana getirmektedirler (34).

Büyük moleküler ağırlığa sahip olan maddeler hücre zarından geçemezler, bundan dolayı, bu maddeler (polisakkaridler, lipidler, proteinler) daha küçük moleküler ağırlığa sahip olan maddelere dönüşmelidirler. Ancak, bu durumda hücre zarından geçebilirler. Bu büyük moleküler ağırlığa sahip olan maddeleri parçalayan enzimler, hidrolitik enzimler olarak adlandırılmaktadırlar. Hücre dışında görev yapan enzimler nişastanın, lipidlerin, kazeinin ve jelatinin hidrolizinden sorumlu olan enzimlerdir. Bu enzimler tarafından hidrolize edilen büyük moleküller, hücre içine alınabilirler (34).

Enzimler yardımı ile meydana gelen değişim, hücrenin yaşaması ve fonksiyonu için gereklidir ve hücrel metabolizmanın temelidir. Meydana gelen bu metabolik işlemler sonucunda, metabolik ürünler oluşur ve bundan sonra çevreye verilir. Oluşan bu son ürünlerin anlaşılması, sadece özel enzim sistemlerinin aydınlatılması için değil, aynı zamanda mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve teşhisinde de kullanılmaktadır (34).

Çoğu mikroorganizmalar, kendileri için gerekli olan enerjiyi, karbohidratlar gibi substratların biyooksidasyonunu gerçekleştiren enzimler yardımıyla elde ederler. Karbohidrat fermentasyonu sonucunda, organik asitler (laktik, formik veya asetik asit), bunun yanında hidrojen ve karbondioksit gibi gazlar meydana getirirler (34). Karbohidrat fermentasyonu testleri ile, meydana gelen bu son ürünler kullanılarak bir organizmanın herhangi bir karbohidratı fermente edip etmedikleri anlaşılır (40).

Voges-Proskauer testi yardımıyla, bazı organizmaların glukoz metabolizması sonucunda oluşan organik asitlerden, asetilmetilkarbinol gibi nötral son ürünleri veya asidik olmayan son ürünleri üretebilme kabiliyetleri ortaya çıkarılır (40).

Bazı mikroorganizmalar, fermente edebilecekleri glukoz veya laktoz mevcut olmadığında, enerji elde etmek için, karbon kaynağı olarak sitrat veya propionatı kullanmaktadır. Sitrat'a etki eden enzim, sitraz enzimidir ve reaksiyon sonucunda oksaloasetik asit ve asetat meydana gelir. Değişen pH nedeniyle ortamdaki indikatörün rengi değişir (34). Mikroorganizmaların sitrat ve propionatı kullanıp kullanmadıkları, sitrat ve propionatı kullanım testleri ile ortaya çıkarılır (40).

Bazı aerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmaların nitratı indirgemesi moleküler oksijen olmadığında yani anaerobik şartlar altında meydana gelir. Bu organizmalarda anaerobik solunum, bir oksidatif süreçtir ve böylece hücre nitrat (NO_3) veya sülfat (SO_4) gibi substratları oksijen sağlamak maksadıyla kullanırlar. Buradan elde edilen oksijen enerji taşınımı esnasında hidrojen tutucu olarak iş görür ve olay nitrat redüktaz adı verilen bir enzim tarafından katalizlenir. Bakterilerin nitratı nitrit veya amonyağa indirgeyip indirgemediği, nitratı indirgeme testi ile ortaya çıkarılmaktadır (40).

Aerobik solunum esnasında mikroorganizmalar hidrojen peroksit veya bazı durumlarda da aşırı derecede toksik olan süper oksitleri meydana getirmektedirler. Eğer bu ürünler enzimatik olarak ortadan kaldırılmazlarsa organizmanın ölümüne neden olurlar. Katalaz veya peroksidaz adı verilen enzimleri üretebilen organizmalar, bu enzimler yardımıyla hidrojen peroksiti ortadan kaldırırlar. Organizmaların katalaz enzimini üretilip üretmedikleri, katalaz testi ile ortaya çıkarılır (40).

Oksidaz enzimi, aerobik solunum sırasında elektron taşınımının düzenlenmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Sitokrom oksidaz, moleküler oksijenle (O_2) indirgenmiş olan sitokromun oksidasyonunu katalizler. Bakterilerin oksidaz enzimi üretilip üretmedikleri, oksidaz testi ile ortaya çıkarılmaktadır (34).

1.12.2. Genetik Homoloji

DNA'daki benzerliğin organizmalar arasında araştırılması ve buna bağlı olarak organizmaların gruplandırılmasıdır. Bu organizmaların ayırımı DNA'daki benzerlikler, DNA'daki baz sırasının tayini veya DNA hibridizasyonu yöntemi yardımı ile olur. Protein profilleri veya amino asit sırasının tayini de sistematikte önemli ölçüde kullanılmaktadır.

Tür tayininde genel kanaat, birbirleriyle ilişkili olan organizmaların benzer veya aynı tür hücresel proteinlere sahip olduklarıdır. İki yönlü elektroforetik ve izoelektrik nokta prosedürleri (41) hücre ekstraktından yüzlerce proteini ayırabilme yeteneğindedir.

Tek yönlü poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) hücresel proteinlerin ayrılmasında kullanılan diğer bir yöntemdir. Bu yöntemle örnekten otuza yakın bant elde edilebilir ve karşılaştırması yapılabilir.

1.12.3. Diğer Metodlar

Ribozom Analizi: Ribozomlar protein sentezinin gerçekleştiği yapılardır. Ribozomlardaki RNA'lar farklı şekildedirler. 16S rRNA ünitesi organizmaların sınıflandırılmasında kullanılır. Bu 16S rRNA organizmaları orjinleri bakımından sınıflandırmaya yarar (42).

İmmünolojik Reaksiyonlar: Mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan yapıların tanınmasında kullanılır. Bunda çeşitli antikorlar kullanılır. Bu antikorlar monoklonal ve poliklonal antikorlardır. Bu işte genellikle monoklonal antikorlar kullanılır. Bunlar hücre yüzeyinde bulunan özel proteinlere bağlanırlar. Aynı antikor ile boyanan proteini ihtiva eden organizmalar bir grupta incelenir.

Faj Tiplendirilmesi: Bakterinin ekildiği kültür kabına konak spektrumu bilinen fajdan damlatılır. Eğer damla etrafında bakteriyal büyüme olmazsa bu bakteri, fajın bilinen konakları arasına yerleştirilir.

1.13. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmadaki amaç, ülke ekonomisinde çok büyük bir öneme sahip fındık ürününe büyük kayıplar verdiren fındık kurdu (*Balaninus nucum*)'nun biyolojik mücadele açısından önemli olan biyolojisi ile ilgili bilgileri tam olarak elde edebilmek, fındık kurdunun bakteriyal florasını belirlemek, floradaki bakterilerin kantitatif analizini yapmak ve zararlıya karşı etkin bir şekilde kullanılacak biyolojik ajanları araştırmaktır.

Araştırma sonucunda böyle bir biyolojik ajanın tespiti, Türkiye'de kaliteli fındık veriminin artmasını sağlayacağından ülkeye ekonomik açıdan önemli katkılar sağlayacaktır. Ayrıca çevre kirlenmesine sebep olan çeşitli kimyasal ilaçların zararlı etkileri ortadan kaldırılacak ve bu konudaki literatür bilgilerine katkılar sağlanacaktır.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Ergin ve Larvaların Temini

Araştırmanın ana materyalini, Trabzon yöresi sahil kesiminden 1995-1996 yılları içerisinde toplanan *B. nucum* larva ve erginleri teşkil etmiştir.

Erginler belirlenen alanlardan Nisan ayının başından itibaren her hafta düzenli bir şekilde Haziran ayına kadar toplandı. Toplama işlemi sabah ve akşam serin saatlerde yapıldı. Böcekler 3 x 3.5 m ebadındaki bir bez üzerine darbeleme usulü ile toplandı (43). Yakalanan böcekler kapağı hava almak için delinmiş olan uygun şişeler ile laboratuvara getirildi. Hazırlanmış olduğumuz kaplara (12 cm çaplı) yerleştirilen erginlerin bir grubu fındığın taze yaprak, sürgün ve meyveleri gibi doğal besinlerden hazırlanmış bir besinle beslenirken, ayrıca fındık dışındaki meyvelere zarar verip vermediklerini anlayabilmek için diğer bir grup da, elma, armut, döngel ve erik gibi çeşitli meyvelerle beslendi. Besinler 2-3 günde bir değiştirilerek, bozulmaları önlenildi.

Larvalar ise Haziran ayının ortalarından itibaren araziden yaralı fındıkların toplanıp laboratuvara getirilmesi şeklinde temin edildi. Kırılan fındıklardan dikkatlice çıkartılan larvalar özel kaplar içerisinde fındık meyvesi ve taze sürgünlerden hazırlanmış besin ile beslendi ve uzun süre yaşatılmaya çalışıldı.

Temin edilen ergin ve larvalar daha sonra biyoloji, bakteriyal flora ve bioassay çalışmalarında kullanıldı.

2.2. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar

2.2.1. Besiyeriler

Anaerobik agar, fenilalanin agar, indol besiyeri, karbohidrat fermentasyonu besiyeri, lizozimli nutrient broth, nişasta agar, nitrat broth, nutrient agar, nutrient broth, nutrient jelatin, sitrat ve propionat kullanım besiyerleri, tirozin agar, üre hidrolizi besiyeri ve Voges-Proskauer broth.

2.2.2. Kimyasallar

Akrilamid, amonyum asetat, amonyum oksalat, amonyum persülfat, aseton, bakteriyolojik agar, bis-akrilamid, bovine serum albumin (BSA), brom fenol blue, coomassie brilliant blue-G 250, coomassie brilliant blue-R 250, demir sülfat, diamonyum hidrojen fosfat, dimetil α -naftolamin, etilen diamintetraasetik asit (EDTA), gliserol, glisin, glukoz, fenol red, jelatin, kristal viyole, L-arginin, L-tirozin, mağnezyum sülfat, malaşit yeşili, metanol, nişasta, p-dimetil amino benzaldehit, pepton, potasyum asetat, potasyum klorür, safranin, sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum klorür, sodyum propionat, sülfonilik asit, tannic asid, tris bazı, trisodyum sitrat, üre ve yeast ekstrakt.

2.2.3. Ayıraçlar

Aseton alkol, demir klorür solüsyonu, jelatin hidrolizi ayıracı, indol ayıracı, iyot çözeltisi, katalaz ayıracı, kristal viyole boyası, nitrit ayıracı ve Voges-Proskauer ayıracı.

2.3. Fındık Kurdunun Biyolojisinin Araştırılması

Çiftleşebilmek için iyi bir beslenmeye ihtiyaç gösteren böceklerin Haziran ayıyla birlikte koydukları yumurtalar fındıklardan dikkatlice çıkartıldı ve kuluçka döneminden başlayarak her gün takip edilip, gelişim sürecine bağlı olarak böceğin hayatı incelendi ve Prior marka stereo mikroskop ile fotoğraflandı.

Larval dönemleri belirlenen böceklerin, dişi erkek ayırımında önemli olan hortum (rostrum) uzunluklarının yanısıra, kanat uzunluğu, vücut uzunluğu, yumurta boy ve en ortalamaları ile böceğin cinsiyet oranı tespit edildi.

2.4. Fındık Kurdunun Bakteriyal Florasının Araştırılması

2.4.1. Bakteriyal Floranın Kantitatif Analizi

Denemede kullanılan ergin ve larvalar önce 10 dakika %70'lik etil alkolde yüzey sterilizasyonu için bekletildi. Sonra 5 ml steril PBS

(pH:7.4) içinde ezilen numunelerden elde edilen süspansiyon steril 2 katlı tülbentten 2 kez geçirildi (35). Süspansiyon daha sonra tüp seyreltme metoduna göre 10^{-8} 'e kadar seyreltildi (44). Seyreltiklerin herbirinden nütrient agar'a 100'er μ l yayma ekim yapıldı. Daha sonra petriyerler 30°C 'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon neticesinde 25-250 arası koloni oluşan petriyerlerde sayım yapılarak larva ve erginlerin toplam bakteri sayıları belirlendi.

2.4.2. Bakteriyal İzolatların Hazırlanması

Bakteriyal flora tayini için toplanan larva ve erginler ayrı ayrı kaplarda saklandı. Her bir denemede 2'şer adet ergin ve 5'er adet larva olmak üzere numuneler ilk önce 10 dakika %70'lik etil alkolde yüzey sterilizasyonu için bekletildi. Sonra 5 ml steril PBS (pH:7.4) içinde ezilen numunelerden elde edilen süspansiyon steril 2 katlı tülbentten 2 kez geçirildi (35). Süspansiyon daha sonra tüp seyreltme metoduna göre 10^{-8} 'e kadar seyreltildi (44). Seyreltiklerin herbirinden zenginleştirme kültürü yapıldıktan sonra hem nütrient agar'a hem de anaerobik agar'a 100'er μ l yayma ekim yapıldı. Çalışmada genel besiyeri olarak nütrient broth ve nütrient agar besiyerleri kullanıldı. Daha sonra petriyerler 30°C 'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda mevcut olan farklı bakteriler koloni özelliklerine göre alınarak çizgi ekim yöntemi ile saf kültürleri elde edildi. İzolatlardan morfolojik ve kültürel karakterleri kabaca aynı olanlar inceleme dışı bırakılarak içlerinden farklı özelliklere sahip olan 5 izolat diğer testlere tabi tutulmak üzere alındı. İzolatların tür tayinlerinin yapılması için Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1 (33) ve 2'den (34) faydalanılarak hazırlanan teşhis besiyerleri kullanıldı.

2.4.3. Bakteriyal İzolatların Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.4.3.1. Basit Boyama

Elde edilen izolatların hücre şekillerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak basit boyamalar yapıldı. Bu amaçla, lam üzerine yayılan bakteri kültürleri açık havada kurutulduktan sonra alevden geçirilmek suretiyle tespit edildiler. Tespit işleminden sonra lam üzerine kristal viyole boya

solüsyonu ilave edildi, 3-4 dakika beklendikten sonra, dH₂O ile yıkandı ve kuruduktan sonra mikroskop altında incelendi (39).

2.4.3.2. Gram Boyama

Gram boyama, bakterinin hücre duvarının içeriği hakkında bilgi veren bir boyama türüdür. Gram negatif olarak boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglukon tabakası incedir. Gram pozitif olarak boyanan bakterilerde ise bu tabaka daha kalındır. Gram boyama şu şekilde yapıldı: Genç (24 saatlikten az) bakteri kültürlerinden bir miktar alınarak lam üzerine yayıldı. Açık havada kuruması beklendikten sonra alevden geçirilerek tespit edildi. 10 saniye kristal viyole ile muamele edildikten sonra lugolle yıkandı ve 10 saniye lugolle muamele edildi. Aseton-alkolle renk giderildikten sonra 10 saniye safraninle muamele edildi, dH₂O ile yıkandıktan sonra açık havada kurutularak mikroskop altında incelemeye alındı ve mor renkli olarak boyanan bakterilerin gram pozitif, pembe renkli olarak boyanan bakterilerin ise gram negatif olduğuna karar verildi (40).

