

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

~~78176~~

78176

EUPROCTIS CHRYSORRHOEA (L.)'NİN BAKTERİYAL FLORASININ VE
BİYOLOJİK MÜCADELE AJANLARININ ARAŞTIRILMASI

Biyoloji Öğr. Mustafa YAMAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

“Yüksek Lisans (Biyoloji)”

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

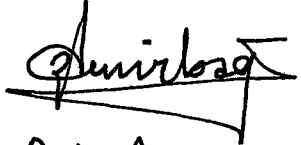
Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09.02.1998


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

Euproctis chrysorrhoea (L.)'nin bakteriyal florasının ve biyolojik mücadele ajanlarının araştırıldığı bu çalışma, K.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarlarında yapılmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi, gerekse çalışmaların yürütülmesi sırasında ilgisini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a, her türlü yardımı gördüğüm sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, Prof. Dr. Asım KADIOĞLU'na, bu tezin geliştirilmesinde yardımcı olan jüri üyelerine ve bu çalışmayı oldukça rahat bir ortamda gerçekleştirmemi sağlayan değerli hocam sayın Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU'na teşekkür ederim.

Labaratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Araştırma Görevlileri sayın Sabriye DÜLGER ve Ahmet Faik AYAZ'a ve diğer bölüm arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Mustafa YAMAN

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. <i>Euproctis chrysorrhoea</i> Hakkında Genel Bilgi	3
1.2.1. <i>Euproctis chrysorrhoea</i> 'nın Morfolojisi	3
1.2.2. <i>Euproctis chrysorrhoea</i> 'nın Biyolojisi	4
1.3. Zararlılarla Mücadele Yöntemleri.....	4
1.4. Kimyasal Mücadele	5
1.4.1. İnsektisitlerin Yan Etkileri	5
1.4.1.1. İnsektisitlerin Böcekler Üzerine Etkileri	6
1.4.1.1.1. Zararlı böceklerde İlaçlara Karşı Mukavemet.	6
1.4.1.1.2. Kimyasal İlaçların Faydalı Böceklere Etkileri.....	6
1.4.1.2. İnsektisidlerin İnsanlar Üzerine Etkileri.....	7
1.4.1.3. İnsektisidlerin Çevreye Olan Etkileri	8
1.5. Biyolojik Mücadele.....	10
1.5.1. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Etken Gruplar.....	10
1.5.1.1. Predatörler.....	10
1.5.1.2. Parazitler.....	10
1.5.1.3. Mikroorganizmalar	12
1.5.1.3.1. Bakteriler	12
1.5.1.3.2. Mantarlar	13
1.5.1.3.3. Virüsler	14
1.5.1.3.4. Protozoalar	14

1.5.1.3.5.	Nematodlar	15
1.6.	Zararlı böceklerde Patojen Mikroorganizmaları Varlığının Araştırılması	15
1.6.1	Makroskopik İnceleme	15
1.6.2.	Mikroskopik İnceleme	15
1.6.2.1.	Virüsler	16
1.6.2.2.	Riketsialar	16
1.6.2.3.	Nematodlar	17
1.6.2.4.	Bakteriler	17
1.7.	Bakteri tür Tayininde Kullanılan Kriterler	17
1.7.1.	Nümerik Taksonomi	17
1.7.2.	Genetik Homoloji	20
1.7.3.	Diğer Metodlar.....	21
1.8.	Mikroorganizmaların Virulansının Test Edilmesi	21
1.8.1.	Virulans Testinde Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar	21
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	23
2.1.	Larvaların Toplanması	23
2.2.	<i>Euproctis chrysorrhoea</i> 'nın Bakteriyal Florasının Belirlenmesi	23
2.2.1.	Bakteriyal İzolatların Hazırlanışı	23
2.2.2.	Saf Kültürlerin Hazırlanışı	24
2.2.3.	Bakteriyal İzolatların Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	24
2.2.3.1.	Basit Boyaması	24
2.2.3.2.	Gram Boyaması.....	24
2.2.3.3.	Spor Boyaması.....	24
2.2.3.4.	Kapsül Boyaması	25
2.2.3.5.	Hareket Testleri	25
2.2.4.	Bakteriyal İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	26
2.2.4.1.	Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....	26
2.2.4.2.	Büyüebildiği pH Aralıklarının Belirlenmesi	26
2.2.4.3.	NaCl İhtiyaçlarının Belirlenmesi	27
2.2.4.4.	Lizozimde Büyüme Özelliklerinin Belirlenmesi.....	27

2.2.4.5.	Atmosferik Oksijen İhtiyaçlarının Belirlenmesi.....	27
2.2.4.6.	Nişasta Hidroliz Testleri.....	28
2.2.4.7.	Jelatin Hidrolizi Testleri	28
2.2.4.8.	Karbonhidrat Fermantasyon Testleri.....	28
2.2.4.9.	Hidrojen Sülfür Üretim Testleri.	29
2.2.4.10.	Voges- Proskover Testleri.....	29
2.2.4.11.	Sitrat ve Propionatı Kullanım Testleri ...	29
2.2.4.12.	Nitrati İndirgeme Testleri. ...	30
2.2.4.13.	Katalaz Testleri.....	30
2.2.4.14.	Oksidaz Testleri	30
2.3.5.	Bakteriyal İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	31
2.4.	<i>Euproctis chrysorrhoea</i> 'ya Karşı Çeşitli Biyolojik Ajanların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.....	31
2.4.1.	Biyolojik Numunelerin Hazırlanması.....	31
2.4.2.	Biyolojik Numunelerin İnsektisidal Testleri	32
2.5.	<i>Euproctis chrysorrhoea</i> 'da Parazit Varlığının Belirlenmesi	32
3.	BULGULAR	34
3.1.	Larvalardan Bakteri İzolasyonu	34
3.1.1.	Bakteri İzolatlarının Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özellikleri	34
3.1.2.	İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	36
3.2.	Bakteriyal İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.....	39
3.3.	<i>Euproctis chrysorrhoea</i> 'ya Karşı Çeşitli Biyolojik Ajanların İnsektisidal Etkilerinin Araştırılması.....	40
3.4.	<i>Euproctis chrysorrhoea</i> 'dan Parazit İzolasyonu.....	41
4.	TARTIŞMA.....	44
5.	SONUÇLAR.....	47
6.	ÖNERİLER.....	48
7.	KAYNAKLAR.....	59
8.	EKLER.....	52
9.	ÖZGEÇMİŞ.....	55

ÖZET

Euproctis chrysorrhoea L. (altın kelebek, Lepidoptera, Lymantriidae) hem Türkiye’de hem de dünyanın diğer ülkelerinde önemli bir bitki zararlısıdır. Şimdiye kadar bu zararlı ile mücadele daha çok kimyasal ilaçlar ile yapılmıştır. Kimyasal ilaçların yan etkilerinin keşfedilmesi, bilim adamlarını daha etkili ve daha güvenli bir mücadele yöntemi geliştirmeye sevk etmiştir. Bu çalışmada, *Euproctis chrysorrhoea*’ya karşı etkili bir biyolojik mücadele ajanı geliştirilmesi, bakteriyal florasının belirlenmesi, patojen varlığının araştırılması ve literatürde mevcut olan biyolojik ajanların bu zararlı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla Trabzon ve Gümüşhane yöresinde toplanmış *Euproctis chrysorrhoea*’nın değişik instarlardaki larvaları incelenmiştir. Bu zararlının bakteriyal florası belirlenmiş ve izole edilen bakterilerin ve çeşitli biyolojik materyallerin böcek üzerindeki insektisidal etkileri test edilmiştir.

Sonuç olarak bu böcekten, altı bakteri ve bir nematod izole edildi. İzole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. Bu özellikler göz önünde tutularak izole edilen bakteriler *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* ve *Bacillus* cinslerine dahil edildi. İzole edilen nematodun morfolojik özelliklerine bakılarak Mermithidae familyasına ait olduğu belirlendi. Ayrıca *Bacillus* cinsine dahil edilen izolatların bu zararlı üzerinde %45, %25 ve %30’luk bir insektisidal etkiye sahip oldukları tespit edildi. Test edilen biyolojik ajanların insektisidal etkileri ise, LdNPV ile %70, AcNPV ile %35, HD-1 ile %55, BTS-1 ile %25, pHE4-A ile %5, pHE4-AD ile %5, pHE4-AR ile %5 ve pHE4-ADR ile %10 olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler : *Euproctis chrysorrhoea*, Biyolojik Kontrol, Bakteriyal Flora,
Nematod

SUMMARY

INVESTIGATION BACTERIAL FLORA AND BIOLOGICAL CONTROL AGENT OF *EUPROCTIS CHRYSORRHOEA*

Euproctis chrysorrhoea (Browntail moth, Lepidoptera) is common plant pest in Turkey and in all over the world. Up to now, chemical substances have been utilized to control these pests. However, recent concern on the hazardous effect of chemical pesticides in the environment made scientists consider finding more effective and safer control agents.

In this study, in order to find a more effective and safer pesticide, bacterial flora of *Euproctis chrysorrhoea* collected in the vicinity of Trabzon and Gümüşhane were determined, and the insecticidal effects of bacterial isolates and eight various biological agents on the larvae of *E. chrysorrhoea* were tested.

As a result, six bacteria and one nematode were isolated. The morphological, physiological and biochemical characteristics of these bacterial isolates were identified. According to determined features, the isolates are placed into the genera of *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* and *Bacillus*. Determined nematode is placed into the family Mermithidae. In additional, the insecticidal effects of isolates, placed into the genus *Bacillus* are found as 45%, 25% and 30%. The insecticidal effects of eight various biological agents tested against *E. chrysorrhoea* are 70% with *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus (LdNPV), 35% with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV), 55% with toxin isolated from Harry Dumage (HD-1) strain of *B. thuringiensis*, 25% with toxin isolated from tenebrionis (BTS-1) strain of *B. thuringiensis*, 5% with *Escherichia coli* transformed with plasmid containing *cry IVA* gene (pHE4-A), 5% with *E. coli* transformed plasmid containing *cry IVA* and *cry IVD* genes (pHE4-AD), 5% with *E. coli* transformed plasmid containing *cry IVA* and 20-kDa-protein genes (pHE4-AR) and 10% with *E. coli* transformed plasmid containing *cry IVA*, *cry IVD* and 20-kDa-protein genes (pHE4-ADR) of *Bacillus thuringiensis*.

Key Words: *Euproctis chrysorrhoea*, Biological Control, Bacterial flora, Nematode

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. İnsektisidlerin çevreye olan etkileri.....	9
Şekil 2. Tipik bir böcek parazitinin hayat döngüsü.....	11
Şekil 3. Bakteriyal izolatların <i>Euproctis chrysorrhoea</i> üzerindeki insektisidal etkileri	40
Şekil 4. Biyolojik numunelerin <i>Euproctis chrysorrhoea</i> üzerindeki insektisidal etkileri.....	41
Şekil 5. <i>E. chrysorrhoea</i> 'dan izole edilen enfeksiyon özelliğine sahip nematod..	42
Şekil 6. <i>E. chrysorrhoea</i> 'dan izole edilen nematodun ışık mikroskopunda görünümü	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1. <i>Euproctis chrysorrhoea</i> 'dan elde edilen bakteriyal izolatların morfolojik ve büyüme özellikleri	36
Çizelge 2. <i>Euproctis chrysorrhoea</i> 'dan elde edilen bakteriyal izolatların biyokimyasal özellikleri	38
Çizelge 3. Trabzon ve Gümüşhane'den toplanan <i>Euproctis chrysorrhoea</i> larvalarında parazitizasyon varlığı	42



SEMBOLLER DİZİNİ

AcNPV	: <i>Autographa californica</i> nüklear polihedrosis virüs
BSA	: Bovin Serum Albumin
<i>B. thuringiensis</i>	: <i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>B. sphaericus</i>	: <i>Bacillus sphaericus</i>
BTS-1	: <i>B. thuringiensis</i> Tenebrionis suşu
<i>E. chrysorrhoea</i>	: <i>Euproctis chrysorrhoea</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
HD-1	: <i>B. thuringiensis</i> Harry Dumagae suşu
LdNPV	: <i>Lymantria dispar</i> nüklear polihedrosis virüs
NPV	: Nüklear polihedrosis virüs

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Hızla artan dünya nüfusunun gıda ve giyim ihtiyaçlarını karşılayabilmek için birim sahadan fazla verim alma uygulamalarının başında bitkilerin zararlı böceklerden korunması gelmektedir. Günümüzde bitkilerin korunması daha çok kimyasal ilaçlar kullanılarak yapılmaktadır. Kimyasal ilaçlar kullanılırken, bunların bir çok yan etkileri ortaya çıkmaktadır. Bir çok yönden bazı canlı gruplarına ciddi zararlar vermektedirler. Zirai mücadele ilaçlarından bugün için vazgeçilememesinin nedeni, bu ilaçlara alternatif bir mücadele yönteminin tam anlamıyla geliştirilememesidir. Kimyasal mücadelenin dışındaki mücadele metodlarının yeteri kadar geliştirilememesinden ve geliştirilen metodların zararlı, pahalı ve ilkel olmasından dolayı zirai mücadele ilaçlarının uygulanmasının daha uzun yıllar devam edeceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, tüm dünyada kimyasal ilaçların yerini gelecekte biyolojik kontrol olarak bilinen bir yöntemin alacağı tartışılmaktadır.