2.4.3.3. Spor Boyama

Endosporlar, bazı bakterilerin uygun olmayan hayat şartlarında oluşturdukları, dış etkiye karşı dayanıklı olan yapılardır. İzolatların endospor oluşturup oluşturmadığı ve endosporun hücre içerisindeki pozisyonunun belirlenmesi amacıyla genellikle yaşlı kültürler (48-72 saat) kullanıldı. Kültürler lam üzerine yayıldıktan ve açık havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek tespit edildi. Ardından kaynar su buharı üzerine alınan lam üzerine malaşit yeşili ilave edildi ve 5 dakika böylece boyanması beklendikten sonra, dH₂O ile yıkandı. Üzerine safranin boyası ilave edildi ve 30-60 saniye boyandıktan sonra dH₂O ile yıkandı, açık havada kurutularak mikroskop altında incelendi. Pembe renkli hücreler içerisinde yeşil renkli sporların olup olmadığı araştırıldı (40).

2.4.3.4. Kapsül Boyama

Kapsül hücre tarafından salgılanan ve hücre duvarını saran, hücrenin dışındaki jelatinimsi bir tabakadır. İzolatların kapsül yapısına

sahip olup olmadıklarının ortaya çıkarılması için öncelikle herbir izolattan 24-48 saatlik kültürler yapıldı. Yapılan bu kültürlerden bir öze yardımıyla temiz bir lam üzerine yayma preparat hazırlandı. Açık havada kuruması beklendikten sonra üzerine kristal viyole boyası ilave edildi ve 5-7 dakika beklendi. Daha sonra boya %20'lik CuSO_4 ile yıkandı. Açık havada kuruması beklendikten sonra mikroskop altında incelendi. Mavi renkli bir sahada mor-eflatun renkli boyanmış hücrelerin etrafında boyanmamış şeffaf bir bölgenin olması kapsül olduğunu gösterir (40).

2.4.3.5. Hareket Testleri

İzolatların hareketli olup olmadıklarının ortaya çıkarılması için "lam lamel arası preparasyon" tekniği kullanıldı (40). Bu teknikle izolatların hareketli olup olmadıklarının ortaya çıkarılması için hazırlanan kültürlerden bir öze dolusu alındı ve temiz bir lam üzerine konulup üzerine lamel kapatıldı. Yapılan bu preparat mikroskopta incelendi ve izolatların hareketli olup olmadıklarına karar verildi.

2.4.4. Bakteriyal İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.4.4.1. Bakteriyal İzolatların Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Elde edilen izolatların maksimum ve minimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi için bakteriler nutrient agar slantları üzerine ekildiler. 30°C ve yukarıdaki sıcaklıklar için 1 gün, $20-25^\circ\text{C}$ arasındaki sıcaklıklar için 2 gün ve 20°C 'nin altındaki sıcaklıklar için ise 3 gün etüvde inkübe edilerek maksimum ve minimum büyüme sıcaklıkları ortaya çıkarıldı (34).

İzolatların optimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla nutrient broth içinde yapılan gece kültürlerinden $\text{OD}_{600}=0.1$ olacak şekilde yeniden nutrient broth'a ekim yapıldı. Hazırlanan kültürler 20, 25, 30, 35, ve 40°C 'de belli bir süre sallayıcıda sallanarak büyütüldüler. Yapılan bu kültürlerden saat başı örnekler alınarak spektrofotometrede OD_{600} 'de absorbans değerleri ölçülerek bakterilerin optimum olarak büyüdüğü sıcaklıklar ortaya çıkarıldı (40).

2.4.4.2. Bakteriyal İzolatların Büyüyebildiği pH Aralıklarının ve Optimum pH'larının Belirlenmesi

İzolatların büyüyebildiği pH aralığının belirlenmesi için izolatlar değişik pH değerlerine (5, 5.5, 6, 7, 8, 9, 9.5 ve 10) sahip nutrient broth'a inoküle edildi ve optimum büyüme sıcaklıklarında üç gün inkübe edildi. İnkübasyon neticesinde üreme olup olmadığı spektrofotometrede (OD₆₀₀'de) ölçümler yapılarak ortaya çıkarıldı. Böylece izolatların maksimum ve minimum olarak büyüyebildiği pH değerleri ortaya çıkarıldı.

İzolatların hangi pH değerinde optimum olarak büyüdüğünün ortaya çıkarılması için izolatların büyüyebildiği pH değerine sahip olan nutrient broth besiyerlerine OD₆₀₀=0.1 olacak şekilde gece kültürlerinden aşılama yapıldı ve birer saat aralıklarla spektrofotometrede ölçümler yapılarak hangi pH değerinde optimum olarak büyüdüğü ortaya çıkarıldı (40).

2.4.4.3. Bakteriyal İzolatların NaCl İhtiyaçlarının Belirlenmesi

İzolatların NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla %1, 2, 5, 7, 12 ve 20 oranında NaCl ihtiva eden nutrient broth besiyerleri hazırlandı. Bunun 4 mililitresine herbir izolattan ekim yapıldı. 1 ve 3 gün 30°C'de etüvde inkübasyondan sonra hangi oranda tuz ihtiva eden besiyerde üreme olmuş ise o orandaki tuzda izolatların üreyebildiği sonucuna varıldı (34).

2.4.4.4. Bakteriyal İzolatların Lizozimde Büyüme Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların lizozimde büyüüp büyümediğinin belirlenmesi amacıyla 10 mg/ml oranında (10.000 ünite) lizozim ihtiva eden nutrient broth besiyeri hazırlandı. Bu besiyeriye herbir izolattan ekim yapıldı. Yedi ve ondört gün 30°C'de inkübasyondan sonra üremenin olup olmadığına bakıldı (34).

2.4.4.5. Bakteriyal İzolatların Atmosferik Oksijen İhtiyaçlarının Belirlenmesi

İzolatların atmosferik oksijen ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla hazırlanan "brain heart infuzyon agar" besiyeri deney tüplerine dağıtıldı, steril edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutuldu, tüplere herbir izolattan ekim yapıldı ve çevirilerek karıştırıldıktan sonra hemen soğuk suya daldırılarak donması sağlandı. 30°C'de bir gece inkübe edildikten sonra, tüp içerisinde üredikleri bölgeye bakılarak, izolatların oksijen ihtiyaçları hakkında karar verildi. Mikroorganizmalar atmosferik oksijen ihtiyaçlarına göre besiyerinin en üst yüzeyinde büyüyenler aeroblar, üst tabakanın hemen alt kısmında büyüyenler mikroaerofilikler, tamamen dip kısımda büyüyenler anaeroblar ve hem dip hemde üst kısımda büyüeyenler fakültatif anaeroblar olmak üzere ayrıldılar (40).

Ayrıca izolatların aerobik olarak mı yoksa tamamen anaerobik solunum yaparak mı yaşadıklarının ortaya çıkarılması için deneylerde özel olarak hazırlanan anaerobik agar besiyeri kullanıldı (34).

2.4.4.6. Nişasta Hidrolizi Testi

Nişasta, glukoz monomerlerinin glikozidik bağlarla birbirlerine bağlanarak oluşturduğu yüksek moleküler ağırlığa sahip bir moleküldür. Bu molekülün yıkımından sorumlu olan enzim, "amilaz"dır. İzolatların nişastayı hidroliz edip etmediklerinin test edilmesi için hazırlanan nişasta agar petrilere, izolatlar çizgi halinde ekildiler. 2 gün 30°C'deki etüvlerde inkübasyondan sonra petrideki bakterilerin üzerine lügol ilave edildi. Koyu kahve rengin oluşumu nişastanın hidroliz olduğunu, mavi rengin oluşumu ise nişastanın hidroliz olmadığını gösterdi (39).

2.4.4.7. Jelatin Hidrolizi Testi

Jelatin, zorunlu aminoasitlerden biri olan triptofanı ihtiva etmeyen eksik bir proteindir ve kollajenin parçalanması ile oluşmaktadır. Jelatini parçalayan enzim jelatinaz olarak adlandırılmaktadır. Jelatinin izolatlar tarafından hidrolize edilip edilmediğinin ortaya çıkarılması amacıyla hazırlanan nutrient jelatin besiyeri, steril deney tüplerine döküldü. İzolatlardan herbiri, bu deney tüplerine ekildikten sonra, 30°C'de 3 gün

inkübe edildi. İnkübe edilen tüpler, üçüncü günün sonunda inkübe edildikleri etüvden alındılar ve 20°C'ye ayarlanmış olan yeni bir etüve aktarıldılar. Burada 4 saat inkübe edildikten sonra besiyerinin sıvı yada katı oluşuna göre testin pozitif veya negatif olduğuna karar verildi. 20°C'de besiyerinin sıvı olmaması bakterinin jelatini parçalamadığını göstermektedir (39).

2.4.4.8. Karbohidrat Fermentasyonu Testleri

Çoğu mikroorganizmalar, hayatlarını devam ettirebilmeleri için gerekli olan enerjiyi çeşitli karbohidratları da içine alan substratların biyooksidasyonunu meydana getiren enzimatik reaksiyonlardan sağlamaktadırlar. İzolatların bazı karbohidratları fermente edip etmediklerinin ortaya çıkarılması amacıyla karbohidrat fermentasyon besiyerleri yapıldı. Bu besiyerlere izolat tarafından kullanılıp kullanılmadığı öğrenilmek istenen karbohidratlar ve pH indikatörü olarak bir boya ilave edildi. Hazırlanan karbohidrat fermentasyon besiyerine herbir izolat ekildi. İki gün uygun sıcaklığa ayarlanmış etüvde inkübe edildikten sonra, besiyerinde meydana gelen koyu pembe renkten sarı renge renk değişikliği organizmaların kullanılan şekeri fermente ettiğini, herhangi bir değişikliğin olmaması ise şekerin organizma tarafından karbohidrat kaynağı olarak kullanılmadığını göstermektedir. Ayrıca tüp içindeki besiyerinde meydana gelen kabarmalar ve çatlamalar organizmanın bu şekerden gaz oluşturduğunu göstermektedir (34).

2.4.4.9. Voges-Proskauer Testi

Voges-Proskauer testi, bazı organizmaların, glukoz metabolizması sonucu meydana gelen asetil metilkarbinol gibi, asidik olmayan veya nötral son ürünleri üretebilme kabiliyetinin ortaya çıkarılması için yapılmaktadır. Bu testin gerçekleştirilmesi amacıyla Voges-Proskauer broth besiyeri hazırlandı. Bu besiyerinin 4 mililitresine herbir izolattan ekim yapıldıktan sonra, 30°C'de 1 gün etüvde inkübe edildi. Bir günden sonra kültürlerin üzerine Voges-Proskauer ayırıcı ilave edildi. Tamamen karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Sonuçta kültür yüzeyinde kırmızı rengin oluşup oluşmadığına bakılarak testin sonucu hakkında karar verildi. Kırmızı rengin oluşması, glukoz metabolizması

sonucunda oluşan organik asitlerden, asetil metilkarbinol gibi nötral son ürünleri veya asidik olmayan son ürünleri organizmanın üretebildiğini ve dolayısıyla testin pozitif olduğunu ortaya çıkarır (40).

2.4.4.10. Sitrat ve Propionatı Kullanım Testi

Mikroorganizmalar ortamda fermente edebilecekleri glukoz veya laktozu bulamadıklarında gerekli olan enerjiyi sağlamak için ortamda bulunan sitrat veya propionatı kullanmaktadır. İzolatların bu molekülleri kullanıp kullanmadığının ortaya çıkarılması amacıyla sitrat ve propionatı kullanım besiyerleri hazırlandı. Hazırlanan bu besiyerlere her bir izolattan ekim yapıldıktan sonra, 30°C'de inkübe edildi, 1 ve 2 gün sonra yapılan incelemeler sonucunda besiyerinde üreme ve renk değişikliği olup olmadığına bakılarak eğer mavi renge bir dönüş varsa organizmaların sitrat ve propionatı karbon kaynağı olarak kullandığına karar verildi (34).

2.4.4.11. Nitratı İndirgeme Testi

İzolatların nitratı indirgeyip indirgemediğinin ortaya çıkarılması için nitrat broth besiyeri hazırlandı ve bu besiyerinin 4 mililitresine inkübasyon yapılarak kültürler 48 saat 30°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kültürler üzerine 5 damla solüsyon A (Sülfonik asit) ve 5 damla solüsyon B (Dimetil- α -naftil amid) ilave edilip, tüpler çalkalandı. 30 saniye içerisinde kırmızı-pembe renk oluşması pozitif sonuçtur ve ortamda nitritin mevcut olduğunu gösterir. Eğer kırmızı renk oluşmazsa, çok az çinko tozu ilave edilir. Bunun neticesinde kırmızı renk oluşursa sonuç negatiftir. Eğer renk değişimi olmazsa, nitratın indirgenmesi için yine pozitif sonuçtur (39).

2.4.4.12. Katalaz Testi

Mikroorganizmalar aerobik solunum sırasında hidrojen peroksit (H_2O_2) ve bazı durumlarda ise tamamen toksik olan süperoksitleri üretmektedirler. Organizmalar, oluşan bu ürünlerin kötü etkisinden bu maddeleri katalaz ve peroksidaz adı verilen enzimler yardımıyla yıkarak kurtulmaya çalışırlar. İzolatların katalaz enzimini oluşturup

oluşturmadığının ortaya çıkarılması için triptik soy agar besiyeri hazırlandı. İzolatlar bu besiyerine inoküle edildikten sonra 24-48 saat 30°C'ye ayarlanmış etüvde inkübe edildiler. İnkübasyondan sonra üzerine %10'luk H₂O₂ çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz kabarcıklarına göre testin pozitif olduğuna karar verilir (34).

2.4.4.13. Oksidaz Testi

Oksidaz testi çizgi ekim metoduna (39) göre yapıldı. Bu testin yapılabilmesi amacıyla triptik soy agar besiyeri hazırlandı. İzolatlar bu besiyerine ekildi. 30°C'de 24-48 saat bekletildikten sonra üzerine oksidaz testi ayıracağı ilave edildi, oluşan siyah renge göre testin pozitif olduğuna karar verildi.

2.4.4.14. Arginin Hidrolizi

Bu işlem Thornley (34) metoduna göre yapıldı. Çalışmada bu metot ile aynı kişi tarafından tavsiye edilen besiyeri kullanıldı. Thornley'in besiyerisi 5 ml'lik vidalı kapaklı şişelerde 3 ml olacak şekilde bölündü. Otoklavlandıktan sonra şişeler delinerek inokülasyon yapıldı ve erimiş parafin ile kapatıldı. Anaerobik şartlarda, arjininden amonyum oluşumu 2 günde indikatör rengin değişmesiyle belirlendi. Pembe-kırmızı olan besiyeri renginin sarı renge dönüşmesi pozitif olarak kabul edildi.

2.4.4.15. Tween 80 Hidrolizi

Tween 80 hidrolizi Sierra (34)'ya göre yapıldı. İzolatlar, tween 80 ihtiva eden besiyerinin bulunduğu petrilere çizgi ekim yöntemiyle ekildi ve 30°C'de inkübasyona bırakıldı. Büyüyen kolonilerin etrafında günlük olarak, çözünmeyen kalsiyum sabunları oluşumu takip edildi. Bu yapıların 10 gün içinde oluşmadığı durumda koloniler kazınarak, altlarında çökelek oluşumu arandı.

2.4.5. Bakteriyal İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

2.4.5.1. Bakteriyal İzolatların Toplam Protein Profillerinin Belirlenmesi

İzolatların ihtiva ettikleri proteinlerin profilini çıkarmak için, elde edilen her bir izolattan 10 mililitrelik gece kültürleri hazırlandı. Hücreler, 14.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Çökelek, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ve %10 Sukroz'dan oluşan TS (Tris-Sukroz)'de çözüldü. -194°C'de 1 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına alındı ve bu işlem iki kez tekrarlandı. Oda sıcaklığında çözüldükten sonra hacminin 1/20'si kadar 10 mg/ml'lik lizozim ilave edildi. Hücre süspansiyonu 35 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra, 30 dakika, 16.000xg'de santrifüj edildi. Protein özütünü ihtiva eden sıvı kısım, -20°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

2.4.5.1.1. Protein Konsantrasyon Tayini

Protein konsantrasyonu, Bradford metodu (45) ile tayin edildi. Protein konsantrasyonu, spektrofotometrik olarak 595 nm dalga boyunda alınan değerlere göre hesaplandı. Önce, spektrofotometre coomassie brilliant blue-G250 (CBB-250) ve 0.15 M'lık NaCl'den oluşan çözelti (kör) ile sıfırlandı. Numuneler ölçüm için hazırlandıktan sonra iyice karıştırıldı ve 2 ile 60 dakika arasında değerleri okundu. Standart konsantrasyon eğrisi, farklı miktarda bovine serum albumin (BSA) içeren numunelerin ölçülmesiyle elde edildi. Konsantrasyonu bilinmeyen numunelerin konsantrasyonu, konsantrasyonu bilinenlerin verdiği absorbans değerinin, standart eğrisi üzerine çakıştırılması ile bulundu. Bulunan bu değerlerden faydalanılarak numunelerdeki protein konsantrasyonları hesaplandı.

2.4.5.1.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Miktarları tayin edilmiş olan 5 adet izolatın (1, 2, 3, 4, 5) protein özütlerinden uygun miktarlarda (50 mg) alındı. Bu özütlere eşit miktarda 2x muamele tamponu (0.15 M Tris-HCl pH 6.8, %4 SDS, %20 Gliserol,

%6 β -merkaptotanol) ilave edildikten sonra, numuneler 65°C'de 90 saniye bekletildi, Laemmli (46) tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 0.75 mm kalınlığındaki her bir jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, jel coomassie brilliant blue (%0.125 coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2-4 saat boyandı. Yıkama-I solüsyonunda (%50 metanol, %10 asetik asit) 1 saat bekletildikten sonra Yıkama-II solüsyonuna (%7 asetik asit, %5 metanol) aktarıldı. En iyi jeller seçilerek iki selofan yaprak arasına alındı ve 80°C'de 2 saat vakumlu jel kurutucuda kurutulularak, daimi olarak saklanabilecek hale getirildi.

2.4.5.2. Bakteriyal İzolatların Plazmid İçeriklerinin Belirlenmesi

İzolatların plazmid içerikleri Voskuil ve Chambliss'ın (47) geliştirdiği metoda göre yapıldı. 5-10 ml olarak her bir bakteriden hazırlanan gece kültürleri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve çökelek 200 ml SET tamponunda (%25 sakkaroz, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)) vortekslenerek çözüldü. Kullanılan SET tamponunun 1ml'sine 5 mg lizozim ilave edildi (5 mg/ml). Daha sonra, karışım mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Bunun üzerine 350 ml yeni hazırlanmış sodyum hidroksit-sodyum dodesil sülfat solüsyonundan (0.2 N NaOH, %1 SDS) ilave edildi. Süspansiyon şeffaf bir duruma kadar ters düz çevrildi ve bu şeffaf süspansiyona 350 ml soğuk 3 M K⁺-5 M asetat solüsyonundan ilave edildi. Süspansiyon, 16.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve alınan bu sıvı kısma, 650 ml soğuk fenol:kloroform:isoamilalkol (25:24:1) karışımından ilave edildi. Bir dakika vortekslenerek karıştırıldı. Karışım daha sonra 5 dakika mikrosantrifüjde santrifüj edildi. Üst faz alındı ve buna 620 ml soğuk kloroform:isoamilalkol karışımından ilave edildi. Otuz saniye vortekslenerek karıştırıldıktan, sonra karışım mikrosantrifüjde 3 dakika santrifüj edildi. 550 ml'lik üst faz pipetörle alınıp yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra, buna eşit miktarda soğuk (-20°C) isopropanol ilave edildi. Karışım ters düz çevrilerek tamamen

karıştırıldıktan sonra, 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısmı döküldü ve isopropanol açık havada uçurulduktan sonra çökelek kısmı %70'lik etanol ilave edilerek 2 dakika santrifüjlendi, kalan etanol açık havada uçurulduktan sonra 50 ml ddH₂O'da çözüldü.

Yapılan plazmid DNA'sı izolasyonu çalışması sonucunda, plazmid DNA'larının izole edilip edilmediğinin ortaya çıkarılması için 0.5 mg/ml etidium bromür içeren %0.7'lik agaroz jel hazırlandı. 5 µl DNA solüsyonu, 1 µl 10x yürütme boyası ve 4 µl ddH₂O veya TE (Tris-EDTA) tamponu ilavesi ile hazırlanan karışım agaroz jel üzerinde oluşturulan her bir kuyucuğa yüklenerek 100 voltluk elektrik alanda, fragment ağırlıkları belli olan bir şahit DNA ile yürütüldüler. Yürütme neticesinde, plazmid DNA'larının var olup olmadıkları ve moleküler ağırlıkları tespit edildi.

2.4.6. Fındık Kurduna Karşı Biyolojik Materyallerin İnsektisidal Etkilerinin Test Edilmesi

İlk olarak insektisidal etkileri test edilecek olan biyolojik materyallerin ve teste tabi tutulacak olan *B. nucum* larvalarının hazırlanması gerekmektedir.

2.4.6.1. İnsektisidal Aktiviteleri Test Edilecek Numunelerin Hazırlanışı

Hem *B. nucum*'dan izole edilen 5 bakteriyal izolat hem de literatürde mevcut olan çeşitli biyolojik materyaller aşağıda belirtilen şekillerde hazırlandılar.

2.4.6.1.1. Fındık Kurdundan Elde Edilen Bakteriyal İzolatların Bioassay İçin Hazırlanması

Deneyde kullanılan tüm izolatlar 10 ml nütrient broth besiyerinde 1 gece 30°C'de inkübe edildi. İnkübasyon neticesinde birkaç kez konsantre edilerek yoğunluğu OD₆₀₀'de 1.89'a (1.8×10^9 bakteri/ml) ayarlandı. Sonra 3.000xg'de 10 dakika santrifüj edilen hücrelerin oluşturdukları pellet 5 ml steril PBS'de çözüldü (48). Bu şekilde 1 ml'de 1.8×10^9 bakteri olması sağlandı.

2.4.6.1.2. *Bacillus thuringiensis*'e Ait *cryIV* Genlerini Taşıyan Rekombinant *Escherichia coli* Hücrelerinin Hazırlanması

Deneyde kullanılan rekombinant bakteriler için *E. coli* JM101 suşu kontrol olarak kullanıldı. *Bacillus thuringiensis*'in *cryIVA* (pHE4-A), *cryIVA* ve *cryIVD* (pHE4-AD), *cryIVA* ve 20-kDa-protein (pHE4-AR) ve *cryIVA*, *cryIVD* ve 20-kDa-protein (pHE4-ADR) genlerinin her birini içeren plazmidlerle transform olmuş *Escherichia coli* hücreleri ve *E. coli* JM101 suşu 10 ml nütrient broth besiyerinde 1 gece 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon neticesinde yoğunluğu OD₆₀₀'de 1.89'a ayarlandı. Sonra 2000xg'de 10 dakika santrifüj edilen hücrelerin oluşturdukları pellet 5 ml steril PBS'de çözüldü (48). Sonuç konsantrasyonu 1.8x10⁹ bakteri/ml'dir.

2.4.6.1.3. *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus'ün (AcNPV) Hazırlanması

Daimi hücre kültürlerinden olan Sf-IPLB-21 (*Spodoptera frugiperda*, Sf, 49) hücre suşu, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) ile enfekte olmuş Sf hücreleri için kontrol olarak kullanıldı. Hücreler %10 fetal bovine serum (FBS) katkılı TNMFH (50) besiyerinde, 28°C'de büyütülüp 5 gün aralıklarla, 1:5 oranında subkültür edildi. 5 günlük inkübasyon neticesinde iki flask birbirine karıştırılarak hemositometre ile sayısı belirlenen 3x10⁷/ml hücre 2000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek oluşan pellet 5 ml steril PBS'de çözüldü.

Enfeksiyonda kullanılan AcNPV stokları *in vitro* olarak duyarlı Sf hücrelerinde üretildi. Enfeksiyondan 4-5 gün sonra besiyeri-hücre süspansiyonu alınıp hücre kalıntılarının ve polyhedral inklüzyon yapılarının ayrılması için 2000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıdaki virüslerin konsantrasyonu "doku kültürü enfektif doz 50 (TCID₅₀)" deneyi kullanılarak belirlendi (51).

Bu stok virüsten (2x10⁷ p.f.u/ml) 1500 µl (3x10⁷ p.f.u/ml)'lik virüs süspansiyonu kullanılarak sayısı hemosimetre ile belirlenen 3x10⁷/ml Sf hücresi enfekte edildi (M.O.I.= 1). Enfeksiyondan 3 gün sonra (PIB'ler

görölmeye başladıktan sonra) hücreler 2000xg'de 10 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü ve pellet 5 ml steril PBS içinde çözüldü.

2.4.6.1.4. *Lymantria dispar* Nuclear Polyhedrozis Virus'ün (LdNPV) Hazırlanması

LdNPV virüsü stok olarak toprak içinde saklanmaktadır. 2 gr toprak 5 ml steril PBS içinde çözümlenerek numune hazırlandı.

2.4.6.1.5. *Bacillus thuringiensis*'in Çeşitli Suşlarına Ait Toksinlerin Hazırlanması

B. thuringiensis'e ait toksinler HD-1 ve BTS-1 suşlarından izole edilmiştir. Bunlardan 0.0005 g (100 µg/ml) alınıp 5 ml PBS'de çözüldüler.

2.4.6.2. Biyolojik Materyallerin Fındık Kurduna Karşı İnsektisidal Etkilerinin Test Edilmesi

Elde edilen larvalar bir süre 26±2°C'de ve %60 nem'deki iklim dolabında bekletildi. İlk olarak, fındığın taze yaprak, sürgün ve meyvelerinden eşit oranlarda kullanılarak bir besin hazırlandı. Daha sonra hazırlanan besinden 80 mm'lik cam kaplara 10'ar gr koyuldu. Bu kaplar özellikle mantar kontaminasyonuna karşı steril edildi. Fosfat tampon solusyonunda (PBS) hazırlanmış tüm örneklerden 1'er ml steril şırıngalar ile besinlerin üstüne iyice yayıldı. Her bir numune için 4. instar 10'ar adet larva kullanıldı. Sonra kaplar deney için 26±2°C'de ve %60 nem'deki bir iklim dolabına 12:12 ışık periyodunda bırakıldı. Larvaların ölüm oranı günlük olarak kontrol edildi ve ölü larvalar kaplardan uzaklaştırılarak kaydedildi (30). Tüm denemeler üç tekerrürlü olarak yapıldı.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, fındık kurdu (*Balaninus nucum*)'nun biyolojisi, bakteriyal florasının tayini, floranın kantitatif analizi, elde edilen bakteriyal izolatların herhangi birinin fındık kurdu için patojenik olup olmadığının araştırılması ve literatürde var olan bazı biyolojik ajanların insektisidal etkilerinin araştırılması yapılmıştır.

Temin edilen larva ve erginlerin hayatları incelenip, fotoğrafları çekildi. Bakteri izolasyonları, elde edilen süspansiyonun seyreltilip zenginleştirme kültürleri yapılmak suretiyle gerçekleştirildi. Çalışmada, bakteriyal izolatların tür tayinlerinin yapılması için çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testler uygulandı. Patojenik bir izolatın olup olmadığının belirlenebilmesi için ise 2 tekrarlı bioassay çalışmaları yapıldı. Ayrıca literatürde var olan 8 farklı biyolojik materyalin fındık kurdu üzerinde öldürücü etkisinin olup olmadığı araştırıldı.

3.1. Fındık Kurdu (*Balaninus nucum*)'nun Biyolojisi

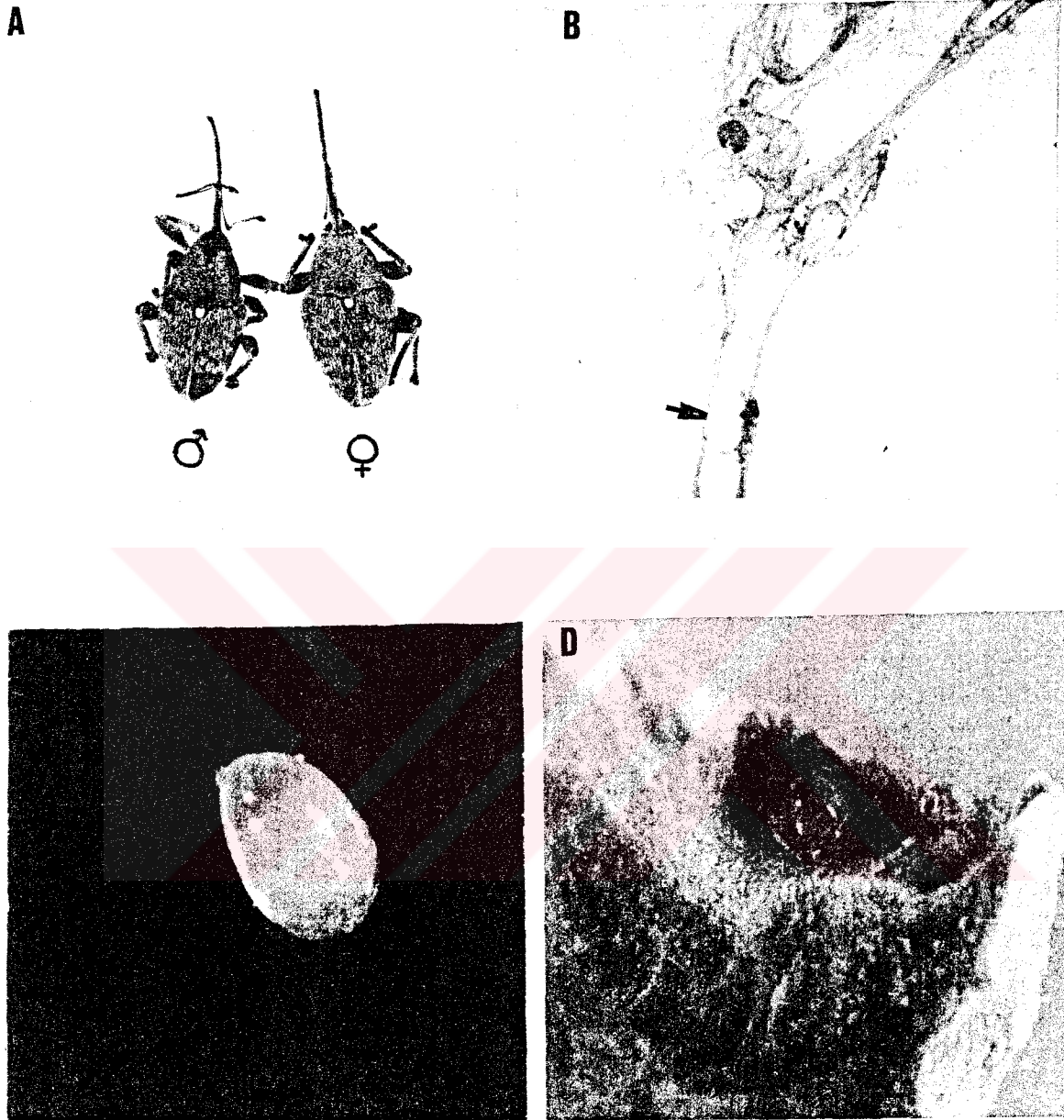
B. nucum erginlerinin genelde gri renkli, bazen de sarımsı veya açık kahverengi renkte olduğu gözlemlendi. Bu renk farkının beslenmeden kaynaklandığı tespit edildi. Laboratuvar şartlarında fındık ile beslenen erginlerin gri renkte olduğu, armut, döngel, erik ile besleninlerin ise sarımsı-açık kahverengi renkte olduğu görüldü. Stereo mikroskopla yapılan gözlemlerde sırt ve bacakların trişya'larla dolu olduğu, hortum ve bacakların ise kahverengi renkte olduğu belirlendi. Kafanın koni biçiminde, antenlerin dirsekli ve topuzlu, vücudun ise yumurta biçiminde olduğu tespit edildi. Ergin bir dişinin vücut boyu (hortum hariç) ortalaması $7\pm 0.8^*$ mm, hortum uzunluğu ortalaması 6 ± 0.4 mm, ergin bir erkeğin vücut boyu (hortum hariç) ortalaması 6 ± 0.4 mm, hortum uzunluğu ortalaması ise 3.8 ± 0.2 mm olarak belirlendi (Şekil 1A).