Biyolojik kontrol, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin tabii düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Tabii düşman terimi, parazitler ve predatörlerle birlikte hastalık oluşturan organizmaları da kapsar. Ancak, hastalık yapan organizmaların kullanımı, genellikle mikrobiyal kontrol olarak adlandırılır (1). Zararlıların kontrolü için mikroorganizmaların en pratik kullanımı onların suni ortamlarda kültürlerinin hazırlanmasını ve daha sonra uygun bir yerde ve zamanda çevreye dengeli miktarlarda sunulmasını içerir. Kullanılan mikroorganizmalar zararlıya özgü olduğu için yalnızca o canlıyı etkiler. Biyolojik kontrolün büyük bir avantajı kimyasal kontrol yöntemleriyle bağlantılı birçok problemi ortadan kaldırmasıdır (2). Bu nedenle biyolojik kontrol, kimyasal ilaçlarla karşılaştırıldığında ekolojik dengeyi bozmayan alternatif bir mücadele yöntemidir.

Böceklerin kontrolü için mikrobiyal ajanların kullanımı ilk olarak 18. yüzyılda kaydedilmiştir. *Metarrhizium anisopliae* (Metch.) şeker pancarına zarar veren *Cleonus punctiventus* türüne karşı kullanılmıştır (3). Mikrobiyal ajanların kullanımı

çok eskiye dayanmasına rağmen, mikrobiyal kontrol ve böcek patolojisi alanı tıp ve veteriner hekimlik alanı altında fazla gelişmemiştir. Avrupa da bir çok araştırmacı 1800'lü yılların sonlarında böcek türlerinin kontrolü için fungusların kullanımını denemiştir (3). Günümüzde, 1165 mikroorganizma böceklerle bağlantılı olarak bulunmuştur (3). Her ay yeni organizmalar izole edilmekte ve tanımlanmaktadır. Bunların bir çoğu patojendir. Toplam 1165 mikroorganizmanın bakteriler 90 tür ve varyetesini, virüs ve riketsialar 260 türünü, funguslar 460 türünü ve nematodlar 100 türünü kapsamaktadır (3).

Euproctis chrysorrhoea L. (altın kelebek) ekonomik olarak önemli bir zararlıdır. Ağaçların yaprak ve genç meyvelerinde oburca beslenerek zarar yapan larvaları ekonomik olarak büyük kayıplara neden olmaktadır (4). *E. chrysorrhoea* ile mücadele günümüzde kimyasal insektisidler ile yapılmaktadır. Bu insektisidler hem pahalı hemde ekolojik çevreyi olumsuz bir şekilde etkilemektedirler (2). Bu zararlıyla mücadelede kullanılan insektisidlerin hepsinin ortak özelliği bal arılarını ve balıkları etkilemeleridir. Özellikle Karadeniz Bölgesi'nin önemli gelir kaynaklarının arıcılık ve balıkçılık olduğu düşünülürse, bu zararlı ile mücadelede kullanılan insektisidlerin bölgeye yapmış olduğu zarar daha iyi anlaşılmalıdır.

E. chrysorrhoea ile çok fazla biyolojik mücadele çalışmaları yapıldığı halde şu ana kadar etkili bir biyolojik ajan geliştirilememiştir. Sadece bir kaç bilim adamı bu zararlının parazitleri ve patojenleri hakkında çalışmalar yapmıştır. Türkiye'de sadece *Compsilura concinnata* (Meigen) (Diptera, Tachinidae) parazitoidinin bu zararlı üzerindeki gelişimi ve etkinliği çalışılmıştır (5). Diğer ülkelerde ise bu zararlı üzerinde bir mikrosporidianın etkili olduğu tespit edilmiştir (6). Fransa'da bu zararlının yuvalarında *Monodontomerus aereus* parazitoidi tespit edilmiştir (7). İngilterde nükleer polihedrosis virüsü (NPV)'nün bu zararlı üzerindeki etkisi çalışılmıştır (8). Yine İngiltere'de bu zararlıdan sitoplazmik polihedrosis virüsü izole edilmiştir (9).

Kimyasal insektisidlerin yan etkilerinin iyice anlaşılması bilim adamlarını daha etkili ve daha güvenli bir mücadele ajanı bulmaya yöneltmiştir. Tarım sektöründe büyük ekonomik zararlara neden olan *E. chrysorrhoea* ile mücadelede daha etkili ve daha güvenli bir mücadele ajanı bulmak kaçınılmaz olmuştur. Bu sebeple bu çalışmada, *E. chrysorrhoea* ile mücadelede kullanılmak üzere etkili bir biyolojik ajan geliştirilmesi ve bu zararlının mevcut parazitleri ve bakteriyal florasının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Ayrıca, izole edilen bakterilerin ve literatürde bulunan bazı biyolojik ajanların bu böcek üzerinde insektisidal etkilerinin test edilmesi amaçlanmaktadır.

1.2. *Euproctis chrysorrhoea* Hakkında Genel Bilgi

Euproctis chrysorrhoea, Kuzey Afrika'dan başlayıp Güney ve Orta Avrupa, İngiltere ve İskandinavya'nın güney kıyılarına kadar uzanan hat ile Anadolu, Urallar, Türkistan ve Litvanya'yı içine alan bir bölge ile Uzakdoğu'da Japonya'da yaygındır (4).

E. chrysorrhoea'nın İstanbul Belgrat Ormanında bulunduğu ve 1938 ile 1939 yıllarında Kayseri-Pınarbaşı'da kitle üremesi yaptığı tespit edilmiştir (10). Bu zararlı 1949 ve 1950 yıllarında İstanbul civarında salgın yapmıştır. Orta Anadolu'da, orman ve meyva ağaçlarına zarar yaptığı ortaya konulmuştur. Ayrıca bu bölgeden Akdeniz ve Ege bölgelerine geçiş zonlarında çok tipik bir meşe zararlısıdır.

Trakya'nın hemen her tarafında bulunmakta ve önemli bir bölümünde de meyva ağaçlarında ciddi zararlara neden olmaktadır. Ege Bölgesi'nde de 3-4 yıllık periyodlarla önemli salgınlar yapmaktadır. Gümüşhane ve Tunceli'de meyva ağaçlarına zarar vermektedir (10).

E. chrysorrhoea, bu geniş yayılış alanı içinde çeşitli meyva ve yapraklı orman ağaçlarında, her yıl tekrarlanan önemli zararlara neden olmaktadır. Polifag olmasına rağmen ekonomik bakımdan daha çok çeşitli meyva ve meşe ağaçlarını zarara uğratmaktadır. Tırtılları ilk devrelerde gruplar halinde ördükleri ağlar içersinde, sonraları ayrı ayrı dağılarak damarlar haricinde yaprakları tamamen yiyerek beslenirler. Yaprakları zarar gören ağaçlar özümleme yapamadığından meyvelerini dökerler.

1.2.1. *Euproctis chrysorrhoea*'nın Morfolojisi

Ergin: Gelişmiş kanat açıklığı 30-35 mm'dir. Ön ve arka kanatları beyazdır. Vücudun sonunda altın sarısı renginde kılların oluşturduğu bir demetçik vardır. Erkeklerin ön kanatlarının iç açısında ekseriya siyah lekeler bulunur. Antenleri dişilerde tek taraflı, erkeklerde çift taraflı tarak şeklindedir (4).

Geniş yapraklı odunlu ağaçların yapraklarına kirli beyaz yumurtalarını bırakırlar. Yumurtalar, abdomenin son kısmındaki tüylerle karışmış olarak bırakılır.

Tırtıl: Kahve renklidir. Sırtlarında kırmızı iki çizki ile iki siğil bulunur.

Pupa: Pupalaşmadan önce hepsi bir yana dağılır ve genellikle diğer bitkilerin üstüne çıkarlar. Sonuçta bir yaprak yumağının içinde ya da toprak üzerinde pupa olurlar. Pupaları siyahımtırak esmer renklidir.

Yayılı: İsveç'ten Orta ve Güney Avrupa üzerinden Türkiye ye, buradan da Buhara'ya kadar yayılmıştır. Türkiyede çok geniş yayılıma sahiptir.

Zarar yaptığı bitkiler: Meşe, elma, armut, fındık, erik ve diğer meyva ağaçlarında büyük zararlar yapmaktadır. Tırtılları ağaçların yaprak ve çiçeklerini yer, yaprakları iskelet haline çevirir.

1.2.2. *Euproctis chrysorrhoea*'nın Biyolojisi

Uçma zamanı Haziran ve Temmuz aylarıdır. Esmer sarı renkteki yumurtalarını yığın halinde (200-300 adet) yaprakların alt yüzeyine sıralar halinde koyarlar ve üzerlerini vücudunun sonundaki sarı tüylerle örterler. Yumurtalar bırakıldıktan 2-3 hafta sonra çıkan tırtıllar yakınlarındaki yaprakları yer ve sonra bunları birbirine örerek yumruk büyüklüğünde bir kışlama yuvası hazırlarlar. Kışı tırtıl halinde yuvada geçirdikten sonra ilkbaharda, ağaçların yeşerdiği sırada dışarıya çıkarlar. Tırtıllar önceleri toplu olarak yaşarlar ve daima yuvalarına dönerler (4). Sonraları ise etrafa dağılarak yapraklar arasında veya toprak içinde yarı saydam bir koza hazırlayıp Mayıs sonu ve Haziran ayında bunun içinde pupa haline geçerler. Basit bir generasyonu vardır

1.3. Zararlılarla Mücadele Yöntemleri

Zararlıların bitkilerde yaptıkları çeşitli zararlıların, gerek doğal kuvvetler (doğal mücadele) gerekse insan yardımıyla (uygulamalı mücadele) önlenmesine veya hiç olmazsa azaltılmasına yönelik yöntem ve harcanan çabalara zararlılarla mücadele denir. *E. chrysorrhoea* ile yapılan mücadele yöntemlerini çeşitli gruplara ayırmak mümkündür.

Doğal mücadele: Doğal kuvvetlerin böceklere olan etkilerinden yararlanarak zararlının öldürülmesi.

Yasal mücadele: Yasal yollardan yararlanılarak zararlıların yayılmasını önleme. Örneğin, karantina, ambargo, muayene vb.

Mekanik mücadele: Zararlı böcekleri toplama, tuzakla yakalama, böcekli materyalleri yok etmek.

Fiziksel mücadele: Yakmak, sıcaktan, radyoaktiviteden ve elektrikten faydalanmak.

Kültürel mücadele: Bu zararlının zarar yaptığı ağaçların karışıklığını ve kapalılığını düzenlemek, meşcere kurmak ve yetiştirme ile kesim tekniğine uymak, toprak bakımı, dayanıklı türler yetiştirmek, gıda kaynaklarını değiştirmek.

Biyolojik mücadele: Zararlı böceği yok etmek için çeşitli etken gruplarından (mikroorganizma, böcek yiyen vertebratlar, predatör arthropodalar, parazit böcekler) ve genetik yöntemlerden yararlanmak.

Kimyasal mücadele: Tozlaşma, püskürtme, sisleme, fumigasyon, sterilizasyon, zehirli yemler kullanmak vb.

Entegre mücadele: Çevre ve orman sahibi için uzun vadede en az masrafla en iyi faydaları sağlayabilecek olan ve populasyon dinamiğine dayanan yöntemlere önem verilerek, mücadele yöntemlerinin kombine edilmesi sonucu yarar elde etmektir.

1.4. Kimyasal Mücadele

E. chrysorrhoea ile mücadelede en çok kullanılan mücadele yöntemi kimyasal mücadeledir. Diazinon, malathion ve azinfos en çok kullanılan insektisidlerdir. Ne yazık ki bu insektisidler ekolojik dengeyi aşırı derecede bozmaktadır. Bu insektisidlerin yan etkileri aşağıda genel olarak açıklanan benzer etkileri sergilemektedir.

1.4.1. İsektisitlerin Yan Etkileri

Bu zararlı ile mücadelede yaygın olarak kullanılan insektisidler bitkilerde ve çevrede bulunan canlılar üzerinde bir çok zararlı etkiler meydana getirmektedirler (2).

İsektisidlerin zararlarını böcekler, insanlar ve çevre üzerine olan etkileri olarak başlıca üç başlık altında toplayabiliriz.

1.4.1.1. İnektisitlerin Böcekler Üzerine Etkileri

İnektisidlerin böcekler üzerine etkileri böceklerin uygulanan kimyasala karşı mukavemet kazanması ve faydalı böceklere zarar vermesi şeklinde olur.

1.4.1.1.1. Zararlı Böceklerde İlaçlara Karşı Mukavemet

İnektisitler her ne kadar zararlı böcekleri yok etmek için kullanılsalarda, her zaman zararlı böceklere karşı tam bir etki sağlayamazlar. Çünkü zamanla inektisitlerin ilk tatbik edildikleri zamanki etkili dozlarından daha az etkilenebilen ırklar ortaya çıkmaktadır. Bu olaya böceklerin mukavemeti adı verilmektedir. İlaç baskısı altında yetişen generasyonlarda tabii seçim hassas olan fertlerin ortadan kalkmasına ve devamlı mukavim fertlerin ortaya çıkmasına sebep olur. Dolayısıyla bu yeni fertlere karşı kullanılan inektisidler daha çok çevredeki yararlı canlıları ve insanları etkilemektedir (2).

Böcekler ile inektisitler arasındaki önemli bir ilişki de, herhangi bir ilacın baskısı altında yetişen bir böcek popülasyonunda, o böcek popülasyonuna tatbik edilmeyen ilaçlara karşı da bir mukavemet getirebilmesidir. Buna karşıt mukavemet adı verilmektedir. Örneğin, paration mukavemeti altında 41 generasyon yetiştirilen karasineklerde 7 kat paration mukavemeti meydana geldiği gibi 3.000 kat DDT'ye, 70 kat methoxychlor'e ve 120 kat lindane'e karşıt mukavemet meydana gelmiştir (2). Özellikle böceklerde mukavemetin kısa sürede meydana gelişi mücadelede kullanılan kimyasal inektisiti kısa sürede etkisiz duruma getirmektedir. Bunun sonucunda da daha çok ilaç kullanılması gerekecektir. Kullanılan aşırı dozdaki ilaçlar zararlı üzerinde etkili olmaktan daha çok çevre kirliliği ve yan etkiler meydana getirecektir (2).

1.4.1.1.2. Kimyasal İlaçların Faydalı Böceklere Etkileri

İnektisitlerin etki tarzı bakımından zararlı ve faydalı böcekler arasında bir farklılığı yoktur. Fakat etkileri bakımından farklılıklar vardır. Faydalı böcekler olarak kabul edilen predatör ve parazitler inektisitlerden daha fazla etkilenmektedirler (2). Ne yazık ki parazit ve predatörlerdeki mukavemetin oluşumu, zararlı böceklerdeki

kadar çabuk olmamaktadır. Bunun sonucu olarak, zararlı populasyonları üzerinde dengeleyici olan parazit ve predatörler ortadan kalkmakta ve zararlılar daha çabuk yayılmaktadır. Ayrıca insektisitlerin kullanıldığı alanlarda doğal olarak yaşayan polinatör canlılarda yok olduğu için, bu alandaki zirai ürünlerde tozlaşma oranında azalmaktadır. Bunun sonucunda büyük verim düşüklüğü ortaya çıkmaktadır.

1.4.1.2. İsektisitlerin İnsanlar Üzerine Etkileri

İsektisitler doğrudan doğruya ve dolaylı olarak insan sağlığını etkilemektedirler (2). Bu etki akut ve kronik toksisite olarak iki grup altında toplanabilir.

Akut toksisite veya akut zehirlenmeler, ilaçlardan olan ani zehirlenmeleri ortaya çıkarmaktadır. Buda şu yollarla ortaya çıkmaktadır. İlacın imali esnasında çalışanlar ilaçlardan zehirlenebilirler. Ayrıca, ilaçların taşınması, kullanılması esnasında ihmalkarlık gösterilmesiyle zehirlenmeler ortaya çıkabilir (2).

Her ne kadar ilaçların prospektüslerinde hasattan ne kadar önce kullanılması gerektiği yazılı isede, bu süre beklenilse bile bir miktar ilaç ve ayrışma ürünleri geride kalmaktadır. Buna ilacın kalıntısı denilmektedir. İlaç kalıntıları dolaylı veya direkt olarak meydana gelebilirler. Bu kalıntıları içeren bitkilerle beslenen insanlar ilaçları vücutlarında depolarlar. ABD'de 216 değişik gıda maddesi örneği incelenmiş ve DDT ve ayrışma ürünlerinin örneklerde % olarak bulunuşunun fazla olduğu tespit edildiği gibi, bunların kalıntı miktarlarında fazla olduğu tespit edilmiştir (2).

Akut toksisite, zirai mücadele ilaçlarının fazla miktarda alınmasıyla olan zehirlenme olarak ortaya çıkmaktadır. Fakat, kronik toksisite olarak adlandırılan öldürücü dozların çok altındaki dozların kalıntılarında bütün insanlar nasibini almakta ve yavaş yavaş zehirlenmektedir. Bu düşük dozların gelecek kuşaklarda neler meydana getireceğininde şimdiden tahmin etmek zordur. Ayrıca bu ilaçların insanların sinir sistemindeki enzimler üzerinde etkili oluşu önemlerini dahada arttırmaktadır. Bugün özellikle fazla miktarlarda kullanılan klorlandırılmış hidrokarbonların insan ve hayvanların beyin, karaciğer, böbrek ve yağ dokularında toplanarak toksik etkide bulunduğu bilinmektedir (2).

1.4.1.3. İnektisidlerin Çevreye Olan Etkileri

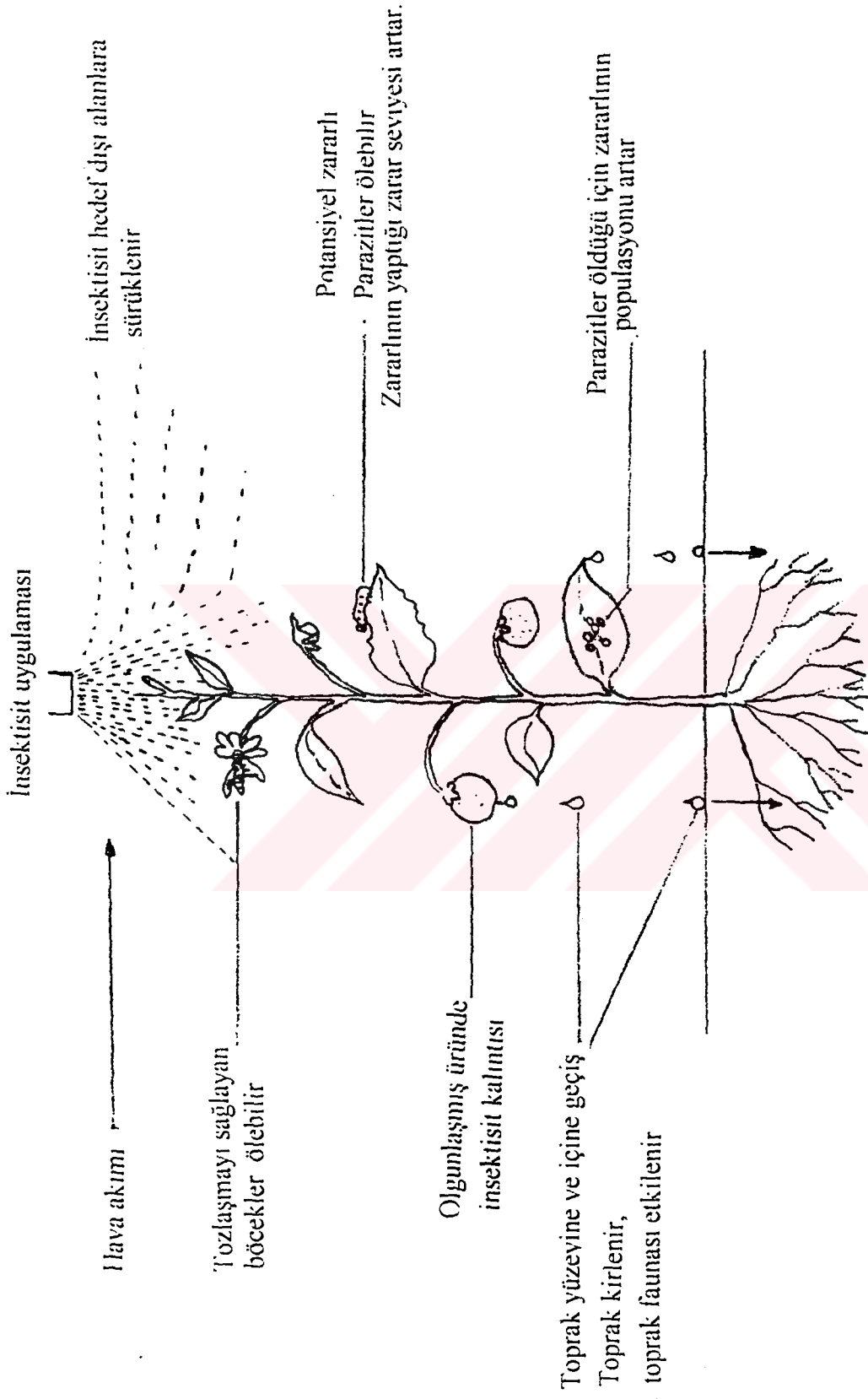
İnektisitler kullanıldıkları çevrede bulunan bir çok yabani hayvanları değişik oranlarda etkilemektedir. Ağaçlardaki bazı zararlıların mücadelesinde kullanılan DDT'nin toprakta birikme yaptığı ve bunun sığırcık ve böceklerle beslenen kuşların popülasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (2).

İnektisidlerin çeşitli hayvanlar ve bu meyanda kuşlar ve balıklar üzerine olan etkileri çoğunlukla ilaç atıldıktan sonra olur. Zehirli sahalarda hayvanların otlatılmasıyla otlarla birlikte zehir hayvanlara geçmektedir. Arazide tatbik edilen ilaçlar yağmurlarla yıkanarak derelere, oradan da deniz ve göllere taşınır. Bu yollarda balıklar etkilenir. Bu balıkları, ilaçlanmış meyve ve sebzeleri yiyen insanlar dolaylı olarak inektisidleri vücuduna almış olurlar.

İnektisidlerin kullanıldığı çevredeki bal arılarında en fazla etkilenen canlılar arasındadır. Bal arıları bal, arı sütü ve balmumu gibi ürünleri oluşturmalarının yanısıra bitkilerin tozlaşmasında sağlamaktadırlar. İnektisidlerin etkileriyle ölen arılar bu faydalı görevlerini yerine getiremezler. Bunun sonucunda da büyük verim düşüklüğü olmaktadır (2).

İnektisidler kullanıldıkları alandaki bitkilerin çimlenmesi, vejetasyonu ve üremesi üzerinde de olumsuz etkiler yaparlar. Bazan bitkilerin belirli doku kısımlarında, özellikle yaprak ve sürgünlerinde yanma denilen bir takım lekeler ile renk değişmelerinin meydana gelmesine sebep olurlar. Hatta bazan tüm bitkilerin öldüğü görülür.

Şekil 1'de görüldüğü gibi inektisidlerin yan etkilerinden dolayı, kimyasal mücadelenin günümüzde mümkün olduğunca kısıtlanmasının ve bunun yerini biyolojik mücadelenin alması gerektiğine inanılmaktadır.



Şekil 1. İnsektisitlerin çevreye olan etkileri

1.5. Biyolojik Mücadele

Biyolojik mücadele biyolojik kontrol olarak da adlandırılır. Biyolojik kontrol, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin tabii düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Tabii düşman terimi, parazitler ve predatörlerle birlikte hastalık oluşturan mikroorganizmaları da kapsamaktadır (1). Ancak, hastalık yapan mikroorganizmaların kullanımı, genellikle mikrobiyal kontrol olarak adlandırılmaktadır.

1.5.1. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Etkili Gruplar

Biyolojik mücadelede kullanılan etkili grupları predatörler, parazitler ve mikroorganizmalar olmak üzere 3 ana grup altında toplamak mümkündür.