* Standart Sapma

İlk ergin çıkışının sıcaklığa bağlı olarak Mart ayının ortalarından itibaren başladığı ve Mayıs ayının başlarında zirveye ulaştığı gözlemlendi. Yaklaşık iki dönümlük araziden toplanan erginlerin iki generasyonunun sayımı neticesinde erkek ve dişi bireylerin miktarı sırasıyla 210/202 ve 330/324 adet olarak belirlendi. Buna göre cinsiyet oranı 1/1 olarak tespit edildi. Yapılan ölçümlerle dişi kanat uzunluğu ortalamasının 10 ± 0.8 mm, erkek kanat uzunluğu ortalamasının ise 9.5 ± 0.3 mm olduğu belirlendi.

Haziran'a kadar iyi bir şekilde beslenen böceklerin, bu dönemden sonra çiftleşip yumurtlamaya başladıkları gözlemlendi. Erginlerin 16°C 'nin altında fazla aktif olamadıkları için, aynı ocakta beslenmek zorunda kaldıkları ve sıcaklığın 16°C 'nin üstüne çıkmasıyla birlikte uzak mesafelere uçmaya başladıkları belirlendi. Yumurta bırakmaya başlayan erginlerin geç olgunlaşan fındık meyvelerinin olduğu ocaklara geçtikleri tespit edildi.

Haziran başından itibaren yapılan arazi ve laboratuvar çalışmalarında elde edilen yumurtalar fotoğraflandı ve ölçümleri yapıldı. Böcek hem yumurtlayıp, hem de bu arada çiftleşmektedir. Döllenen yumurtaları yumurtladıkça, yumurta kanalına yeni yumurtaların (ortalama 5-6) dolduğu belirlendi. Yumurtalar oval, oldukça şeffaf inci şeklindedirler. Yapılan diseksiyon çalışmalarında çiftleşme sonrası yumurtlamak üzere olan bir dişi böceğin yumurta koyma borusunda ortalama 5-6 yumurta sayıldı (Şekil 1B). Yumurtaların boy ve en ortalamaları sırasıyla 0.795 ± 0.14 mm ve 0.525 ± 0.11 mm'dir (Şekil 1C). Şekil 1D'de fındık içinde orjinal haliyle bir yumurta görülmektedir. Yapılan gözlemlerde, yumurtlama olgunluğuna ulaşmış dişinin önce hortumu vasıtasıyla fındık özüne zarar vermeyecek şekilde, kabuğun yüzeyinde yaklaşık 4-5 mm uzunluğunda bir oyuk açtığı ve daha sonra da yumurta koyma borusunu bu oyuca sokarak her olgun ve sağlam fındık başına tek bir yumurta olmak üzere yumurtladığı gözlemlendi. Bu işlemin 4-5 dakika kadar sürdüğü ve son olarak da yumurtayı hem kötü çevre şartlarına karşı korumak hemde fındık içinin zarar görmesini de engellemek amacıyla kapattığı belirlendi. Bu işlemden sonra, dişi böceğin, hemen vakit kaybetmeden çiftleşip bir başka fındığa yumurta koyduğu ve bu olayın, bir dişinin ortalama 40-45 yumurta koymasına kadar devam ettiği gözlemlendi.



Şekil 1. Fındık kurdu (*Balaninus nucum*)'nun; A) Erkek ve dişi ergin böceğin görünümü (15 x), B) Yumurta koyma borusu içindeki yumurtaları (15 x), C) Fındıktan çıkartılmış bir yumurtasının görünümü (100 x), D) Fındık içindeki bir yumurtasının görünümü (50 x)

Yumurtanın 8 günlük bir kuluçka döneminden sonra açıldığı ve larvanın 5-7 gün sonra meyve içine girerek fındık içiyle beslenmeye başladığı tespit edildi. Genç larvaların baş hariç, şeffaf görünümlü olduğu gözlemlendi.

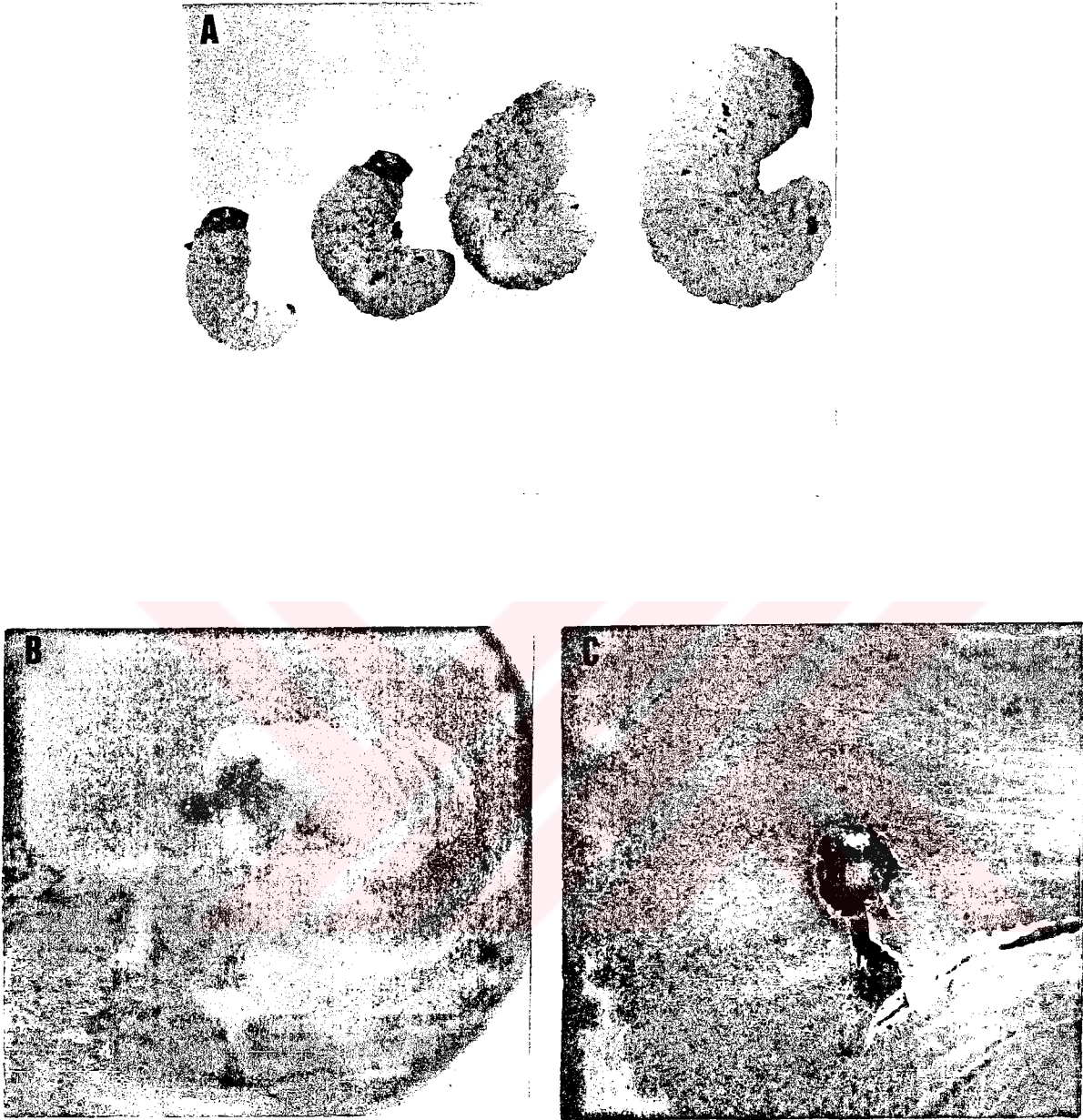
Yapılan gözlemlerde larvaların 4 döneme sahip olduğu belirlendi. Bu dönemler baş kapsül genişlikleri ölçülerek bulundu. Baş kapsül genişlikleri sırasıyla 512.5 ± 15 , 800 ± 8 , 1005 ± 10 ve 1295 ± 6 μm 'dir (Şekil 2A). Şekil 2B'de fındık içinde beslenen 3. dönemde bir larva görülmektedir.

Yaklaşık 29-30 gün beslenen larvanın kabukta bir delik (1.5-2 mm çapında) açarak fındıktan çıktığı ve toprağa girdiği gözlemlendi (Şekil 2C). Fındıkta 4 dönem geçiren larvanın, olgun halde kışı toprakta bir yuva içinde geçirdiği belirlendi.

Fındıktan çıkan larvaların kışı geçirmek üzere toprağa girmeleri hazırlanan toprak dolu saksılara larvaların girişi ile tespit edildi ve larvaların toprağın yapısına bağlı olmak üzere çeşitli derinliklere indikleri gözlemlendi. Toplandıkları alandan alınan toprak örneklerinde ortalama 25 cm'ye kadar indikleri belirlenen larvaların toprak içinde kışı geçirdikleri yuva fotoğraflandı (Şekil 3A).

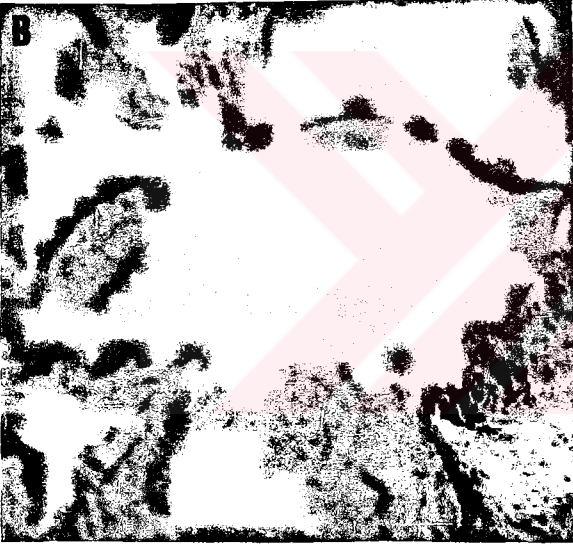
Yapılan çalışmalarda, embriyo gelişimini tamamlayarak yumurtalardan çıkan 1-2 günlük larvaların, gözle zor farkedilecek kadar küçük olduğu ve vücut renginin beyaz, baş kısmının ise kahverengi olduğu, zamana bağlı olarak larvaların tombullaşp renklerinin beyazdan giderek açık sarımsı bir renge dönüştüğü gözlemlendi.

Beslenme ve yumurta bırakma yolu ile meyvelerde zararlı olan ergin böceğin, fındık meyve kabuğunu, hortumunun ucundaki dişlerle kemirerek deldiği ve kabuk içindeki etli kısımla beslendiği gözlemlendi. Normal iriliğe ulaşp kabuk sertleşinceye kadar böcek zararının oluştuğu meyvelerde, meyve içinin bozularak sarı bir renk aldığı tespit edildi. Sonunda bu renk, kabuk üzerinde de belirmeye başladı. Beslenemeyen meyve kabuğu üzerinde "sarıkaramuk" olarak bilinen zarar şeklinin oluştuğu belirlendi (Şekil 3B). Meyve normal iriliğe eriştikten sonra zarar gördüğünde içinin karardığı, kabukta oluşan çatlaklardan dışarı sızan siyah bir sıvının, zuluf (koçan) ve kabuğu kirlettiği gözlemlendi (Şekil 3C). Bu zarar şekline de "karakaramuk" denilmektedir.



Şekil 2. Fındık kurdu (*Balaninus nucum*)'nun; A) Dört instarının genel görünümü (Sırasıyla 1, 2, 3 ve 4. instar, 15 x), B) Fındık içinde beslenmekte olan 3. instar bir larvası (15 x), C) Dört instarlık gelişimini tamamlayan olgun larvanın toprağa girmek için fındık meyvasında açtığı delik (15 x)

A



Şekil 3. Fındık kurdu (*Balaninus nucum*)'nun; A) Larvanın toprakta kışı geçirdiği yuva, B) Sarıkaramuk adı verilen zarar şekli, C) Karakaramuk adı verilen zarar şekli

3.2. Fındık Kurdunun Bakteriyal Florası

3.2.1. Ergin ve Larvaların Bakteriyal Florasının Kantitatif Analizi

İnkübasyon neticesinde 25-250 arası koloni oluşan petrilere sayım yapılarak larva ve erginlerin toplam bakteri sayıları belirlendi. Ergin ve larvaların birey başına düşen toplam bakteri sayısı (1.41×10^{11} bakteri/ergin ve 1.8×10^9 bakteri/larva) tespit edildi.

3.2.2. Bakteriyal İzolatların Elde Edilmesi

İnkübasyon sonucunda mevcut olan farklı bakteriler koloni özelliklerine göre alınarak çizgi ekim yöntemi ile saf kültürleri elde edildi. Toplam 15 izolattan morfolojik ve kültürel karakterleri aynı olanlar inceleme dışı bırakılarak içlerinden farklı özelliklere sahip olan 5 izolat diğer testlere tabi tutulmak üzere alındı ve 1'den 5'e kadar numaralanan bu izolatların çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler karakterleri belirlendi.

3.2.3. Bakteriyal İzolatların Morfolojik ve Büyüme Özellikleri

İzolatların çeşitli morfolojik ve büyüme özellikleri Çizelge 7'de görülmektedir.