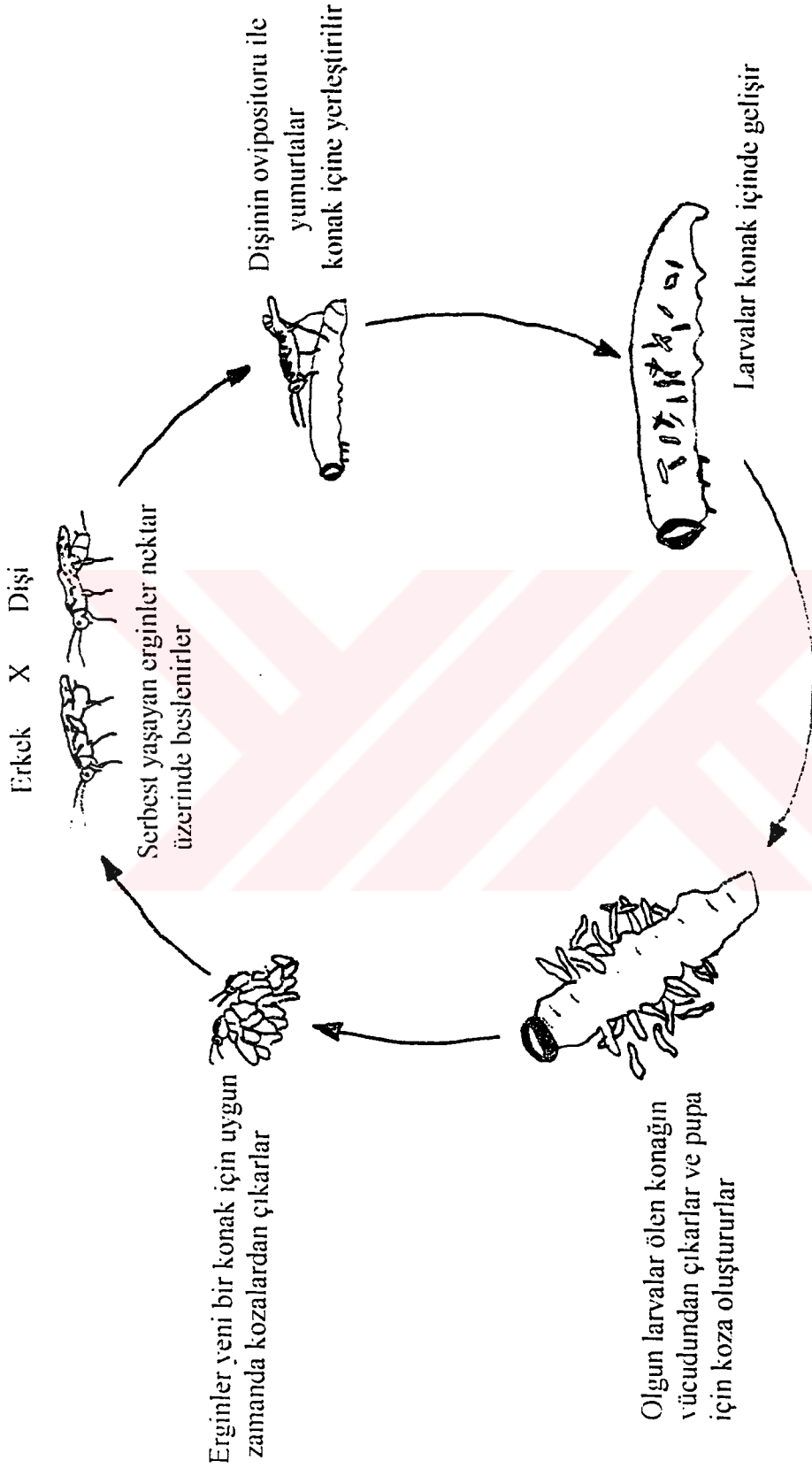
Zararlı böcek populasyonlarının çok yüksek orandaki artışları çoğu zaman yüksek mortalite ile kontrol edilebilir (12). İki ana grup altında toplanan doğal ölüm faktörleri vardır. Bunlardan biri, çevrenin fiziksel durumu ile ilgilidir. İkincisi ise diğer canlı organizmaların aktiviteleri ile ilgilidir. Bu canlılar predatör ve parazit canlılar ile zararlı böceklerde hastalık yapan patojen mikroorganizmalardır. Zararlı böceklerin doğal düşmanları olan bu canlılar büyük potansiyele sahiptirler.

1.5.1.1. Predatörler

Böcek predatörleri bir besin kaynağı olarak zararlı böcekleri yakalayan ve yiyen hayvanlardır.

1.5.1.2. Parazitler

Böcek parazitleri, larvaları böceklerin iç kısmında yada dış kısmında beslenen organizmalardır (1). Bağlandıkları böcek konak olarak adlandırılır ve gelişim safhası boyunca parazit olarak yaşayan larvayı besler. Böcek parazitleri kendi gelişimleri tamamlandığında her zaman böceği öldürürler (Şekil 2).



Şekil 2. Tipik bir böcek parazitiinin hayat döngüsü

Türkiye’de *E. chrysorrhoea* yuvalarında *Compsilura concinnata* (5), Fransa’da ise *Monodontomerus aereus* parazitoidi tespit edilmiştir (7). Böcek parazitizmi oldukça yaygındır ve birçok böcek kendisiyle bağlantılı bir veya çoğunlukla bir kaç parazit türüne sahiptir.

Bütün parazitik böcekler bağlandıkları konağın hayat döngüsü içindeki safhaya bağlı olarak özelleşmişlerdir. Bu yüzden bazıları pupa veya yumurta safhası ile sınırlanmışken bazıları bireysel larval parazitlerdir. Olgun parazitik böceklere nadir olarak rastlanılmaktadır. Yumurtalardan bireyin çıkması bazan konağın hayat döngüsü içinde bir safha olarak devam edebilir, fakat gelişim son safhaya kadar tamamlanmayabilir. Bazı parazitler bu yüzden yumurtalarını konak böceğin yumurtaları içinde yer alacak şekilde bırakırlar. Fakat, bunlar konak larval safhaya ulaşıncaya kadar konağa tutunmazlar. Bir çok parazit larvası konak böceğin vücudu içinde beslenir ve gelişir. Ancak bazı türlerin larvaları canlı dışında beslenirler.

1.5.1.3. Mikroorganizmalar

Doğada böceklerin hastalanmasına neden olan ve sonra onları öldüren, orjini bakteri, mantar, virüs veya protozoa olan pek çok mikroorganizma mevcuttur. Bunların zararlı böcekler üzerine kullanılması üzerine birçok ülkede geniş araştırmalar ve uygulamalar yapılmaktadır (12).

Zararlıların kontrolü için; mikroorganizmaların en pratik kullanımı, suni ortamlarda onların kültürlerini yetiştirmek ve daha sonra uygun bir zaman ve yerde çevreye geniş miktarlarda sunulmasını içerir (3). Şu anki uygulamalar sadece suni ortamlarda büyütülebilen ve gerektiğinde saklanılabilen mikroorganizmalar ile sağlanabilir.

1.5.1.3.1. Bakteriler

Birçok bakteri böceklerde kitle halinde ölüme neden olur (11). Fakat bu bakterilerin pek çoğundan yapay yollarla yararlanmak mümkün olmamıştır. Bunlardan yalnız birkaç tanesi biyolojik savaşta iyi sonuçlar vermiştir. Böceklerle ilişkisi olan önemli bakteri grupları şunlardır: Enterobacteriaceae (*Serratia*, *Esherichia*),

Pseudomonaceae (*Pseudomonas*), Micrococcaceae (Çeşitli türler), Bacillaceae (*Bacillus*) ve bazı *Clostridium* türleri.

Böceklerde önemli zarara neden olan bakteriler daha ziyade spor meydana getiren gruptur (11). Bu tip bakteriler ormanlardaki zararlı böcekler üzerinde önemli rol oynarlar. Bazı mevsimlerde tüm konukçuların her ferdini öldürürler. Yapılan araştırmalar sporların kuraklığa ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Fakat spor vermeyen bakteriler ekstrem fiziksel koşullara oldukça hassastır. Bu çalışmalar sonunda böceklerle mücadelede spor veren bakterilerden yararlanılması tavsiye edilmiştir (12).

Son yıllarda oldukça yüksek patojenik bakteri olan *Bacillus thuringiensis* Berliner *thuringiensis*'e büyük önem verilmiştir. Bunun biyolojik savaşta diğer bakterilerden daha fazla ümit verici olduğu tespit edilmiştir. Bol miktarda parasporal kristaller içerir (13). Bu bakterinin sporlarının püskürtüldüğü böcekler, sporların içindeki zehirli madde (toksin) nedeniyle ölürler. Fakat bu basil, böcekler arasında bulaşıcı hastalık durumu oluşturmaz. Basilin her defasında yeniden uygulanması gerekir. Bu bakteri ile özellikle tırtıllara karşı başarılı bir şekilde mücadele edilir ve seçici olduğundan yararlı böcekleri öldürmez (11). *Clostridium* cinsi içersinde bilinen böcek patojenleri sadece böcek bağırsağında hastalık oluştururlar ve asla böcek hemoseline geçmezler (13).

1.5.1.3.2. Mantarlar

Kolay olarak tanınmaları ve tabii olarak dağılmalarından dolayı en yaygın böcek patojenleri olarak kabul edilirler (13). Ençok karşılaşılan mantarlar Mastigomycotina, Ascomycotina ve Deuteromycotina alt bölümlerine aittir. Parazitik form oluşturan birkaç Basidiomycotina üyesi nadir olarak böcekler ile bağlantılıdır. Mantarların bulaştığı böcekler hastalanarak kısa veya uzun süre sonra ölürler. Fakat mantarlar, orman böcekleriyle mücadelede başarılı sonuç vermezler. Çünkü asalak mantarlar ancak oldukça sıcak ve nemli ortam şartlarında böcek afetlerine karşı etkili olurlar. Böcek afetleri ise havanın kuru olduğu zamanlarda meydan gelirler (11).

1.5.1.3.3. Virüsler

Bir çok virüsün böceklerin hastalanmasına neden olarak afetleri kontrol ettikleri bilinmektedir. Bu virüsler Baculoviridae, Reoviridae, Poxviridae, Picornaviridae, Densoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae ve İridoviridae familyalarına aittir (14). Bunlardan Baculoviridae familyası üyeleri sadece arthropodlarda enfeksiyon oluşturmalarından dolayı, diğer virüslere oranla daha avantajlıdır (15). Virüsler, genellikle mekanik olarak bir konukçudan diğerine yumurta vasıtasıyla nakledilirler. Çiğneyici ağız parçalarına sahip böcekler, özellikle yaprak yiyenler, virüs enfeksiyonlarına daha hassastır (16). Bu hususta yaprak yiyen Lepidoptera tırtırlarıyla Hymenoptera'nın yalancı tırtırları çok zarar görürler. Bu virüsler genellikle 2-3 yılda bir meydana çıkan epidemilerde çoğalarak bir çok larvayı öldürür ve böylece böcek afetini ortadan kaldırır. Bu zamana kadar yapılan çalışmalar sitoplazmik polihedrozis ve nükleer polihedrozis virüslerinin *E. chrysorrhoea*'da enfeksiyona sebep olduklarını göstermiştir (17). Amerika Birleşik Devletleri'nde *L. dispar* populasyonu üzerinde virüslerin neden olduğu bir hastalık müşade edilmiş (11). Ölen larvaların solgun bir görünümde olması sebebiyle buna solgun hastalığı adı verilmiştir.

Solgun hastalığı alınan gıda ile böcek vücuduna ulaşır. Virüs vücuda yerleşince, genellikle kan hücrelerini ve bazı doku hücrelerini öldürür. Hasta larva önce uyuşuk bir hal alır ve sonra yemesine son verir. Ölmeden önce ağacın tepesine tırmanır ve arka bacaklarına asılı olarak ölür. Dokuları koyulaşır, ayrışır ve vücutları sıvı haline geçer (11). Virüslerle biyolojik mücadele yapmak için genellikle hastalığın etkisiyle ölmüş tırtıllar kullanılır. Bu tırtılların ezilmesiyle hazırlanan süspansiyon epidemi alanına püskürtülür (11).

1.5.1.3.4. Protozoalar

Bu grub içinde orman böcekleriyle ilişkili önemli türler bulunmaktadır. *E. chrysorrhoea* üzerinde bir mikrosporidianın etkili olduğu tespit edilmiştir (6). Bunlardan *Pristophora schubergi* Zwölfer, çeşitli böceklerin tırtıl, pupa ve erginlerinde (örneğin, *L. dispar*'in tırtıllarında) zarar yapar (11). Hastalanan tırtılların orta sindirim borusu süt gibi beyaz bir hal alır. Bu hastalığın ekonomik değeri büyüktür.

1.5.1.3.5. Nematodlar

Bazı böcekler omurgalıların nematod parazitlerinin vektörleridirler. Nematod filumunun 5 süper-familyası böcekler ile ilişkilidir (16).