Basit boyamalar neticesinde 3 numaralı izolat hariç diğerlerinin basil morfolojisine sahip, tek veya uzun zincirler oluşturan basiller oldukları görüldü. Gram boyamaları sonucunda ise izolatlardan, 1 ve 3 numaralı izolatların mor renge boyanmaları dolayısı ile gram olumlu (Gram +), 2, 4 ve 5 numaralı izolatların ise pembe renge boyanmalarından dolayı gram olumsuz (Gram -) oldukları belirlendi. Spor boyamalar neticesinde, sadece 1 nolu izolatin endospora sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4). Bu gözlemlerde safraninle boyanan hücrelerin pembe, malaşit yeşili ile boyanan sporların ise yeşil renkte oldukları görüldü. Sporların terminal spor (hücrenin bir kenarına yaslanmış) oldukları gözlemlendi. Yapılan kapsül boyama neticesinde de yine sadece 1 nolu izolatin, CuSO_4 'ın çevreyi maviye kristal viyoleninde hücreyi mor

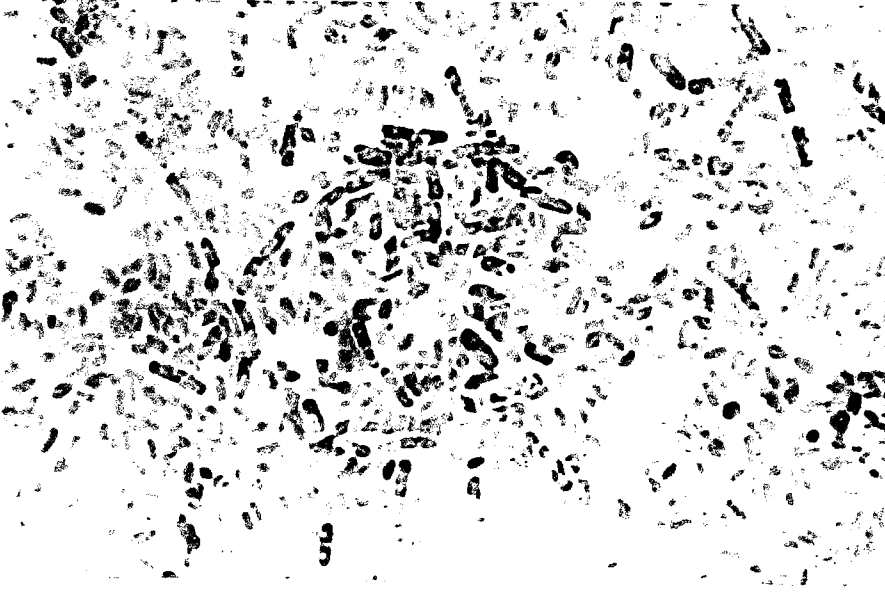
renge boyaması neticesinde boyanmamış, şeffaf bir bölge olarak görülen kapsül yapısına sahip olduğu, diğer izolatların böyle bir yapıya sahip olmadıkları görüldü (Şekil 5). Hareket testi sonucunda izolatlardan sadece 3 nolu olanının hareketsiz olduğu, diğer tüm izolatların ise hareket edebilme özelliğine sahip olduğu görüldü.

İzolatların atmosferik oksijene olan ihtiyaçları incelendiğinde, 1, 2, 4 ve 5 numaralı izolatların hepsinin anaerobik şartlarda üreyebildikleri, 3 numaralı izolatın ise anaerobik şartlarda üreyemediği gözlemlendi.

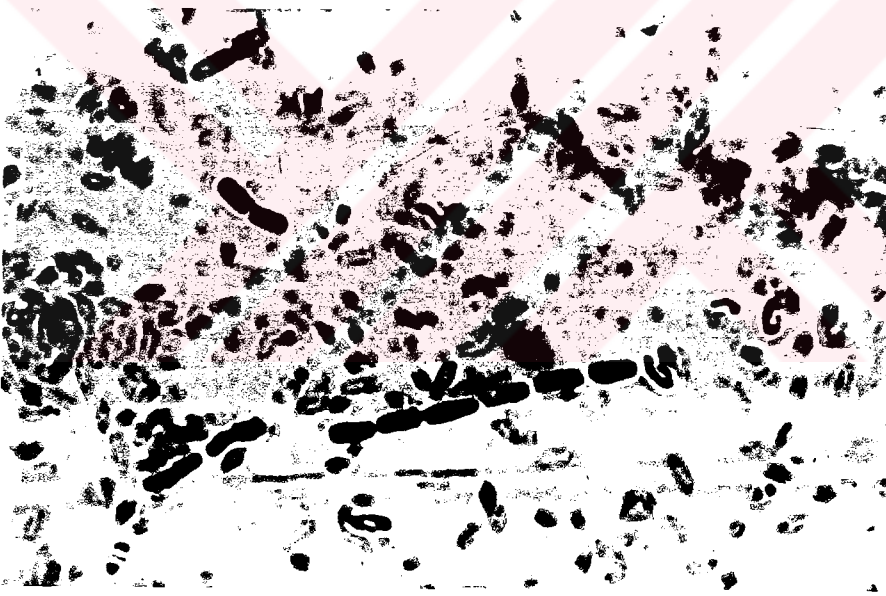
Çizelge 7. *Balaninus nucum*'dan elde edilen bakteriyal izolatların morfolojik ve büyüme özellikleri

İzolat No	1	2	3	4	5
Petrideki koloni rengi ve görünüşü	Krem, saçaklı, yuvarlak	Krem, düzgün, yuvarlak	Sarı, papatya, yuvarlak	Kırmızı, düzgün, yuvarlak	Krem, dalgalı, yuvarlak
İzolatların O ₂ ihtiyaçları	Fakültatif anaerobik	Fakültatif anaerobik	Aerobik	Fakültatif anaerobik	Fakültatif anaerobik
Gram boyama	+	-	+	-	-
Kapsül boyama	+	-	-	-	-
Spor boyama	+	-	-	-	-
Spor şekli	Elipsoid	ND	ND	ND	ND
Spor formu	Terminal	ND	ND	ND	ND
İzolatın Çapı (μm)	ND	ND	0.9-1.2	ND	ND
İzolatın Boyu (μm)	4-6	1.3-3.2	ND	1-1.5	2-4
İzolatın Eni (μm)	0.8-1	0.5-1	ND	0.6-0.8	0.6-1.1
Hareket	+	+	-	+	+

ND: Belirlenmedi



Şekil 4.1 numaralı izolatin oluşturduğu sporların görünümü



Şekil 5.1 numaralı izolatin oluşturduğu kapsülün görünümü

3.2.4. Bakteriyal İzolatların Fizyolojik Özellikleri

İzolatların fizyolojik özellikleri Çizelge 8'de görülmektedir. Mikroorganizmaların büyümesi üzerine etkili faktörlerden olan sıcaklık, pH, NaCl'e karşı tolerans ve atmosferik oksijen ihtiyaçları gibi fiziksel

etkilerin araştırılması amacıyla testler yapıldı. Yapılan testler sonucunda tüm izolatların optimum olarak 30°C'de büyüebildiği belirlendi.

Çizelge 8. *Balaninus nucum*'dan elde edilen bakteriyal izolatların fizyolojik özellikleri

İzolat No	1	2	3	4	5
%1 NaCl'de büy.	+	+	+	+	+
%2 NaCl'de büy.	+	+	+	+	+
%5 NaCl'de büy.	+	+	+	+	+
%7 NaCl'de büy.	-	+	+	-	+
%12 NaCl'de büy.	ND	+	+	-	ND
%20 NaCl'de büy.	ND	ND	+	ND	ND
Lizozimde büy.	+	+	-	+	+
28°C'de büy.	+	+	+	+	+
30°C'de büy.	+	+	+	+	+
37°C'de büy.	+	+	+	+	+
pH>7 MVRP broth'ta büy.	+	ND	ND	ND	ND
pH<6 MVRP broth'ta büy.	W	ND	ND	ND	ND
Optimum pH.	6-8	6-8	7-8	8-9	7-8
Optimum ısı (°C)	30	30	30	30	30
+4°C'de büy.	ND	+	ND	+	ND
+41°C'de büy.	ND	-	ND	-	ND
Anaerobik büy.	+	+	-	+	+

W: Zayıf büyüme; ND: Belirlenmedi

Çizelge 8'den de görüldüğü gibi, 1 ve 2 numaralı izolatlar optimum olarak pH 6-8 arası olan besiyerlerde büyüyebilirken, 3 ve 5 numaralı izolatlar 7-8 arası pH'lı besiyerlerde ve 4 numaralı izolat ise 8-9 arası pH'lı besiyerde optimum olarak büyüyebilmektedirler.

İzolatların belli oranlarda NaCl içeren besiyerlerinde büyüyebilme özelliklerinin, yani NaCl'e karşı tolerans sınırının araştırılması sonucunda 1 ve 4 nolu izolatların %7'ye kadar NaCl'e tolerans gösterdiği, 2 numaralı izolatın %11'e kadar NaCl içeren besiyerlerde üreyebildiği, 3 numaralı izolatın %20'ye kadar tolerans gösterdiği ve 5 numaralı izolatın ise %8'e kadar toleranslı olduğu gözlemlendi.

İzolatların 10 mg/ml lizozim ihtiva eden besiyerdeki üreme özelliği incelendi ve sonuçta sadece 3 numaralı izolatın bu besiyeride üreyemediği, 1, 2, 4 ve 5 numaralı izolatların ise büyüebildiği gözlemlendi.

3.2.5. Bakteriyal İzolatların Biyokimyasal Özellikleri

İzolatların biyokimyasal özellikleri Çizelge 9'da görülmektedir. Bakteri tür tayininde kullanılan kriterlerden birisi de bazı organik maddeleri hidroliz etme özellikleridir. Çizelge 9'dan da görüldüğü gibi yapılan testler sonucunda 1, 2, 3 ve 4 numaralı izolatlar jelatini hidroliz ederken 5 numaralı izolatın jelatini hidroliz etmediği gözlemlendi. Nişastayı ve üreyi sadece 1 nolu izolat hidroliz ederken diğer tüm izolatların bu iki maddeyi hidroliz etmedikleri belirlendi.

İzolatların bazı enzim ve kimyasal maddeleri üretilip üretilmediği incelendi. Burada da görüldüğü gibi, 1, 2, 3, 4 ve 5 numaralı izolatların hepsinin katalaz enzimini ürettikleri, oksidaz enzimini ise 5 numaralı izolatın dışındaki tüm izolatların ürettiği ortaya çıkarıldı.

İzolatlardan 1, 3 ve 5 numaralı izolatların hiçbirisinin sitratı kullanmadığı, 1 ve 4 numaralı izolatların ise propionatı kullanmadığı, propionatı sadece 2 numaralı izolatın kullandığı, nitratı ise 3 numaralı izolatın dışındaki tüm izolatların indirgeme özelliğine sahip olduğu gözlemlendi.

Bakterilerin karbohidratları fermente etme özellikleri de test edildi. Yapılan deneyler sonucunda 1, 2, 4 ve 5 numaralı izolatların hepsinin glukozu ve mannozu, 2 ve 5 numaralı izolatların arabinozu, 2, 4 ve 5 numaralı izolatların ksilozu fermente ettikleri, 5 numaralı izolat hariç tüm izolatlar sukrozu fermente ederken, 1, 2 ve 4 numaralı izolatların esculini fermente ettikleri tesbit edildi.

Çizelge 9. *Balaninus nucum*'dan elde edilen bakteriyal izolatların bazı biyokimyasal özellikleri

İzolat No	1	2	3	4	5
Nitrat ind. testi	+	+	-	+	+
Katalaz testi	+	+	+	+	+
Nişasta testi	+	-	-	-	-
Oksidaz testi	+	+	+	+	-
Jelatin hidrolizi	+	+	+	+	-
Üre hidrolizi	+	-	-	-	-
Sitrat kullanımı	-	+	-	+	-
Propionat kul.	-	+	ND	-	ND
İndol testi	-	-	-	-	+
Metil red testi	-	-	-	-	+
Voges pro. testi	+	+	-	+	-
L-Arginin kul.	+	+	+	+	-
Tween 80 hid.	W	+	-	+	-
Tirozinaz üretimi	-	ND	ND	ND	ND
Fenil Alanin hid.	-	ND	-	ND	+
D-Glukoz fer.	+	+	-	+	+
L-Arabinoz fer.	-	+	-	-	+
D-Ksiloz fer.	-	+	-	+	+
D-Mannoz fer.	+	+	W+	+	+
Sukroz fer.	W+	+	+	+	-
Esculin fer.	+	+	-	+	-

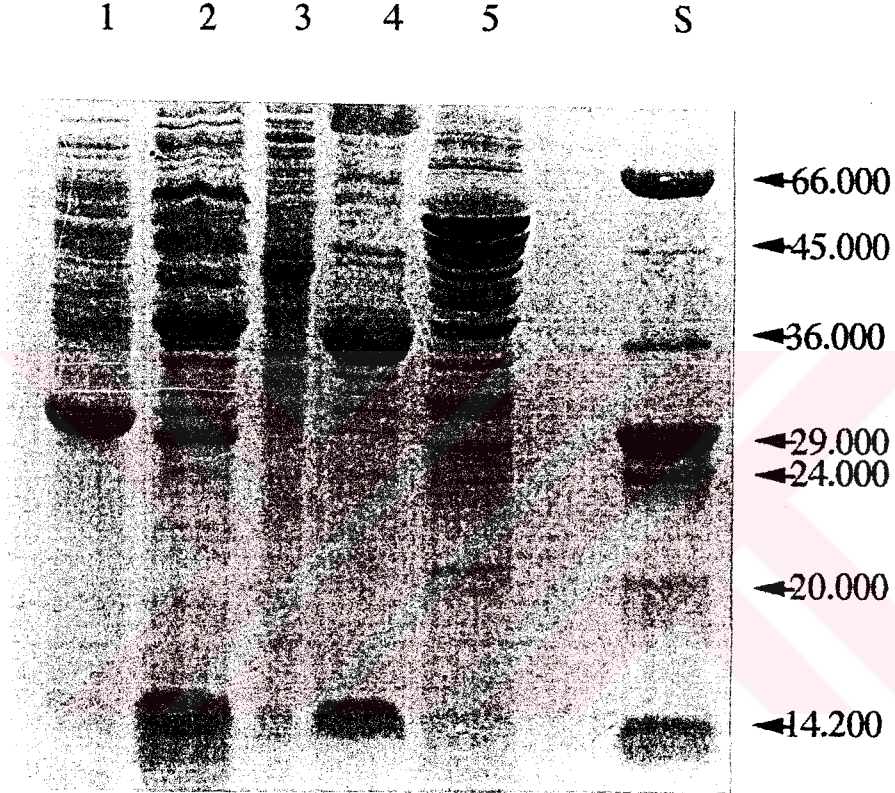
W: Zayıf büyüme; ND: Belirlenmedi

3.2.6. Bakteriyal İzolatların Moleküler Özellikleri

3.2.6.1. Bakteriyal İzolatların Toplam Protein Profili

Elde edilen 5 izolattan izole edilen çözünebilir proteinler, her kuyuya 50 µg olacak şekilde %12 SDS-PAGE jeline yüklendi. 15 mA'lık elektrik akımında proteinlerin yürütülmesi sonucunda Şekil 6'da da görüldüğü gibi izolatların tamamen farklı protein bantlarına sahip oldukları görüldü. 1, 3 ve 5 nolu izolatlar birbirlerinden yaklaşık %90-100'lük oranda farklı protein bantlarına sahipken, 2 ve 4 nolu izolatların protein bantlarının yaklaşık %80 oranında bir fark gösterdiği

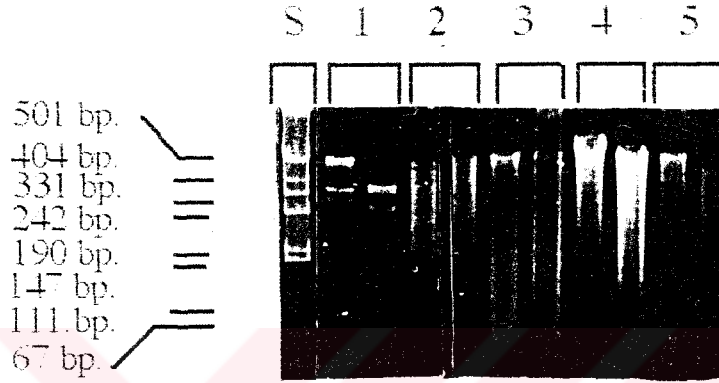
belirlendi. Aynı zamanda 2 ve 4 nolu izolatların diğer izolatlarla yine yaklaşık %90-100'lük bir oranda farklı bantlara sahip olduğu gözlemlendi.



Şekil 6. *B. nucum*' dan elde edilen izolatların toplam proteinlerinin %12'lik SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmesi. Rakamlar izolat numaralarını, S ise ağırlığı bilinen protein standartlarını göstermektedir

3.2.6.2. Bakteriyal İzolatların Plazmid İçerikleri

Plazmid DNA'sı izolasyonu sonucunda sadece 1 nolu izolatın bir plazmide sahip olduğu Şekil 7'de gösterilmektedir. Bu plazmidin *KpnI* restriksiyon enzimi ile kesildiği zaman yaklaşık 340, 370, 480 ve 500 bp.'lik 4 bant ve *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesildiğinde ise 220, 242, 320, 390 ve 400 bp.'lik 5 banttan oluştuğu tespit edildi.



Şekil 7. İzolatların plazmid içeriklerinin %0.7'lik agaroz jeldeki görüntüleri. Rakamlar; izolat numaralarını, S; moleküler ağırlıkları bilinen standart DNA fragmentlerini göstermektedir. Not: Her bir izolat için ilk sütun *KpnI* ikinci sütun ise *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesimi neticesinde oluşan bantları göstermektedir

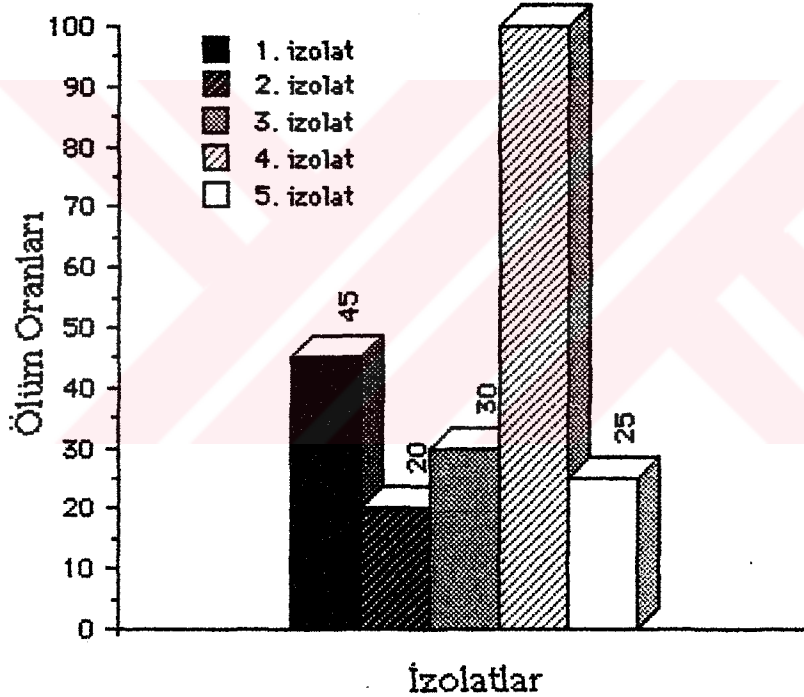
3.3. Bakteriyal İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada denenen izolatların *B. nucum* larvaları üzerindeki etkisi Çizelge 10 ve Şekil 8'de gösterilmiştir.

Çizelge 10. Elde edilen izolatların fındık kurdu larvaları üzerinde oluşturdukları ölüm oranları

Numuneler	I.gün	II.gün	III.gün	Toplam
Kontrol (PBS)	-	-	-	-
1 nolu izolat	-	5	40	45
2 nolu izolat	-	-	20	20
3 nolu izolat	-	-	30	30
4 nolu izolat	-	40	60	100
5 nolu izolat	-	-	25	25

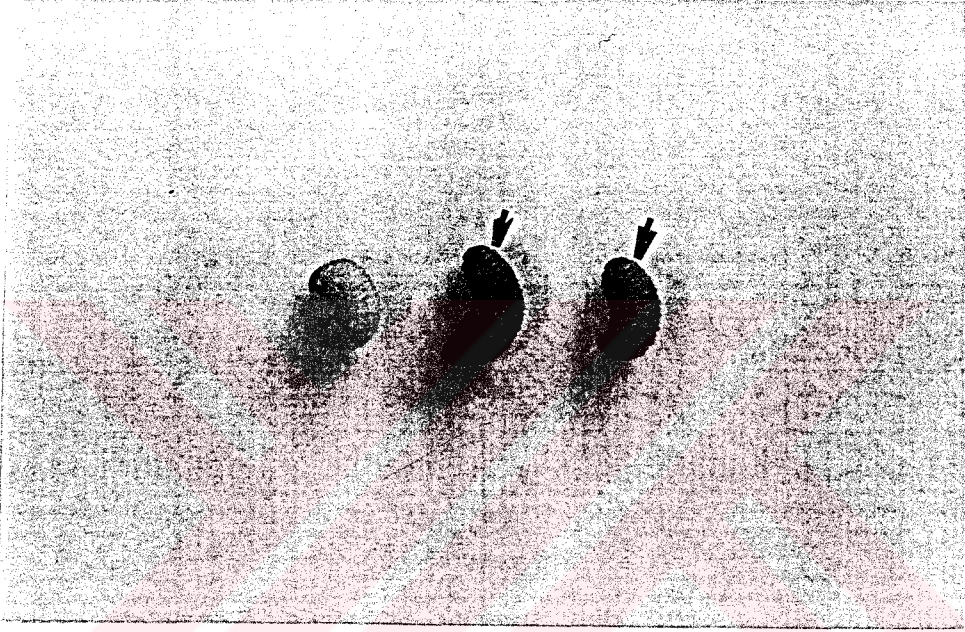
NOT: Çizelgedeki değerler 2 deneyin ortalamaları alınarak hesaplanmıştır



Şekil 8. Denenen bakteriyal izolatların *B. nuceum* larvaları üzerinde oluşturduğu ölüm oranları

İki tekerrürlü olarak yapılan bioassay denemelerinde larvalar 7 gün boyunca takip edildi. Denemelerimizde esas ölüm 3 günlük sürede meydana geldiği için hesaplamalarda bu süre dikkate alındı. Sonuçta, 4 nolu izolatın *B. nuceum* popülasyonu üzerinde 3 günlük sürede %100'lük

bir ölüm meydana getirdiği tespit edildi. Aynı sürede 1 nolu izolatomuzun %45, 2 nolu izolatomun %20, 3 nolu izolatomun %30 ve 5 nolu izolatomun ise %25 oranında bir ölüm oluşturduğu belirlendi. %100'lük bir ölüm oranı oluşturan 4 nolu izolatomun 3 günlük sürede normalde beyaz-krem renkli olan larvanın rengini kendi rengi olan kırmızıya dönüştürdüğü gözlemlendi. Şekil 9'da enfekte olmamış larva ile 4 nolu bakteriyal izolat ile enfekte olmuş larva arasındaki bu renk farkı açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 9. Normal larva ve 4 numaralı bakteriyal izolat ile enfekte olmuş larvanın görünüşleri (Oklar enfekte olmuş larvaları göstermektedir)

3.4. Çeşitli Biyolojik Ajanların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada denenen ajanların *B. nucum* larvaları üzerindeki etkisi Çizelge 11 ve Şekil 10'da gösterilmiştir.

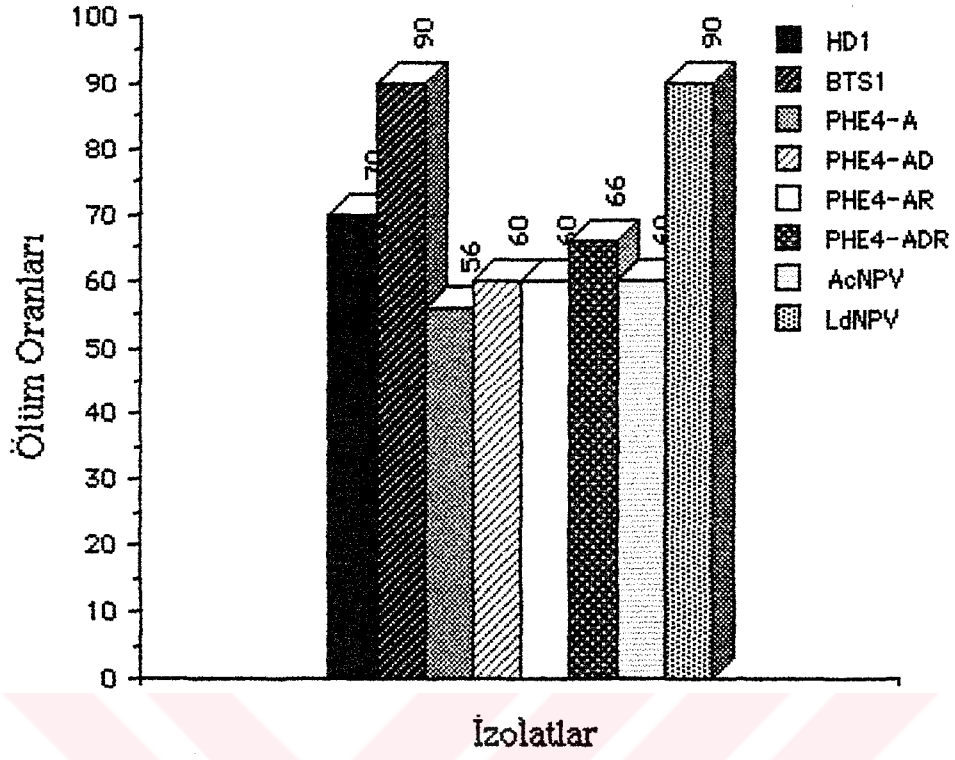
Yedi günlük 3 tekrarlı denemelerde esas ölüm ilk üç günde meydana geldiği için hesaplamalarda bu üç gün dikkate alındı. Kontrollerde ise 10-12 güne kadar larvalar sağlıklı bir şekilde hayatlarını devam ettirdiler.

Tüm denemelerde en etkili numuneler olan BTS-1 toksini ve LdNPV virüsü larvalar üzerinde 3 günlük sürede %90'lık bir ölüm oluşturdu. PHE4-A, PHE4-AD, PHE4-AR, PHE4-ADR, AcNPV ve HD-1 değişik oranlarda etkili oldular (Çizelge 11). Transform olmuş *E. coli*'ler sahip oldukları *B. thuringiensis* genleriyle ilişkili olarak sırasıyla PHE4-A %56, PHE4-AD %60, PHE4-AR %60 ve PHE4-ADR %66 oranında etki gösterdi. HD1 toksini %70'lik bir etki gösterirken AcNPV ise %60'lık bir etki gösterdi.

Kontrol olarak kullanılan PBS, *E. coli JM101* ve Sf arasında en fazla ölüm oranı %30 ile *E. coli JM101*'de olurken, PBS ve Sf kontrollerinde %10'luk bir ölüm meydana geldi. Hiçbir numunenin uygulanmadığı sadece besinin konulduğu kaplarda ise %3.3'lük bir ölüm meydana geldiği tespit edildi.

Çizelge 11. *B. nucum* larvaları üzerinde denenen numunelerin oluşturdukları ölüm oranları (Kontrol gruplarında meydana gelen ölüm oranları aşağıdaki oranlardan çıkartılmıştır)

Numuneler	I.gün	II.gün	III.gün	Toplam
HD-1	-	40	30	70
BTS-1	-	70	20	90
PHE4-A	10	36	10	56
PHE4-AD	-	56	4	60
PHE4-AR	3.3	50	6.6	59.9
PHE4-ADR	-	50	16	66
AcNPV	-	10	50	60
LdNPV	-	30	60	90



Şekil 10. Denenen ajanların *B. nuceum* larvaları üzerinde oluşturduğu ölüm oranları

4. TARTIŞMA

Son yıllarda, zararlılar ile geniş çapta yapılan kimyasal mücadelenin bir sonucu olarak çevrenin aşırı şekilde kirlenmesi ve hatta insanlara kadar ulaşması, araştırmaları biyolojik ajanların geliştirilmesi konusuna itmiştir. Özellikle 1950'li yıllardan sonra tüm dünyada biyolojik ajanların geliştirilmesi çok büyük hız kazanmıştır (52).

Araştırmanın ilk kısmını oluşturan *B. nucum*'un biyolojisi ile ilgili daha önce Türkiye'de ve Avrupa'da çeşitli çalışmalar yürütülmüştür (4, 6, 8). Şu ana kadar yapılan çalışmalarda böceğin yumurtasının resmi, yumurta boyutları, larva baş kapsül çapları, kanat uzunlukları, hortum uzunlukları gibi veriler yer almamaktadır. Ural (4) 1957'de yaptığı çeşitli çalışmalarda böceğin 4 larval döneme sahip olduğunu belirtmiştir, fakat bu dönemlerin birbirlerinden nasıl ayırt edilebileceği hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada ise böceğin dört larval döneme sahip olduğu larvaların baş kapsül çapları ölçülerek tespit edildi (53) ve her larval dönem için uygun değerler bulundu. Buna göre *B. nucum* larvalarının 1. instarının baş kapsül çapı $512.5 \pm 15 \mu\text{m}$, 2. instarının $800 \pm 8 \mu\text{m}$, 3. instarının $1005 \pm 10 \mu\text{m}$ ve 4. instarının $1295 \pm 6 \mu\text{m}$ olarak belirlendi.

Fındık kurdunun ergin dişi ve erkek bireyleri morfolojik olarak hortum uzunluklarının ve vücut uzunluklarının farklı olması ile ayırt edilir. Dişiler erkeklerden daha uzun bir hortuma sahip olmakla birlikte, aynı zamanda hortum uzunluğu vücut uzunluğuna da çok yakındır. Ayrıca erkek böceğin hortumu daha kısa ve dişininki kadar kıvrık değildir.

Ergin bireyler arasındaki renk farkının beslenmeden kaynaklandığı, laboratuvar şartlarında elma ve armutla beslenen erginlerin kirli sarı ve açık kahverengi, fındıkla beslenenlerin ise gri renkte oldukları belirlendi.

Kışı toprakta geçirerek Mart ortalarında çıkmaya başlayan böceğin sayısının kışın soğuk ve karlı geçmesinden dolayı arttığı sanılmaktadır. Toprakta çıktuktan sonra Haziran'a kadar beslenen böceklerin bu aydan itibaren yumurtlamaya başladığı belirlendi. Böceğin, yumurta bırakırken fındık danesinin kalitesini oldukça titizlikle seçtiği gözlemlendi.

Laboratuvarda 3-4 günlük kurumamış, fakat koçanı (zuluf) hafifçe buruşmuş fındıklara böceğin yumurta bırakmadığı tespit edildi. Yumurtanın fındık içerisindeki kuluçka döneminden sonra, yumurtadan çıkan larvaların tüm larval dönemler süresince boy uzunlukları hariç, morfolojik olarak herhangi bir ayırt edici özelliklerinin olmadığı belirlendi. Yani 4 dönem boyunca da larvanın tamamen beyaz-sarımsı renkte olduğu gözlemlendi.

Çalışmanın ikinci kısmını oluşturan *B. nucum*'un bakteriyel florasının belirlenmesi ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bakteriyel floranın belirlenmesindeki tür tayinlerinde büyüme özellikleri ve morfolojik özelliklerine bakılarak elimine edilen izolatlardan seçilen 5 izolat fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testler sonucunda farklı birer cinse dahil edildiler.