Oxyuroidae süper-familyası üyeleri konağın bağırsağında gelişir ve çoğalırlar. Orthoptera, Coleoptera ve nadiren Lepidoptera üyeleri genel konaklardır. Parazitik Tylenchoid nematodlar dişi bireyin hemosel içinde yumurta ve juvenil form oluşturarak böceği istila ederler. Daha sonra juvenil form konaktan ayrılır ve olgunlaşır.

Diplogasteridae, Steinernematidae (Süper-familiya Rhabditoidae) ve Mermithidae (Süper-familiya Mermithoidae) familyaları teşhislerde sıklıkla karşılaşılan türleri içerirler (18). Mermithidae familyasına ait olan *Hexameris ablicans* Lepidoptera familyasında en çok rastlanılan türdür (19).

1.6. Zararlı Böceklerde Patojen Mikroorganizma Varlığının Araştırılması

1.6.1. Makroskopik inceleme

Belirli mikroorganizmalar ile enfekte edilmiş böcekler mikroskop kullanmaya gerek kalmadan, kolayca gözlenebilir septomlar gösterirler. Mikrosporidlerle enfekte edilmiş sivrisinek larvaları vücutlarında süt beyazı lekelerle sahiptirler. *Nosema bombycis* Nag. ile enfekte olmuş ipek böceği (*Bombyx mori*) larvaları siyah lekelerle sahiptir (12). Fungiler ile enfekte edilmiş böcekler sık sık fungus renkleriyle kaplanırlar. Örneğin, *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) ile enfekte olmuş böcekler yeşil renk halini alırlar. Böyle durumlarda makroskopik çalışmalar, böceğin ölüm sebebinin yada hastalığının doğru teşhisini yapmak için gerekli bilgiyi vermektedir (12).

1.6.2. Mikroskopik inceleme

Makroskopik incelemelerin sonuçlandırılmasından sonra mikroskopik incelemelere başlanır. Eğer bir böcek yaşıyorsa, önce karbondioksit, su, kloroform veya diğer maddelerle anestezi yapılır. Anestezi olmuş yada ölmüş böceklere bir preparasyon kabı içinde muamele edilir (12).

En basit preperasyon kabı yarıya kadar parafinle doldurulmuş petri kabıdır. Böcek bireysel dokuları kesilmeye imkan sağlayacak şekilde parafin üzerine yerleştirilir. Bağırsak, malpigi tüpleri gibi iç organlardan numunelerin hazırlanması binoküler ışık mikroskobu altında yapılır.

Mikroskop altında çalışılabilen yapılar şunlardır: kutikula, hemositler, yemek borusu, malpigi tüpleri, yağ dokusu, kaslar, trakeler, gonadlar, sinir sistemi, hormonal bezler. Bireysel organ ve dokular incelenirken bütün infeksiyon belirtileri gözlenebilir. Bu belirtiler ilk teşhisi ve mikroskopik incelemeyi yapmak için yardımcı olacak şekilde aşağıda sınıflanmıştır.

1.6.2.1. Virüsler

Bozulma ve hücre dağılması özellikle hipodermiste kolaylıkla görülebilir. Yağ dokularında kristale benzer inklüzyon yapılarının varlığı viral hastalığın olduğunu gösterir (12).

Çeşitli hastalık tipleri, farklı inklüzyon yapılarının varlığı ile karakterize edilir. Polyhedra olarak bilinen polyhedral inklüzyonlar 0.5 ile 15 μ m arasındadır. Granüller olarak adlandırılan oval inklüzyonlar yaklaşık 0.5 μ m'dir. Özellikle malpigi tüpleri gibi böcek dokularında organik olmayan kristallerin var olduğu unutulmamalıdır. Organik olmayan bu kristaller çoğu zaman virüs inklüzyonlarının şekil ve hacimlerine benzerler. Granüllerin ve polihedraların varlığının güvenilir bir teşhisini yapmak için hücre sitoplazması içini veya çekirdeği araştırmak gerekir. Bunun için en iyi metod trake sıvısının, hemositlerin yada hipodermislerin incelenmesi metodudur. Enfekte edilmiş çekirdekler önemli bir şekilde genişler. Yağ dokusundaki hücre bölünmesi artar (12).

1.6.2.2. Riketsialar

Çapları yaklaşık 0.5 μ m olan küçük, çoğunlukla polimorfoz basil formunda mikroorganizmalar ve kristaller böceklerin yağ dokularında bulunur. Doğru teşhis için boyama ve özel testler gerekir (12).

1.6.2.3. Nematodlar

Nematodlar böceklerden konağın diseksiyonu boyunca izole edilirler. Eğer konak ölü ise, gliserin yada laktofenol içinde diseksiyon daha uygundur. Bir böcekten nematod izolasyonunda, binoküler mikroskop kullanılarak parafin dolu bir kap içinde larvanın diseksiyonu yapılır. Larva üzerine yeterince fizyolojik su konulur. Larva sırt kısmı boyunca kesilir. Malpigi tüpleri, hemosel, bağırsak gibi kısımlar incelenerek nematod varlığı tespit edilir. Eğer bir nematod tespit edilirse, dikkatlice çıkartılır ve az miktarda fizyolojik su ile birlikte lam üzerine aktarılır. Ölçümler yapılır ve değişik kısımlarının fotoğrafları çekilir (20).

1.6.2.4. Bakteriler

Bakterilerin karakteristik özelliklerini sıralamak zordur. Çünkü çok sayıda bakteri florası sağlıklı böceklerin vücudunda vardır (11). Bakteriler böceklerin hemolenfide bulunurlar. Kutikula virüs hastalıklarındaki gibi zedelenmiş hasarlı değildir ve esnektir. Spor oluşturan bakterilerle infeksiyonda, böcek yapılarındaki varlıkları onlar için daima zararlı ve öldürücüdür. Spor içeren uzun şekilli bakteriler gözlenmektedir. Bir bakterinin neden olduğu hastalıktan şüphelenildiğinde, hemen sıvı böcek dokusu içeriğinden yapılı agar kültürleri hazırlanmalıdır (12).

1.7. Bakteri Tür Tayininde Kullanılan Kriterler

1.7.1. 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 (21).

Boyama: Bakteriyolojide kullanılan en önemli ayırt edici boyamalardan birisi Gram boyamadır. Gram boyamasına göre bakteri hücreleri Gram pozitif ve Gram negatif olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu özellik, mikroorganizmaların sınıflandırılmasında kullanılan çok önemli ve gerekli olan bir özelliktir (22).

Çevresel şartlar bakterinin yaşaması için uygun olmayan hale geldiğinde, bazı bakteriler sporogenesis olayına maruz kalır ve endospor adı verilen yeni bir hücre içi yapı meydana gelir. Bakterilerin spor oluşturup oluşturmadığını belirlemek için endospor boyaması yapılır. Bakterilerin kapsül oluşturup oluşturmadıklarında sistematikte kullanılan kriterlerden biridir. Bunu belirlemek için kapsül boyaması yapılır (23).

Büyüme: Bakterilerin inoküle edildikleri besiyerinde oluşturdukları koloni morfolojisi ve pigment oluşumu gibi karakterlerdir (22).

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

Çoğu hücrelerin hayatlarını devam ettirebilmeleri için gerekli olan gaz atmosferik oksijendir. Mikroorganizmalar atmosferik ihtiyaçlarına göre aeroblar, mikroaerfiller, tamamen anaeroblar, aerotolerant anaeroblar ve fakültatif anaeroblar olarak gruplandırılmaktadırlar. Oksijen varlığında solunum için gerekli olan enzimlerden yoksun olan anaerobik bakteriler anaerobik şartlarda solunum olayını meydana getirmektedirler (22).

Biyokimya: Biyokimyasal katalizörler olarak bilinen enzimler, hem hücre içinde hem de hücre dışındaki olayları katalizleyerek biyokimyasal aktiviteleri meydana getirmektedir. Bu olaylar, genel olarak iki şekilde incelenmektedir (22).

a) Ekstraselüler enzimler: Bu enzimler, hücre dışındaki substratlar üzerine etkili olmaktadır. Hücre dışında görev yapan enzimler nişastanın, lipidlerin, kazeinin ve jelatinin hidrolizinden sorumlu olan enzimlerdir. Örneğin, Mikroorganizmaların nişastayı hidroliz edip etmedikleri nişasta hidroliz testi ile ortaya çıkarılmaktadır (22).

Kazein sütte bulunan proteinlerin başlıcasıdır. Hücre tarafından asimile edilmeden önce, bu makromolekülün peptonlara, polipeptidlere, dipeptidlere ve en sonunda da hücrenin yapısına girebilecek olan amino asitlere çevrilmesi gerekmektedir. Organizmaların kazeini hidroliz edip etmedikleri, kazein hidrolizi testi ile ortaya çıkarılmaktadır (22).

Jelatin zorunlu amino asitlerden biri olan triptofanı içermeyen, bu yüzdende eksik protein olarak adlandırılan bir makromoleküldür. Eksik bir protein olması dolayısıyla, hücre için besleyici değeri tartışılır olmasına rağmen, bakteri türlerinin

karakterizasyonunda çok önemli olan bir makromoleküldür. Mikroorganizmalar, bu proteini, jelatinaz adı verilen bir enzim yardımıyla amino asitlere kadar parçalar. Bu parçalanma bir kez meydana geldikten sonra, +4°C'de bile katı hale dönme özelliği geri kazanılmaz (22). Jelatinin bakteriler tarafından hidroliz edilip edilmediği, jelatin hidroliz testi ile ortaya çıkarılmaktadır (24).

b) İntraselüler enzimler: Bu enzimler hücre içerisinde faaliyet gösteren enzimlerdir ve hücre için gerekli olan yeni protoplazmik ihtiyaçların sentezinden sorumludurlar. Bu tip enzimlerin kullanılmasıyla oluşan son ürünlerin anlaşılması, sadece özel enzim sistemlerinin aydınlatılması için değil, aynı zamanda mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve teşhisinde de kullanılmaktadır (22).

Çoğu mikroorganizmalar, kendileri için gerekli olan enerjiyi, karbohidratlar gibi substratların biyooksidasyonunu gerçekleştiren enzimler yardımıyla elde ederler. Bazı organizmalar, glukoz gibi şekerleri anaerobik olarak fermente ederken, diğerleri ise aerobik veya fakültatif anaerobik olarak fermente etmektedirler. Bazı organizmalar da, glukozu fermente edebilecekleri enzim sistemlerinden yoksun olabilirler. Karbohidrat fermentasyonu sonucunda, organik asitler (laktik, formik veya asetik asit), bunun yanında hidrojen ve karbondioksit gibi gazlar meydana getirirler (24). Karbohidrat fermentasyonu testleri ile, meydana gelen bu son ürünler kullanılarak bir organizmanın her hangi bir karbohidratı fermente edip etmedikleri anlaşılır (24).

Triptofan, bazı bakterilerin enzimatik reaksiyonları için, oksidasyona uğraması gerekli bir amino asittir. Triptofanın sonuçta indol üretilecek şekilde hidrolize edilebilme kabiliyeti tüm organizmalar için karakteristik olan bir özellik değildir ancak biyokimyasal bir işaret olarak iş görmektedir. İndol testi yapılarak, organizmaları triptofanı oksidasyona uğratıp uğratmadıkları ortaya çıkarılmaktadır (24).

Voges-Proskover testi yardımıyla, bazı organizmaların glukoz metabolizması sonucunda oluşan organik asitlerden, asetilmetil karbinol gibi nötral son ürünleri veya asidik olmayan son ürünleri üretebilme kabiliyetleri ortaya çıkarılır (24).

Bazı mikroorganizmalar, fermente edebilecekleri glukoz veya laktöz mevcut olmadığında, enerji elde etmek için karbon kaynağı olarak sitrat veya propionatı kullanmaktadır. Mikroorganizmaların sitrat ve propionatı kullanıp kullanmadıkları, sitrat ve propionatı kullanım testleri ile ortaya çıkarılır (24).

Mikroorganizmaların hidrojen sülfürü (H_2S) üretilip üretilmediği, bakteri sistematiklerinde kullanılan kriterlerden biridir. Kükürt atomları, inorganik bileşiklerin oksidasyonu sırasında hidrojen akseptörü olarak iş görmektedir. Yapılan inkübasyonlar neticesinde besiyeride meydana gelen kararmalar, H_2S üretimini göstermektedir.

Bazı aerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmaların nitratı indirgemesi moleküler oksijen olmadığında yani anaerobik şartlar altında meydana gelir. Bakterilerin nitratı nitrit veya amonyağa indirgeyip indirgemediği, nitratı indirgeme testi ile ortaya çıkarılmaktadır (24).

Katalaz veya Peroksidaz adı verilen enzimleri üretebilen organizmalar, bu enzimler yardımıyla hidrojen peroksiti ortadan kaldırırlar. Organizmaların katalaz enzimini üretilip üretilmediği, katalaz testi ile ortaya çıkarılır (24).