İzolatlardan biri fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testlerin yanı sıra gram (+), endosporlu, fakültatif anaerobik, basil ve hareketli olduğundan *Bacillus* cinsine; ikincisi gram (-), sporsuz, "Pseudomonas Isolation Agar" (PIA)'da büyüdüğü, aerobik, basil ve hareketli olduğu için *Pseudomonas* cinsine (bu cins içinde fakültatif anaerobik türlerin mevcut olduğu bilinmektedir); üçüncüsü gram (+), sporsuz, aerobik, kok, hareketsiz ve sarı pigment ürettiği için *Micrococcus* cinsine; dördüncüsü gram (-), sporsuz, fakültatif anaerobik, basil, hareketli ve kırmızı pigment ürettiği için *Serratia* cinsine ve sonuncusu ise gram (-), sporsuz, fakültatif anaerobik, basil ve hareketli olduğundan *Escherichia* cinsine dahil edildiler.

Yapılan büyüme, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testleri desteklemek amacıyla bu çalışmada elde edilen izolatların içerdiği total proteinlerin profili çıkarıldı. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sonucunda, izolatların protein profilleri incelendiğinde, izolatlar arasındaki fark protein bantlarında da görülmektedir. Cato ve ark. (54) tarafından 70 adet *Clostridium* türünün suşları arasında suda çözünebilir proteinlerinin elektroforetik olarak karşılaştırılmasını baz alan bir araştırma yapılmış ve araştırmanın sonucunda %80 DNA-DNA homolojisi gösteren suşların aynı tip protein bantlarına, %70 DNA-DNA homolojisi olan suşların protein bantlarında ise küçük farklılıkların olduğu ortaya çıkarılırken farklı türlerin birbirinden farklı protein bantlarına sahip oldukları görülmüştür. Bu

çalışmada 1, 3 ve 5 nolu izolatların yaklaşık %90-100'lük oranda farklı protein bantlarına sahip olduğu, 2 ve 4 nolu izolatların ise yaklaşık %80 oranda farklı protein bantlarına sahip olduğu tespit edildi. Aynı zamanda 2 ve 4 nolu izolatlar diğer izolatlarla karşılaştırıldığında yine yaklaşık %90-100'lük bir oranda farklı protein bantlarına sahip oldukları gözlemlendi. İzolatların hepsi farklı protein profillerine sahip olduklarından DNA-DNA homolojilerinin %70'den az oldukları sanılmaktadır. Bu yüzden, bu izolatların farklı türler oldukları düşünülmektedir.

Bakteriyal flora çalışmasında olduğu gibi, *B. nukum*'a karşı bir biyolojik ajanın tespiti konusunda da literatürde herhangi bir bilgi bulunmamıştır. Ancak diğer zararlılara karşı yapılan çalışmalarla ilgili pekçok bilgi literatürde mevcuttur. 1985'de Mitchell ve ark. (55) *Hemileuca maria* adlı güveden izole ettikleri bir nuclear polyhedrosis virus'ün yine aynı larva üzerindeki patojenitesine bakmışlar ve virüsün öldürücü bir etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Aynı şekilde bu çalışmada denenen *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus'ün (AcNPV) *B. nukum* larvaları üzerinde %60'lık bir ölüm etkisi gösterdiği tespit edildi. Martens ve ark.'nın (49) 1990 yılında yaptıkları bir çalışmada AcNPV'nin rekombinant bir suşuyla (*B. thuringiensis*'e ait *cryIA* (b) genini ihtiva eden fragmenti içeren suş) enfekte ettikleri *Spodoptera frugiperda* hücrelerini *Pierris brassicae* larvaları üzerinde denemeleri sonucu rekombinant virüsün ürettiği toksin maddenin etkili olduğunu bulmuşlardır. Yine bu çalışmada çeşitli biyolojik ajanların *B. nukum* üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde en etkili numuneler olan BTS-1 toksini ve *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus'ü larvalar üzerinde 3 günlük sürede %90'lık bir ölüm oluşturdu. Lipa ve ark. (56) *Ocnogyna baetica*'dan izole ettikleri Entomopoxvirus B'nin *O. baetica* larvaları üzerinde %95, *Agrotis segetum* üzerinde %10, *Spodoptera littoralis* üzerinde ise %15'lik bir ölüm oluşturduğunu tespit etmişler. Boucias ve ark. (57) bir İridovirüs'ün *Scapteriscus vicinus* (Güney Amerika dana burnu) nimfleri üzerinde yaklaşık %50'den daha çok enfeksiyon oluşturduğunu bulmuşlar. Mitchell ve Smith (58) yaptıkları bir çalışmada bir Entomopoxvirüs'ün *Elasmopalpus lignosellus*'un (küçük mısır sapı kurdu) tüm dönem larvaları üzerinde değişen oranlarda etkili olduğunu bulmuşlardır. Moar ve ark. (59) yaptıkları bir çalışmada *Elasmopalpus lignosellus*'un (küçük mısır sapı kurdu) larvaları üzerinde *B. thuringiensis* HD-1 suşundan izole edilmiş HD-1 toksininin 4.83

mg/100 g'nın %50'lik bir ölüm oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise aynı toksinin (100 µg/ml) *B. nucum* larvaları üzerinde %70'lik bir etkisi belirlendi. Bu sonuçlardan, farklı türlerin bu toksin'e karşı farklı oranlarda dirençlilik gösterdikleri anlaşılmaktadır.

Eitan Ben-Dov ve ark.'nın (48) sivrisinek larvaları üzerinde yaptıkları çalışmada, *B. thuringiensis*'e ait bazı genleri taşıyan *E. coli* hücrelerinin ihtiva ettikleri gene göre farklı oranlarda ölüme sebep oldukları tespit edilmiştir. *Bacillus thuringiensis*'e ait *cryIVA* genine sahip plazmid (pHE4-A), *cryIVA* ve *cryIVD* genlerine sahip plazmid (pHE4-AD), *cryIVA* geni ve 20-kDa-proteine sahip plazmid (pHE4-AR) ve *cryIVA*, *cryIVD* genlerine ve 20-kDa-proteine sahip plazmid (pHE4-ADR) ile transform olmuş *Escherichia coli* hücrelerinin sırasıyla %55, 95, 50 ve 90 oranlarında ölüm meydana getirdiklerini tespit etmişler. Buna göre, bizim sonuçlarımızın (PHE4-A %56, PHE4-AD %60, PHE4-AR %60 ve PHE4-ADR) farklı olmasının sebebi, şu ana kadar yapılan gözlemlere göre (60) çeşitli *Bacillus* suşlarının değişik böcek türlerindeki etkilerinin farklılığından kaynaklanmaktadır.

Elde edilen bakteriyal izolatların denenmesinde ise, bir hafta takip edilen deney süresi sonunda *B. nucum* için patojenik olan *Serratia sp.*'nin *B. nucum* larvaları üzerinde %100'lük bir ölüm meydana getirdiği gözlemlendi. Şekil 10'da da görüldüğü gibi normalde beyaz-krem renkli olan larva enfeksiyon sonucunda bakterinin kendi rengi olan kırmızı renge dönüşmektedir. Bu, izolatın larvalar üzerinde çok ağır bir enfeksiyon oluşturduğunu göstermektedir. *B. nucum* üzerinde %100'lük insektisidal etkiye sahip olan bu izolatın yapılan testler sonucunda *S. marcescens* olduğu belirlendi. Denemede diğer 1, 2, 3 ve 5 nolu izolatların ise sırasıyla %45, 20, 30 ve 25 oranlarında *B. nucum* larvaları üzerinde öldürücü etkiye sahip oldukları belirlendi. Lipa ve Wiland (30) benzer bir çalışmada, *Serratia marcescens*'in doğal bir formunun *Agrotis sp.* üzerinde %100'lük bir ölüm meydana getirdiğini tespit etmişlerdir.

Çalışma sonunda özellikle 3 günlük sürede *B. nucum* popülasyonunda %100'lük bir ölüm oranı oluşturan *Serratia marcescens*'in gelecek için bir biyolojik mücadele ajanı olarak geliştirilebilecek ve fındık ürünü üzerinde büyük zarar oluşturan *B. nucum*'a karşı kullanılabilir olması ekonomik açıdan büyük katkılar sağlayacaktır.

Ayrıca tüm bakteriyal izolatlar içinde sadece *Bacillus sp.*'nin bir plazmide sahip olduğu belirlendi. İleriki çalışmalarda, *B. nucum* larvaları üzerinde *Bacillus sp.*'nin oluşturduğu %45'lik etkinin plazmiden kaynaklanıp kaynaklanmadığının araştırılması ve eğer kaynaklanıyorsa plazmidin karakterizasyonu planlanmaktadır.

Yapılan literatür taramalarına göre, daha önce *B. nucum* üzerinde sadece biyolojisi ve çeşitli kimyasalların etkilerinin araştırılması ile ilgili bazı çalışmalar mevcuttur. Diğer yandan, detaylı olarak böceğin biyolojisinin, bakteriyal florasının ve çeşitli biyolojik ajanların *B. nucum* larvaları üzerindeki etkilerinin çalışılmamış olması nedeniyle mevcut çalışma, gerek fındık kurdunun biyolojisinin aydınlatılması açısından gerekse bu böceğe karşı bir biyolojik mücadele ajanı geliştirilmesi bakımından büyük önem arz etmektedir.



5. SONUÇLAR

1) Sonuç olarak bu çalışmada, fındık kurdu (*Balaninus nucum*)'nun biyolojisi ile ilgili yumurta boyutları (0.795 ± 0.14 mm ve 0.525 ± 0.11 mm), hortum uzunlukları (dişi, 6 ± 0.4 mm ve erkek, 3.8 ± 0.2 mm), larva baş kapsül genişlikleri (512.5 ± 15 μ m, 800 ± 8 μ m, 1005 ± 10 μ m ve 1295 ± 6 μ m), kanat uzunlukları (dişi, 10 ± 0.8 mm ve erkek, 9.5 ± 0.3 mm), cinsiyet oranı (1/1) gibi literatürde mevcut olmayan bilgiler ve sarıkaramuk ve karakaramuk olarak adlandırılan zararı tespit edildi.

2) Yapılan kantitatif sayım sonucunda ergin ve larvaların birey başına düşen toplam bakteri sayısı (1.41×10^{11} bakteri/ergin ve 1.8×10^9 bakteri/larva) belirlendi.

3) Süspansiyondan, zenginleştirme kültürleri yapılarak elde edilen bakterilerden, birbirlerinden farklı oldukları gözlenen 5 izolat tespit edildi ve bunlar teşhis testlerine tabi tutuldu. Yapılan morfolojik, boyama, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testler sonucunda izolatların *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Serratia* ve *Escherichia* cinslerine ait türler oldukları ortaya çıkarıldı.

4) Yapılan testler sonucunda 4 nolu izolatın *Serratia marcescens* olduğu ve bu izolatın bioassay çalışmalarında 3 gün içerisinde fındık kurdu populasyonunda %100'lük ölüme sebep olduğu belirlendi.

5) *B. nucum* üzerinde denenen biyolojik ajanlardan en yüksek etkiyi BTS1 toksini ve LdNPV virüsünün %90'lık bir oranla oluşturduğu belirlendi. PHE4-A'nın %56, PHE4-AD'nin %60, PHE4-AR'nin %60, PHE4-ADR'nin %66, HD1 toksininin %70, AcNPV'nin ise %60'lık bir etki gösterdiği tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Araştırma sonucunda fındık kurdu (*B. nucum*)'ndan izole edilen *Serratia marcescens*'in *B. nucum* larvaları üzerinde 3 günlük sürede %100'lük bir ölüme sebep olduğunun bulunması, tüm dünyanın zararlılara karşı biyolojik mücadele ajanlarının bulunup geliştirilmesine çalışılan zamanda, yani günümüzde, çok büyük önem arz etmektedir. Bu noktada önemli olan bulunan bu ajanın geliştirilip bir biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabilmesini sağlamaktır.

İleride yapılacak çalışmalar ile ülke ekonomimizde önemli bir yere sahip olan fındık ürünü üzerinde büyük zarar veren fındık kurdu için bir biyolojik ajan geliştirilmesi mümkün olacaktır. Bu çalışmalarda patojenik etkiye sahip *Serratia marcescens*'in protein fraksiyonlanması yapılarak hangi proteininin toksisite oluşturduğunun bulunması ve daha ileride bu proteini oluşturan genin belirlenmesi ve karakterizasyonu amaçlanmaktadır.

Ayrıca *Bacillus sp.*'nin sahip olduğu plazmidin karakterizasyonu ve bakteriyal izolatın *B. nucum* üzerindeki etkisinin bu plazmide bağlı olup olmadığının araştırılması amaçlanmaktadır.

Aynı zamanda, yapılan bu çalışmanın, sonuçları ve kullanılan metodları açısından ileride yapılması düşünülen buna benzer çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyim.

7. KAYNAKLAR

1. Ayfer, M., The Hazelnut Culture in Turkey, Atti del Convegno in ternazionale sul Nocciuolo, Italy, (1983) 19-27.
2. Kasaplıgil, B., İbliography on *Corylus* (Betulaceae) with Amotations, Ann. Rep. of the Northern Nut Growers Association, 63 (1972) 25-32.
3. TÛBİTAK, Doğu Karadeniz Bölgesinde Tarımsal Üretim Verimlilik Sorunları, 1988, Ankara, Bildiriler Kitabı, 49-64.
4. Ural, İ., 1957 a, Doğu Karadeniz Fındıklarında Zarar Yapan *Balaninus (Curculio) nucum* Böceğinin Biyolojisi ve Mücadelesi Üzerinde Araştırmalar, A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları 130, 80 (1957) 96.
5. Martin, H., Contribution Ál'etude du Balanin Des Noisettes (*Balaninus nucum* L.). Rev. Path. Veg. Ent. Agr., (1949) 3-28.
6. Barrios, G., Maero, J., Torrell, A. ve Virgili, A., Insecticide Trials against *Curculio nucum* L. in Hazel Trees, Full-d Informacio-Tecnica, 123 (1987) 3.
7. Maesu, J., Torrell, A. ve Barrios, G., Testing of Insecticides against the Hazelnut Weevil (*Curculio nucum* L.), Full-d Informacio-Tecnica, 154 (1988) 3.
8. Tabamaishvili, L. E., The Nut Weevil and Its Control. Subtropiches'k'e-Kultury, USSR, 5 (1988) 128-131.
9. Piskornik, Z., Observation on the Resistance of the Hazelnut (*Corylus avellana* L.) to The Hazelnut Weevil (*Curculio nucum* L.), Acta-Horticulturae, Poland, 317 (1992) 163-170.
10. Devlet İstatistik Enstitüsü (D. İ. E.), Dış Ticaret İstatistikleri, Ankara, 1987.
11. Işık, M. ve Dündar, F., Fındık Zararlıları ve Hastalıkları ile Mücadele, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayınları, Ankara, 1992.

12. Metcalf, C. L. ve Flint, W. P., Destructive and Useful Insect, Their Habits and Control, 21 th Ed., McGraw-Hill, New York., 1962.
13. Erdem, R. ve Çanakçıoğlu, H., Orman Entomolojisi, Fakülteler Matbaası, İstanbul, VIII., 1970.
14. Kurt, M. A., Doğu Karadeniz Bölgesinde Fındık Zararlıları Tanınmaları, Yayılış ve Zararları, Yaşayışları ve Savaşım Yöntemleri, Tarım ve Orman Bakanlığı, Samsun Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müd., Mesleki Kitaplar Ser., 26, 1982.
15. Peter, G., Plant Pests and Their Control, Fenemore, Reader in Entomology, Massey University, New Zealand, 1983.
16. Çanakçıoğlu, H., Zararlı Böceklerle Savaş, İstanbul Üniv., Orman Fak. Yayınları, İstanbul, 1971.
17. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Cilt 4, Ankara, 1995.
18. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Cilt 3, Ankara, 1995.
19. Çanakçıoğlu, H., , Orman Ağaçlarına Arız Olan Bazı Aphidlere Karşı Yapılan Kimyasal Mücadele Denemeleri ve Neticeleri, İstanbul Üniv., Orman Fak. Dergisi, 20 (1970) 94-114.
20. Berkes, F. ve Kışlalıoğlu, M., Ekoloji ve Çevre Bilimleri, Remzi Kitabevi, İstanbul, 1990.
21. Liu, G., Some Extracts from The History of Entomology in Chine, Psyche, 46 (1939) 23-28.
22. Sweetman, H. L., The Principles of Biological Control, WM. C. Brown Company, Dubuque, Iowa, XI, 1973.
23. Aliniazae, M. T., Evaluation of *Bacillus thuringiensis* against *Archips roranus* (Lepidoptera: Tortricidae), Canadian Entomologists, 106, 4 (1975) 393-398.

24. Arif, B. ve Kurstak, E., *Viruses of Invertebrates*. New York, USA, Marcel Dekker, Inc., 1991.
25. Lipa, J. J., *An Outline of Insect Pathology*, Warsaw, Poland, 1975.
26. Mitchell, F. L., Smith, G. E. ve Smith, J. W. JR., Characterization of an Entomopoxvirus of The Lesser Cornstalk Borer (*Elasmopalpus lignosellus*), Journal of Invertebrate Pathology, 42 (1983) 299-305.
27. Triggiani, O. ve Lipa, J. J., Pathogens Occuring in a Population of *Tortrix viridana* L. (Tortricidae) in Southern Italy, Entomologica, XXIV, Bari, 30 (1989) 141-14.
28. Vargos-Osuna, E., Aldebis, H. K., Caballero, P., Lipa, J. J. ve Santiago-Alvarez, C., A Newly Described Baculovirus (Subgroup B) from *Ocnogyna baetica* (Rambur) (Lepidoptera: Arctiidae) in Southern Spain, Journal of Invertebrate Pathology, 63 (1994) 31-34.
29. Liao, Y. K., Lu, Y. S., Goto, Y. ve Inaba, Y., The Isolation of Akabane Virus (Iriki Strain) from Calves in Taiwan, J. of Biol. Mic., 36 (1996) 33-39.
30. Lipa, J.J. ve Wiland, E., Bacteria Isolated from Cutworms and Their Infectivity to *Agrotis sp.*, Acta Microbiologica Polonica, 4, 21 (1972) 127-140.
31. Lipa, J. J. ve Wiland, E., Yeasts Isolated from Some Noctuids and Their Pathogenicity to *Agrotis sp.* (Noctuidae, Lepidoptera), Acta Microbiologica Polonica, 4, 21 (1972) 89-95.
32. Lipa, J. J. ve Hokkanen, H. M. T., A Haplosporidian *Haplosporidium meligethi* sp.n., and Microsporidian *Nosema meligethi* I. et R., Two Protozoan Parasites from *Meligethes aeneus* F. (Coleoptera: Nitidulidae), Acta Protozoologica, 30 (1991) 217-222.
33. Palleroni, N. J., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 1, Baltimore, U.S.A., 1986.
34. Sneath, A. P., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2, Baltimore, U.S.A., 1986.

35. Poinar, G. O., Identification of The Groups of Insect Pathogens, Plenum Press, New York, 1978.
36. Schleifer, K. H., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Baltimore, U.S.A., 1986.
37. Brenner, D. J., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1, Baltimore, U.S.A., 1986.
38. Jones, D. ve Collins, M. D., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Baltimore, U.S.A., 1986.
39. Benson, H.J., Microbiological Applications, a Laboratory Manual in General Microbiology, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, 1985.
40. Cappuccino, J.G. ve Sherman, N., Microbiology, a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York, 1992.
41. O'Farrel, P., High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins, Journal of Biol. Chem., 250 (1975) 4007-4021.
42. Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J. ve Noller, H.F., Complete Nucleotid Sequense of a 16S Ribosomal RNA Gene from *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci., 75 (1978) 4801-4805.
43. Işık , M., Ecevit, O., Kurt, A. ve Yüçetin, T., Doğu Karadeniz Bölgesi Fındık Bahçelerinde Entegre Savaş Olanakları Üzerinde Araştırmalar, Ondokuz Mayıs Üniv. Yayınları, 20, Samsun, 1987.
44. Christine, L. C. ve TED, R. J., Laboratory Experiments in Microbiology, Third Edition, California, 1992.
45. Bradford, M.M, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilising the Principle of Protein-dye Binding. Anal. Biochem., 72 (1976) 248-254.
46. Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227 (1970) 680-685.

47. Voskuil, M.I. ve Chambbiss, G.H., Rapid Isolation and Sequencing of Purified Plasmid DNA from *Bacillus subtilis*, Applied and Environmental Microbiology, 59, 4 (1993) 1138-1142.
48. Ben-Dov, E., Boussiba, S. ve Zaritsky, A., Mosquito Larvacidal Activity of *Escherichia coli* with Combinations of Genes from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. Journal of Bacteriology, (1995) 2581-2587.
49. Martens, J. W. M., Honee, G., Zuidema, Van Lents, J. W. M., Visser, B. ve Vlak, J. M., Insecticidal Activity of a Bacterial Crystal Protein Expressed by a Recombinant Baculovirus in Insect Cells, Appl.Environmental Entomology, 6 (1990) 2764-2770.
50. Brown, M. ve Faulkner, P., Factors Affecting the Yield of Virus in a Cloned Cell Line of *Trichoplusia ni* Infected with a Nuclear Polyhedrosis Virus, Journal of Invertebrate Pathology, 26 (1975) 251-257.
51. Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. S. ve McCamley, P., The Establishment of Two Cell Lines from the Insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), In vitro, 13 (1977) 213-217.
52. Huber, J., Use of Baculoviruses as Pesticides: The Biology of Baculoviruses, Granados, R. R. ve Federici, B. A., (II). Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., 181, 1986.
53. Kansu, A., Orta Anadolu Meyve Ağaçlarına Zarar Veren Bazı Makrolepidoptera Türlerinin Evsafı ve Kısa Biyolojileri Hakkında Araştırmalar. Zir. Vek. Neşriyat ve Haberleşme Müd., 704, Ankara, 1955.
54. Cato, E.P., Hash, D.E., Holdeman, L.V. ve Moore, W.E.C., Electrophoretic Study of *Clostridium* Species, Journal of Clinical Microbiology, 15 (1982) 688-702.
55. Mitchell, F. L., Brewer, B. S., Nelson, R. K. ve Fuxa, J. R., A Nuclear Polyhedrosis Virus of the Buck Moth Caterpillar (*Hemileuca maia*) (Lepidoptera: Saturniidae), Environmental Entomology, 14 (1985) 496-499.

56. Lipa, J. J., Aldebis, H. K., Vargas-Osuna, E., Caballi, P., Santiago-Alvarez, C. ve Hernandez-Crespo, P., Occurrence, Biological Activity, and Host Range of Entomopoxvirus B from *Ocnogyna baetica* (Lepidoptera; Arcidae), Journal of Invertebrate Pathology, 63 (1994) 130-134.
57. Boucias, D. G., Maruniak, J. E. ve Pendland, J. C., Characterization of an Iridovirus Isolated from the Southern Mole Cricket, *Scapteriscus vicinus*, Journal of Invertebrate Pathology, 50 (1987) 238-245.
58. Mitchell, F. L. ve Smith, J. W., Pathology and Bioassays of the Lesser Cornstalk Borer (*Elasmopalpus lignosellus*) Entomopoxvirus, Journal of Invertebrate Pathology, 45 (1985) 75-80.
59. Moar, W. J., Pusztai-Carey, M. ve Mack, T. P., Toxicity of Purified Proteins and the HD-1 Strain from *Bacillus thuringiensis* Against Lesser Cornstalk Borer (Lepidoptera:Pyralidae), Journal of Economical Entomology, 88 (1995) 606-609.
60. Phlzenschutz Nachrichten Bayer Special Issue, Genetic Engineering in Agriculture, Dr. Maria Esters (Editor), Crop Protection Business Group Public Affairs/Market Research, D-51368 Leverkusen, Bayerwerk, 49 (1996) 47-56.

8. EKLER

8.1. Besiyerlerinin Hazırlanışı

Anaerobik Agar: 20g trypticase, 10g glukoz, 5g sodyum klorür, 15g agar, 2g sodyum thioglycolate, 1g sodyum formaldehit sulfoksilat 1000ml deiyonize suda (ddH₂O) çözüldü, pH'ı 7.2'ye ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

Fenilalanin Agar: 3g yeast extract, 2g DL-fenilalanin, 1g disodyum hidrojen fosfat, 5g sodyum klorür, 12g agar 1000ml ddH₂O'da çözüldü, pH'ı 7.3'e ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

İndol Üretimi Besiyeri: İndol üretiminin test edilmesi için %1'lik tryptone broth veya %1'lik trypticase broth kullanıldı. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi.

Karbohidrat Fermentasyonu Besiyeri: Bu besiyerinin hazırlanması için ilk olarak temel besiyeri hazırlandı. 1g diamonyum hidrojen fosfat, 0.2g potasyum klorür, 0.2g magnezyum sülfat, 0.2g yeast extract, 15g agar 1000ml ddH₂O'da çözüldü, pH'ı 7.0'a ayarlanmadan önce %0.04 (w/v) oranında hazırlanan bromcresol purple solüsyonundan 15ml ilave edildi, otoklavlanarak steril edildi.

Daha sonra fermentasyon özelliklerine bakılacak olan şekerler hazırlandı. Öncelikle her bir besiyerinin hazırlanacağı test tüpleri otoklavla steril edildi, %10 oranındaki karbohidrat solüsyonları ise filtreden geçirilmek suretiyle steril edildi. 50°C'ye kadar soğutulan steril temel besiyerine %0.5 oranında olacak şekilde karbohidrat solüsyonundan ilave edildi, besiyerleri slant olarak kullanıldı.

Lizozimli Nutrient Broth: Mililitresinde 10.000 ünite lizozim ihtiva eden bir solüsyon hazırlandı ve 0.45 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden geçirilmek suretiyle steril edildi. Daha sonra 1ml'lik steril lizozim solüsyonu 99ml steril nutrient brothla karıştırılarak besiyeri hazırlanmış oldu.

Nişasta Agar: 1g patates nişastası 10ml soğuk ddH₂O'da çözüldü ve 100ml nutrient agarla karıştırıldı, otoklavlanarak steril edildi.

Nitrat Broth: 5g pepton, 3g beef extract, 1g potasyum nitrat, 1000ml ddH₂O'da çözüldü, pH 7.0'a ayarlanarak otoklavda steril edildi.

Nutrient Agar: 5g pepton, 3g beef extract, 15g agar 1000ml ddH₂O'da çözüldü. Otoklavlanarak steril edildi. Çalışmada, ayrıca ticari olarak satılan nutrient agarda kullanıldı.

Nutrient Broth: 3g beef extract, 5g pepton 1000ml deiyonize suda (ddH₂O) çözüldü ve pH'ı 6.8'e ayarlanarak kullanıldı. Otoklavda 121°C 'de 20 dakika bekletilerek steril edildi. Ayrıca, çalışmada ticari olarak satılan nutrient broth'ta kullanıldı.

Nutrient Jelatin: Ticari olarak satılan nutrient jelatinden 120g 1000ml ddH₂O'da çözüldü, pH'ı 7.0'a ayarlandı ve böylece kullanıldı. Bundan farklı olarak aynı amaç için %0.4 oranında gelatin ihtiva eden nutrient agar kullanılarakta bu amaç için kullanılmaktadır.

Sitrat ve Propionat Kullanım Besiyerleri: 1g trisodyum sitrat 2H₂O (veya 2g sodyum propionat), 1.2g magnezyum sulfat 7H₂O, 0.5g diamonyum hidrojen fosfat, 1g potasyum klorür, 40ml eser element solüsyonu, 15g agar, 920ml ddH₂O ve 20ml %0.04'lük fenol red solüsyonu karıştırıldı, otoklavlanarak steril edilmeden önce pH'ı 6.8'e ayarlandı. Eser element solüsyonu şöyle hazırlandı: 50mg etilendiamintetraasetat, 200mg FeSO₄.7H₂O, 10mg ZnSO₄, 3mg MnCl₂.4H₂O, 30mg H₃BO₃, 20mg CoCl₂.6H₂O, 1mg CuCl₂.2H₂O, 2mg NiCl₂.6H₂O, 3mg NaMoO₄.2H₂O, 1000 ml ddH₂O'da çözümlenerek hazırlandı.

Tirozin Agar: 0.5g L-tirozin, 10ml ddH₂O'da çözümlenip otoklavlanarak steril edildikten sonra aseptik şartlar altında 100ml steril nutrient agarla karıştırılarak petrilere dökülüp kullanıldı.

Üre Hidrolizi Besiyeri: 0.1g yeast extract, 9.1g potasyum fosfat monobazik, 9.5g potasyum fosfat dibazik, 0.2g üre ve 0.001g fenol red karışımına 117ml ddH₂O ilave edildi. pH'ı 6.8'e ayarlandıktan sonra 0.45µm gözenek büyüklüğüne sahip steril filtreden geçirilmek suretiyle steril edildi.

Voges-Proskover Broth: 7g pepton, 5g glukoz, 5g sodyum klorür, 1000ml ddH₂O'da çözüldü, pH'ı 6.5'e ayarlandı, otoklavlanarak steril edildi.

8.2. Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı

Aseton Alkol: 250ml %95'lik etanol ve 250ml saf aseton karıştırılarak hazırlandı.

Demir Klorür Solüsyonu: Bu ayıraç fenilalanin deaminasyonunun belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Ayıraç %10'luk demir klorür (FeCl₃) çözeltisinden ibarettir.

İyot Çözeltisi: 1g iyot 2g potasyum iyodür, 60ml %5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃), 240ml distile H₂O ile karıştırılarak hazırlandı.

İndol Ayıraç: 5g p-dimetilaminobenzaldehit, 75ml izoamil alkol ve 25ml hidroklorik asit (HCl) karıştırılarak yapıldı.

Katalaz Ayıraç: Ayıraç olarak %10'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi kullanıldı.

Kristal Viyole Boyası: Bu boya iki ayrı solüsyon halinde hazırlanıp ardından ikisi birbirine karıştırıldı. A) 1g kristal viyole, 10ml etanol, 90ml distile su ile karıştırıldı. B) 4g amonyum oksalat ve 400ml dH₂O karıştırıldı. Bu her iki solüsyon hazırlandıktan sonra ikisi birbirine karıştırılarak kullanıldı.

Nitrit Ayıracı: Bu ayıraç ortamdaki nitratin nitrite indirgenip indirgenmediğinin ortaya çıkarılması için kullanıldı. Bu amaçla iki ayrı ayıraç kullanıldı. Ayıraçlardan birincisi 1N hidroklorik asid solüsyonudur. Kullanılan diğer ayıraç ise şu şekilde hazırlandı. A) 8g sulfonilik asit, 5N asetik asit 1000ml distile suda çözüldü. B) 6ml dimetil a-naftolamin, 5N asetik asit 1000ml distile suda çözümlenerek hazırlandı.

Safranin: 2.5g safranin O, 100ml %95'lik etanol ve 500ml dH₂O karıştırılarak hazırlandı.

Spor Boyası: 5g malaşit yeşili 100ml dH₂O'da çözüldü, süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek kullanıldı.

Voges-Proskover Ayıracı: %40'lık sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisinin 3 mililitresine 0.5-1mg keratin ilave edilerek hazırlandı.

9. ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladıktan sonra 1990-1991 öğretim yılında K.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 1994 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitime başladı ve şu anda Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