Oksidaz enzimi, aerobik solunum sırasında elektron taşınımının düzenlenmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Bazı fakültatif ve mikroaerofilik organizmalar kadar aerobik bakterilerinde oksidaz enzimi üretilip üretilmediği, oksidaz testi ile ortaya çıkarılmaktadır (22).

1.7.2. 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 yardımı ile olur. Protein profilleri veya amino asit sırasının tayininde sistematiğe 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 hücre ekstraktından yüzlerce proteini ayırabilmektedir (22).

Tek yönlü poliakrilamid jel elektroforezi hücresel proteinlerin ayrılmasında kullanılan diğer bir yöntemdir.

1.7.3. Diğer Metodlar

Ribozom analizi: Ribozomlardaki RNA'lar farklı şekillerdedirler. 16S rRNA ünitesi bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılır. Bu 16S rRNA bakterileri orjinleri bakımından sınıflandırmaya yarar.

İmmunolojik reaksiyonlar: Mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan yapıların tanınmasında kullanılır. Bunda çeşitli antikorlar kullanılır. Bu antikorlar monoklonal ve poliklonal antikorlardır. Bunlar hücre yüzeyinde bulunan özel proteinlere bağlanırlar. Aynı antikor ile boyanan proteini ihtiva eden organizmalar bir grupta incelenir (23).

Faj tiplendirilmesi: Bakterilerin ekildiği kültür kabına konak spektrumu bilinen fajdan damlatılır. Eğer damla etrafında büyüme olmaz ise bu bakteri, fajın bilinen konakları arasına yerleştirilir.

1.8. Mikroorganizmaların Virulansının Test Edilmesi

Hasta veya ölü böceklerden mikroorganizmaların izolasyonu, onların böcek hastalığı ve ölümünün nedeni olabileceğini göstermektedir (12). İzole edilen mikroorganizmaların böcekler için patojen olup olmadıkları ve böceklerde bunların varlığını belirleyici semptom ve belirtilerin görülmeleriyle anlaşılır.

İzole edilen mikroorganizmaların patojen olup olmadıklarını göstermek için, bu mikroorganizmalar ile böcekler infekte edilir ve hastalığın gelişimi izlenir. Mevcut mikroorganizmaların saf kültürleri kullanılır. Diğer taraftan kültürü hazırlanamayan virüsler, protozoonlar ve diğer mikroorganizmaların infeksiyon numunesi ölü veya hasta böceklerden elde edilir (11). Böceklerin infeksiyonu için birçok metod bilinmektedir. Bu metodlar besin içinde infeksiyon, kutikula içinde infeksiyon, ağız ve çevresi içine infeksiyon, mikroorganizmaları oral veya anal açıklıklar üzerine yerleştirmek, mikrobeseleme ve mikroinjeksiyon şeklinde olmaktadır (12).

1.8.1. Virulans Testinde Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

Kontrol böcekleri test ederken temiz su püskürtülmüş veya steril su ile injekte edilmiş böcekleri kullanmaya dikkat edilmelidir. Böcekler gözlemlere bağlı olarak en

uygun ortamlara sahip olmalıdırlar. Çok yüksek virulanslı mikroorganizmalar veya *B. thuringiensis* test edildiğinde, test ölü ve hayatta kalan böceklerin varlığına dikkat edilerek 10 gün sonra bitirilmelidir. Kronik hastalıklara sebep olan protozoonlar ve mikroorganizmalar ile infeksiyonda gözlemler infekte edilmiş böcekler ile infekte edilmemiş böcekler arasında karşılaştırma yapılarak birkaç hafta hatta aylarca yapılabilir. Diğer ölüm nedenlerinin sonuçlarından mikroorganizmaların neden olduğu ölümleri ayırmak için ölü böcekler teşhis edici gözlemler altında incelenir. Suni olarak infekte edilmiş böceklerde, infekte etmiş bir organizma tespit edilirse onun böcek ölümünün veya hastalığının nedeni olduğu kabul edilir (12).



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Larvaların Toplanması

Bu çalışma boyunca gerekli olan *E. chrysothorax* (altın kelebek)'nin değişik instarlardaki larvaları 1995 ve 1997 yıllarının Nisan, Mayıs ve Haziran ayları boyunca Trabzon'un Akçaabat, Vakfikebir, Beşikdüzü ve Yomra ilçeleri ile Gümüşhane ili merkezinden fındık, elma, armut, meşe, erik ağaçlarıyla, kuşburnu ve yaban gülü bitkileri üzerinden toplandı. Farklı yerlerden toplanan larvalar toplandıkları yer, buldukları bitki ve tarih yazıldıktan sonra farklı özel kaplara konularak laboratuara getirildiler. Burada makroskopik incelemeleri yapılarak ölü, hastalıklı ve yavaş hareket edenler ayrıldı. Diğerleri ise aynı instarlar bir kaptaki şekilde 8 cm çapında ve 3 cm derinliğindeki plastik kaplara konularak doğal besinleri olan fındık, elma, meşe ve kuşburnu yaprakları ile beslendiler.

2.2. *Euproctis chrysothorax*'nin Bakteriyal Florasının Belirlenmesi

2.2.1. Bakteriyal İzolatların Hazırlanışı

Makroskopik inceleme sonucunda bakteriyal hastalık olabileceğinden şüphelenilen ölü ve hastalıklı gözükten larvalar yüzey sterilizasyonu için %70'lik alkol içeren bir kap içine konuldu. Kapın ağzı kapatıldı ve birkaç kez çalkalandı. Larvalar alınarak üç kez steril su ile çalkalandı. Daha sonra steril bir makas ile steril kabin içinde larvaların kutikulası kesildi. Bir inokülasyon özesi ile bir damla hemolenf alındı ve steril su ile seyreltilti. Nutrient agar üzerine bu sıvıdan çizgi ekim yapıldı (12).

Ayrıca, makroskopik inceleme sonucunda ölü ve hastalıklı görünen larvalardan 5 tane alındı. Yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra önceden steril edilmiş havanda 5 ml PBS içinde ezilerek ekstrakt hazırlandı. Hazırlanan ekstrakt süzülükten sonra seyreltilti ve son seyreltikten 0.1 ml alınarak nutrient agar besiyeri üzerine yayma ekim yapıldı. Ekim yapılmış her iki Petri kabı bir gece 37°C'de inkübe edildiler. İnkübasyon sonrası oluşan kolonilerden saf kültürler elde edildi.

2.2.2. Saf Kùltürlerin Hazırlanması

Nutrient agar besiyeri üzerinde üreyen koloniler binoküler mikroskop altında incelendikten sonra, koloni renk ve morfolojisine göre farklı olduğuna karar verilen kolonilerden nutrient agar besiyeri üzerine ekim yapılarak saf kùltürler elde edildi. Bu izolatlar 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 şeklinde numaralandırıldılar.

2.2.3. Bakteriyal İzolatların Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

2.2.3.1. Basit Boyaması

Elde edilen izolatların hücre şekillerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak basit boyamalar yapıldı. Bu amaçla, lam üzerine yayılan bakteri kùltürleri 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.

2.2.3.2. Gram Boyaması

Genç (24 saatlikten az) bakteri kùltürlerinden bir miktar alınarak lam üzerine yayıldı. Açık havada kuruması beklendikten sonra alevden geçirilerek tespit edildi. 10 saniye kristal viyole ile mumamele edildikten sonra lugolle yıkandı ve 10 saniye lugolle mumamele edildi. Aseton-alkol ile renk giderildikten sonra 10 saniye safraninle muamele edildi, dH₂O ile yıkandıktan sonra açık havada kurutularak mikroskop altında incelenmeye alındı ve mor renkli olarak boyanan bakterilerin gram pozitif, pembe renkli olarak boyanan bakterilerin ise gram negatif olduğuna karar verildi (21).

2.2.3.3. Spor Boyaması

İzolatların endospor oluşturup oluşturmadığı ve endosporun hücre içerisindeki pozisyonunun belirlenmesi amacıyla genellikle yaşlı kùltürler (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 için beklendikten sonra, dH_2O ile yıkandı. Üzerine safranin boyası ilave edildi ve 30-60 saniye boyandıktan sonra dH_2O ile yıkandı, açık havada kurutularak mikroskop altında incelendi (21). Pembe renkli hücreler içerisinde (eğer varsa) yeşil renkli sporu ayırt etmek mümkündür.

2.2.3.4. Kapsül Boyaması

Kapsül hücre tarafından salgılanan ve hücre duvarını saran, hücrenin dışındaki jelatinimsi bir tabakadır. İzolatların kapsül yapısına sahip olup olmadıklarının ortaya çıkarılması için her bir izolattan 24-48 saatlik kültürler yapıldı. Yapılan bu kültürlerden bir öze yardımıyla temiz bir lam üzerine yayma preparat hazırlandı. Açık havada kurumaması beklendikten sonra üzerine kristal viyole boyası ilave edildi ve 5-7 dakika beklendi. Daha sonra boya %20'lik $CuSO_4$ ile yıkandı. Açık havada kurumaması beklendikten sonra mikroskop altında incelendi (22). Negatif boyama olarak bilinen bu ortamda koyu renkli zemin üzerinde şeffaf renkli zon (kapsül) ve bunun içerisinde koyu renkli hücreyi ayırt etmek mümkündür.

2.2.3.5. Hareket Testleri

İzolatların hareketli olup olmadıklarının ortaya çıkarılması için "lam lamel arası" preparat tekniği kullanıldı (21). 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 mikroskofta incelendi ve izolatların hareketli olup olmadıklarına karar verildi.

2.2.4. Bakteriyal İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.4.1. Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Elde edilen izolatların maksimum ve minimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi için bakteriler nutrient agar slantları üzerine ekildiler. 30-50°C arasındaki sıcaklıklar için 5 gün, 20°C arasındaki sıcaklıklar için 14 gün ve 20°C'nin altındaki sıcaklıklar için ise 21 gün etüvde inkübe edilerek maksimum ve minimum büyüme sıcaklıkları ortaya çıkarıldı (24).

İzolatların optimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla nutrient broth besiyeri içinde yapılan gece kültürlerinden OD₆₀₀=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 OD₆₀₀'de absorbans değerleri ölçülerek bakterilerin optimum olarak büyüdüğü sıcaklıklar ortaya çıkarıldı (20).

2.2.4.2. Büyüyebildiği pH Aralıklarının 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 besiyerine inoküle edildiler ve optimum büyüme sıcaklıklarında üç gün inkübe edildiler. İnkübasyon neticesinde üreme olup olmadığı spektrofotometrede (OD₆₀₀'de) ölçümler yapılarak ortaya çıkarıldı. Böylece izolatların maksimum ve minimum olarak büyüyebildiği pH değerleri tespit edildi.

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 örnekler alınıp spektrofotometrede ölçümler yapılarak hangi pH değerinde optimum olarak büyüdüğü belirlendi (22). Ayrıca bakterilerin 5.7 pH'lı "soutbord dekstroz agar ve broth" besiyerlerinde üreme özelliği ve aynı zamanda pH'sı 6'dan düşük ve 7'den yüksek olan Voges-Proskover broth besiyerindeki büyüme özellikleri incelendi (24).

2.2.4.3. NaCl İhtiyaçlarının Belirlenmesi

İzolatların NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla %2, 2.5, 3, 5, 7 ve 10 oranında NaCl ihtiva eden nutrient broth besiyerleri hazırlandı. Bunun 4 mililitresine her bir izolattan ekim yapıldı. 7 ve 14 gün 30°C'de etüvde inkübasyondan sonra hangi oranda tuz ihtiva eden besiyerde üreme olmuş ise o orandaki tuzda izolatların üreyebildiği sonucuna varıldı (24).

2.2.4.4. Lizozimde Büyüme Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların lizozimde büyüüp büyümediğinin belirlenmesi amacıyla 10 µg/ml oranında (10.000 ünite) lizozim ihtiva eden nutrient broth besiyeri hazırlandı. Bu besiyere her bir izolattan ekim yapıldı. Yedi ve ondört gün 30°C'de inkübasyondan sonra üremenin olup olmadığına bakıldı (24).

2.2.4.5. Atmosferik Oksijen İhtiyaçlarının Belirlenmesi

Mikroorganizmalar atmosferik oksijen ihtiyaçlarına göre aeroblar, mikroaerofilikler, tamamen anaeroblar, aerotolerant anaeroblar ve fakültatif anaeroblar olmak üzere beş gruba ayrılarak incelenmektedirler (20). 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. Uygun sıcaklıkta bir gece inkübe edildikten sonra, tüp içerisinde üredikleri bölgeye bakılarak, izolatların oksijen ihtiyaçları hakkında karar verildi (20).

Ayrıca izolatların aerobik olarak mı yoksa tamamen anaerobik olarak mı solunum yaparak yaşadıklarının ortaya çıkarılması için deneylerde özel olarak hazırlanan anaerobik agar besiyeri kullanıldı (24).

2.2.4.6. Nişasta Hidroliz Testleri

Nişasta, glukoz monomerlerinin glikozidik bağlarla birbirlerine bağlanarak oluşturduğu yüksek moleküller 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. Üç ve 7 günlük uygun sıcaklıktaki etüvlerde inkübasyondan sonra petrideki bakterilerin üzerine %95’lik etanol ilave edildi. Oluşan renge göre izolatların nişastayı hidroliz edip etmedikleri hakkında karar verildi (24). Ayrıca bu test ayıraç olarak lugol kullanılarak yapıldı. Petriler üzerine lugol ilave edildi ve koyu kahve rengin oluşumu nişastanın hidroliz olduğunu, mavi rengin oluşumu ise nişastanın hidroliz olmadığını gösterdi (21).

2.2.4.7. Jelatin Hidrolizi Testleri

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 edilmediğinin ortaya çıkarılması amacıyla hazırlanan nutrient jelatin besiyeri, steril deney tüplerine döküldü. İzolatlardan her biri, 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 (24).

2.2.4.8. Karbohidrat Fermentasyon 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 olarakta bir boya ilave edildi. Hazırlanan

karbohidrat fermentasyon besiyerine her bir izolat ayrı ayrı ekildi. Yedi gün uygun sıcaklığa ayarlanmış etüvde inkübe edildikten sonra, besiyerinde meydana gelen koyu pembe renkten sarı renge renk değişikliği organizmaların kullanılan şekeri fermente ettiğini, her hangi bir değişikliğin olmaması ise şekerin organizma tarafından karbohidrat kaynağı olarak kullanılmadığını göstermektedir. Ayrıca tüp içindeki besiyerinde meydana gelen kabarmalar ve çatlamlar organizmanın bu şekerden gaz oluşturduğunu göstermektedir (24).

2.2.4.9. Hidrojen Sülfür Üretim Testleri

İzolatların hidrojen sülfür (H_2S) üretilip üretilmediğinin ortaya çıkarılması için “triple-sugar iron agar” besiyeri kullanıldı. Her bir izolat, bu besiyeriye inoküle edildi ve $30^\circ C$ 'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tüpün alt tarafında bir kararmanın olup olmadığına bakılarak, organizmanın H_2S üretimi hakkında karara varıldı. Besiyerinin alt kısmında koyu rengin oluşumu H_2S 'in üretildiğini göstermektedir (18).

2.2.4.10. Voges-Proskover Testleri

Voges-Proskover testi, bazı organizmaların, glukoz metabolizması sonucu meydana gelen asetil metilkarbinol gibi asetik olmayan veya nötral son ürünleri üretebilme özelliklerinin ortaya çıkarılması için yapılmaktadır. Bu testin gerçekleşmesi amacıyla Voges-Proskover broth besiyeri hazırlandı. Bu besiyerinin 4 mililitresine her bir izolattan ekim yapıldıktan sonra, $30^\circ C$ 'de 3 gün etüvde inkübe edildi. Üç günden sonra kültürlerin üzerine Voges-Proskover ayırıcı ilave edildi. Tamamen karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Sonuçta kültür yüzeyinde kırmızı rengin oluşup oluşmadığına bakılarak testin sonucu hakkında karar verildi (24).

2.2.4.11. Sitrat ve Propionatı Kullanım Testleri

Mikroorganizmalar ortamda fermente edebilecekleri glukoz veya laktozu bulamadıklarında gerekli olan enerjiyi sağlamak için ortamda bulunan sitrat veya

propionatı kullanmaktadırlar. İzolatların bu molekülleri kullanıp kullanmadığının ortaya çıkarılması amacıyla “sitrat ve propionatı kullanım besiyerleri” hazırlandı. Hazırlanan bu besiyerlere her bir izolat ekildi, 30°C’de inkübe edildi, 3 ve 7 gün sonra yapılan incelemeler sonucunda besiyerinde üreme ve renk değişikliği olup olmadığına bakılarak eğer mavi renge dönüş varsa organizmaların sitrat ve propionatı karbon kaynağı olarak kullandığına karar verildi (24).

2.2.4.12. Nitratı İndirgeme Testleri

İzolatların nitratı indirgeyip indirgemediğinin ortaya çıkarılması için “nitrat broth besiyeri” hazırlandı ve bu besiyerinin 4 mililitresine herbir izolattan ekim yapıldı. Üç ve yedi gün 30°C’de inkübasyondan sonra kültürler üzerine nitrit ayırıcı ilave edilerek veya 1 N HCl emdirilmiş kurutma kağıdına her bir izolatın kültüründen 1 damla damlatılarak oluşan rengin incelenmesi neticesinde testin sonucu ortaya çıkarıldı. Her iki ayıraç ilave edildiğinde de kahverengi renk oluşumu görülürse testin pozitif olduğu aksi taktirde ise negatif olduğuna karar verildi.

2.2.4.13. Katalaz Testleri

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 H_2O_2 çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz kabarcıklarına göre testin pozitif olduğuna karar verildi (24).

2.2.4.14. Oksidaz Testleri

Oksidaz testi çizgi ekim metoduna (21) göre yapıldı. Bu testin yapılabilmesi amacıyla “triptik soy agar” besiyeri hazırlandı. İzolatlar bu besiyerine ekildi. Uygun

sıcaklıkta 24-48 saat bekletildikten sonra üzerine oksidaz testi ayıracı ilave edildi, oluşan siyah renge göre testin pozitif olduğuna karar verildi.

2.3.5. Bakteriyal İzolatların İnektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Elde edilen izolatlardan spor oluşturmayanlar (1, 2, 4) 1-2 günlük, spor oluşturanlar (3, 5 ve 6) 4-6 günlük inkübasyondan sonra yoğunluğu 1.8×10^9 bakteri/ml olacak şekilde ayrıldı. Daha sonra her birinden 1 ml alınarak farklı kaplardaki besinler üzerine püskürtüldü (12). Mantar kontaminasyonunu önlemek için önceden steril edilmiş bu kapların her birine 20'şer larva konuldu. Kontrol grubunun bulunduğu kaptaki besinlere su püskürtüldü. Bütün deney grupları 26 ± 2 °C'de ve %60 nem içeren iklim dolabına 12:12 ışık periyodunda konuldu (25). Her 24 saatte bir besinleri taze yapraklar ile değiştirildi ve ölen larvalar çıkartıldı. On günden sonra ölüm olmadığı için deneye son verildi.

2.4. *Euproctis chrysorrhoea*'ya Karşı Çeşitli Biyolojik Ajanların İnektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

2.4.1. Biyolojik Numunelerin Hazırlanması

Bacillus thuringiensis toksinlerinin hazırlanması: Çalışmada denenen iki toksin *Bacillus thuringiensis*'in Harry Dumagae (HD-1) ve tenebrionis (BTS-1) suşlarından izole edilmiş toksinlerdir. Bu toksinlerden 0.005 gr alındı ve 5 ml fosfat tampon solusyonu (PBS) içerisinde çözüldü. Bu çözültiden 1ml alındı ve besin üzerine püskürtüldü.

Autographa californica nüklear polihedrozis virüs (AcNPV)'ünün hazırlanması: AcNPV, daimi hücre kültürlerinden olan Vaughn'ın duyarlı SF-IPLB-21 (*Spotoptera frugiperda*, Sf) hücre kültüründe üretildi. Fetal bovine serum katkılı (%10) TNMFH (26) besiyerinin kullanıldığı çalışmada m.o.i. = 1'e göre enfekte edilen hücreler 28°C'de inkübe edildi. Polihedral inklüzyon yapılar (PIB) oluştuktan sonra (yaklaşık 5-6 gün) hücreler alındı. Yoğunluğu 3×10^7 hücre/ml olacak şekilde solusyonu hazırlandı ve besin üzerine püskürtüldü.

Lymantria dispar nüklear polihedrozis virüs (LdNPV)'ünün hazırlanması: Toprakla karıştırılmış olarak stoklanmış *Lymantria dispar* nüklear polihedrozis virüs (LdNPV)'ünden 2 gr alındı ve 5 ml PBS içerisinde çözüldü ve bunlardan 1 ml besin üzerine püskürtüldü.

Bakteriyal klonların hazırlanması: *Bacillus thuringiensis*'in *cry IVA* (pHE4-A), *cry IVA* ve *cry IVD* (pHE4-AD), *cry IVA* ve 20-kDa-protein (pHE4-AR) ve *cry IVA*, *cry IVD* ve 20-kDa-protein (pHE4-ADR) genlerinin her birini içeren plazmidlerle transform olmuş *Escherichia coli* hücrelerinin 37°C'de gece kültürleri hazırlandı. Yoğunlukları OD₆₀₀'de 1.89'ayarlandı (1.89x10⁹/ml). Daha sonra 2000xg'de 10 dakika santrifüj edildi (27). Oluşan pellet 5 ml PBS içersinde çözüldü ve bunlardan 1 ml besin üzerine püskürtüldü.

2.4.2. Biyolojik Numunelerin İnsektisidal Testleri

Her bir biyolojik ajanın etkisini ölçmek için 20'şer larvadan oluşan, 8 grup numuneler için, 2 grupta kontrol olmak üzere 10 tane deney grubu oluşturuldu. Bunun için 8 cm çapında, 3 cm derinliğinde bir plastik kap içine *E. chrysorrhoea*'nın doğal olarak beslendiği fındık yapraklarından konuldu. Her kaptaki yapraklar üzerine bir numuneden olacak şekilde 1ml püskürtüldü. İki kontrol grubundan biri üzerine su püskürtülmüş yapraklar ile diğeri de numunelerin çözüldüğü PBS püskürtülmüş yapraklar ile beslendi. Her kaba 20 tane ikinci-üçüncü instar larva konularak kabın ağzı hava alacak şekilde kapatıldı. Bütün deney grupları 26± 2°C'de ve %60 nem içeren iklim dolabına 12:12 ışık peryodunda konuldu. Her 24 saatte bir besinleri taze yapraklar ile değiştirildi ve ölen larvalar çıkartıldı (28). Sekiz gün boyunca larval ölüm gözlemlendi. Bundan sonra ölüm olmadığı için deneye son verildi.

2.5. *Euproctis chrysorrhoea*'da Parazit Varlığının Belirlenmesi

Makroskopik inceleme sonucunda yavaş hareket eden ve iştahsız gözüken larvalar parazit olup olmadığının tespiti için incelemeye alındı. Bunun için içi parafinle doldurulmuş bir Petri kabı içine bir miktar fizyolojik su (%0.6-0.8'lik NaCl solüsyonu) konuldu (20). Larvalar bu kaba alındı, binoküler mikroskop kullanarak sırt kısmından

arkadan öne doğru ince bir makas ile iç organları zedelenmeyecek şekilde açıldı. Önce makroskopik olarak incelenerek gözle görülebilir bir parazit varlığı tespit edilmeye çalışıldı. Daha sonra mikroskopik inceleme için, Malpigi tüpleri, yağ dokusu, trakeler, gonadlar, ortabağırsak ve hemolenften değişik parçalar alınarak lam üzerine konuldu. Yeterince fizyolojik su ilave edilerek lamel kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi. Böcek vücudu içinde tespit edilen makroskopik organizmalar dikkatlice alınarak bir miktar fizyolojik su ile birlikte lam üzerine yerleştirildi. Bulunan parazitlerin boyları ölçüldü ve vücutlarının değişik bölümlerinin fotoğrafları çekildi.



3. BULGULAR

Bu çalışmada *Euproctis chrysorrhoe* (altın kelebek)'nin mikrobiyal florası belirlenmeye çalışıldı. Elde edilen bakteriyal izolatların ve literatürde var olan sekiz farklı biyolojik ajanın bu zararlı üzerindeki insektisidal etkisi araştırıldı. Çalışmalar sonucunda 6 bakteri ve bir nematod izole edildi.

Elde edilen izolatların tür tayinlerinin yapılabilmesi için çeşitli boyama, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulandı. İzole edilen nematodun sistematikteki yeri tespit edilmeye çalışıldı ve vücudunun değişik bölümlerinin fotoğrafları çekildi.

3.1. Larvalardan Bakteri İzolasyonu

Yüzey sterilizasyonu yapılmış larvanın steril koşullarda hemolenfinden alınan bir miktar sıvının seyreltilerek nutrient agar üzerine ekim yapılması sonucunda değişik petrielerde 6 farklı koloninin oluştuğu görüldü. Bunlar izolat 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 olarak numaralandırıldılar. Bu izolatların herbirinin koloni renk ve morfolojileri birbirinden farklıdır (Çizelge 1). Yapılan incelemeler neticesinde 1 nolu izolatin beyaz, düzgün ve yuvarkak, 2 nolu izolatin şeffaf, düzgün ve yuvarlak, 3 nolu izolatin krem, saçaklı ve yuvarlak, 4 nolu izolatin açık sarı, düzgün ve yuvarlak, 5 nolu izolatin krem, dalgalı ve konsantrik, 6 nolu izolatin krem, dalgalı ve yuvarlak olduğu belirlendi.

3.1.1. Bakteri İzolatlarının Çeşitli Boyama ve Morfolojik Özellikleri

İzolatların çeşitli boyama ve morfolojik özellikleri Çizelge 1'de görülmektedir. Yapılan basit boyama sonucunda 1, 3, 5 ve 6 nolu izolatların basil formunda, tek veya zincir, 2 nolu izolatin kokkobasil formunda, 4 nolu izolatin ise kok formunda tekli, dörtlü veya daha fazla gruplar halinde oldukları görüldü. Bu izolatların gram boyamaları sonucunda 1 nolu izolatin pembe renge boyandığı için gram olumsuz (G -), 2, 3, 4, 5 ve 6 nolu izolatların ise mor renge boyandıkları için gram olumlu (G +)

Çizelge 1. *Euproctis chrysothoea*'dan elde edilen bakteriyel izolatların morfolojik ve büyüme özellikleri

İzolat No	1	2	3	4	5	6
Koloni rengi	Beyaz	Şeffaf	Krem	Açık sarı	Krem	Krem
Koloni şekli	Düzgün, yuvarlak	Düzgün, yuvarlak	Saçaklı, yuvarlak	Düzgün, yuvarlak	Dalgalı, konsantrik	Dalgalı, yuvarlak
O ₂ ihtiyacı	Fakültatif anaerobik	Aerobik	Aerobik	Aerobik	Fakültatif anaerobik	Fakültatif anaerobik
Nutrient brot. görünüşü	Bulanık	Açık	Bulanık	Bulanık	Bulanık	Bulanık
Gram boyama	-	+	+	+	+	+
Kapsül boyama	ND	-	-	-	-	-
Spor boyama	-	-	+	-	+	+
Spor şekli	ND	ND	Elipsoid	ND	Elipsoid	Elipsoid
Spor formu	ND	ND	Sentral	ND	Terminal	Terminal
Boy (µm)	1.7-2	1.1-1.3	2.1-2.5	ND	2.2-3.1	2.1-2.8
Çap (µm)	0.6-0.8	0.8	0.7-0.9	0.3-0.5	0.6-1	0.6-1
Hareket	+	+	+	-	+	+

ND: Belirlenmedi

Rakamlar izolat numaralarını göstermektedir

oldukları belirlendi. Yapılan spor boyama neticesinde 3, 5 ve 6 nolu izolatin 3-5 günde endospor oluşturduğu görüldü. Yapılan hareket testi ile 1, 2, 3, 5 ve 6 nolu izolatlardan hareketli, 4 nolu izolatin ise hareketsiz olduğu gözlemlendi. Koloni rengi bakımından bu altı izolati karşılaştırdığımızda, 1 nolu izolatin beyaz, 2 nolu izolatin şeffaf, 3, 5 ve 6 nolu izolatlardan krem, 4 nolu izolatin ise açık sarı renginde olduğu tespit edildi. Koloni şekilleri bakımından ise 1, 2 ve 4 nolu izolatlardan düzgün yuvarlak 3 nolu izolatin saçaklı yuvarlak, 5 nolu izolatin dalgalı konsantrik, 6 nolu izolatin ise dalgalı yuvarlak olduğu belirlendi. İzolatların ihtiyaç duydukları oksijeni kullanmalarına göre 1, 5 ve 6 nolu izolatlardan fakültatif anaerobik, 2, 3 ve 4 nolu izolatlardan ise aerobik oldukları tespit edildi. Bu altı izolatin nutrient broth besiyerinde görünüşlerine bakıldığında, sadece 2 nolu izolatin açık diğerklerinin ise bulanık renkte oldukları görüldü.

3.1.2. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

İzolatların fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri Çizelge 2’de gösterilmiştir. Bakterilerin büyümeleri üzerine etkili olan faktörlerden sıcaklık, pH, NaCl’e karşı tolerans ve atmosferik oksijen ihtiyaçları gibi fiziksel etkilerin araştırılması amacıyla testler yapıldı. Yapılan testler sonucunda 1, 3 ve 5 numaralı izolatların optimum olarak 32°C’de büyüdüğü, minimum-maksimum büyüme sıcaklıklarının 30-38°C olduğu görüldü. 2, 4 ve 6 nolu izolatlar optimum olarak 38°C’de büyürken minimum-maksimum büyüme sıcaklıklarının 30-48°C olduğu belirlendi.

1 ve 5 nolu izolatlar pH 5.7’de zayıf olarak büyürken, 2 ve 3 nolu izolatlar pH 5.7’de büyümediler. 4 ve 6 nolu izolatların ise pH 5.7’de tam olarak büyüdüğü belirlendi.

İzolatların NaCl’e olan toleranslarının belirlenmesi amacıyla yapılan testler sonucunda bütün izolatların %2, 3 ve 5 NaCl içeren besiyerde büyüdüğü; %7 NaCl içeren besiyerde 2 ve 3 nolu izolatların zayıf büyüdüğü, 1, 4, 5 ve 6 nolu izolatların tam büyüdüğü; %10 NaCl içeren besiyerde ise 1 ve 2 nolu izolatların büyümediği, 3 nolu izolatin zayıf büyüdüğü, 4, 5 ve 6 nolu izolatların tam büyüdüğü tespit edildi.

İzolatların lizozimde büyüme özelliklerinin incelenmesi için yapılan testler sonucunda, 1, 3, 4, 5 ve 6 nolu izolatların tam büyüdüğü, 2 nolu izolatin ise zayıf büyüdüğü gözlemlendi.

Atmosferik oksijen ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla yapılan testler sonucunda 1, 2, 3 ve 4 nolu izolatlar sadece aerobik şartlarda büyürken, 5 ve 6 nolu izolatlar hem aerobik hemde aneorobik şartlarda büyüme gösterdiler.

İzole edilen bakterilerin bazı organik maddeleri hidroliz edip etmediklerini belirlemek için değişik testler yapıldı. Bu testler sonucunda 1 nolu izolatın nişastayı hidroliz ettiği, 2, 3, 4, 5 ve 6 nolu izolatların ise nişastayı hidroliz etmediği gözlemlendi. Jelatin testi sonucunda 1, 2, ve 3 nolu izolatların jelatini hidroliz etmedikleri 4, 5 ve 6 nolu izolatların ise jelatini hidroliz ettikleri gözlemlendi. Üre testi sonucunda ise bütün izolatların üreyi hidroliz etmedikleri belirlendi.



Çizelge 2. *Euproctis chrysorrhoea*'dan elde edilen bakteriyal izolatların biyokimyasal özellikleri

İzolat no	1	2	3	4	5	6
Nitrat indirgeme	+	-	-	+	+	+
Katalaz testi	+	-	-	+	W	+
İndol	-	-	-	-	-	-
Voges-Pros.tes.	+	W	-	-	-	+
H ₂ S üretimi	-	-	-	-	-	-
%2 NaCl büy.	+	+	+	+	+	+
%3 NaCl büy.	+	+	+	+	+	+
%5 NaCl büy.	+	+	+	+	+	+
%7 NaCl büy.	+	W	W	+	W	+
%10 NaCl büy.	-	-	W	+	-	W
Lizozimde büy.	+	+	+	+	+	+
28°C büyüme	+	+	+	+	+	+
30°C büyüme	+	+	+	+	+	+
45°C büyüme	-	+	-	+	-	+
50°C büyüme	-	-	-	-	-	-
Jelatin hidroliz	-	-	W	+	+	+
Üre hidroliz	-	-	-	-	-	-
Sitrat kullanım	+	-	-	-	-	+
Propionat kullanım	W	-	-	-	-	+
5.7 pH'da büy.	W	-	-	+	W	W
pH>7 MVRP broth'ta büyüme	ND	W	+	+	+	+
pH< 6 MVRP broth'ta büyüme	ND	-	W	+	W	W
Glukoz fer.	+	+	-	+	+	+
Arabinoz fer.	-	-	-	-	-	+
Ksiloz fer.	-	W	-	-	-	-
Mannitol fer.	+	+	-	+	+	+
Maltoz fer.	-	+	-	+	+	+
Laktoz fer.	+	+	-	W	W	-
Sukroz fer.	+	+	-	+	+	+
Optimum pH	7-8	6-8	5.5-8	7	7	6-7
Optimum ısı (°C)	32	38	32	38	32	38
Anaerobik büy.	-	-	-	-	+	+
Glukozdan gaz oluşturma	W	-	-	-	-	-

W: Zayıf büyüme, ND: Belirlenmedi

Rakamlar izolat numaralarını göstermektedir

İzolatların bazı enzim ve kimyasal maddeleri üretip üretmediklerinin tespiti için yapılan testler sonucunda 1, 3, 4, 5 ve 6 nolu izolatların katalaz enzimi üretirken, 2 nolu izolatın üretmediği ve bütün izolatların oksidaz enzimi ürettiği tespit edildi.

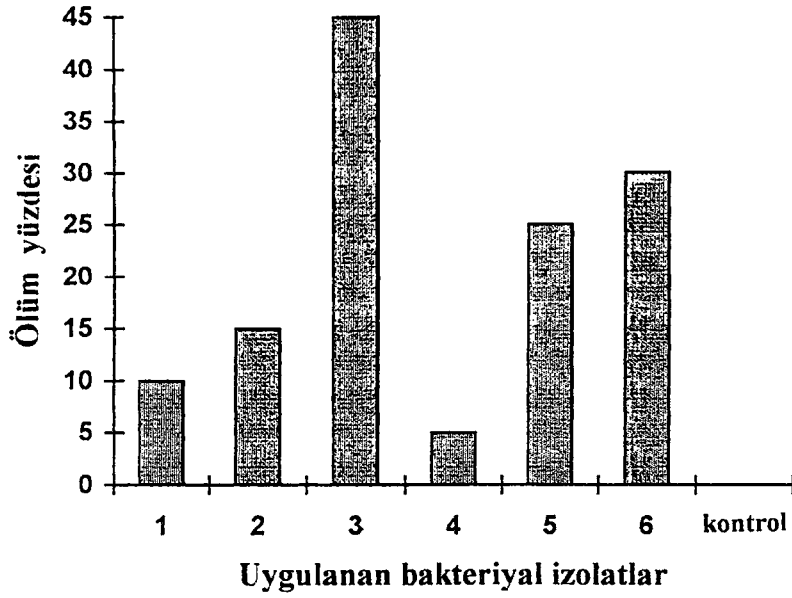
İzolatların sitrat ve propionatı kullanımları ve nitratı indirgeme kabiliyetleri sınıflandırmada kullanılan diğer özelliklerdendir. Yapılan testler sonucunda 1, 5 ve 6 nolu izolatlar sitrat ve propionatı kullanırken 2, 3 ve 4 nolu izolatlar sitrat ve propionatı kullanmadılar. Nitrat testi sonucunda 1, 4, 5 ve 6 nolu izolatlar nitratı indirgediği, 2 ve 3 nolu izolatların ise nitratı indirgemediği belirlendi.

Bakterilerin karbonhidratları fermente edip etmediklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testler sonucunda, 1, 2, 4, 5 ve 6 nolu izolatların glukozu fermente ettikleri, 3 nolu izolatın glukozu fermente etmediği görüldü. 1, 2, 4 ve 5 nolu izolatların laktozu fermente ettiği, 3 ve 6 nolu izolatın laktozu fermente etmediği tespit edildi. 1, 2, 4, 5 ve 6 nolu izolatların mannitolü fermente ettiği, 3 nolu izolatın mannitolü fermente etmediği belirlendi. 1, 2, 3, 4 ve 5 nolu izolatların arabinozu fermente etmediği, 6 nolu izolatın arabinozu fermente ettiği tespit edildi. 2, 5 ve 6 nolu izolatların ksilolü fermente ettiği, 1, 3 ve 4 nolu izolatların fermente etmediği tespit edildi.

Yapılan Voges- Proskover testi sonucunda, 1 ve 6 nolu izolatların glukoz metabolizması neticesinde asetilmetilkarbinol gibi asidik olmayan veya nötral son ürünleri üretebildikleri gözlemlendi. Diğer izolatların ise üretmedikleri görüldü.

3.2. Bakteriyal İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

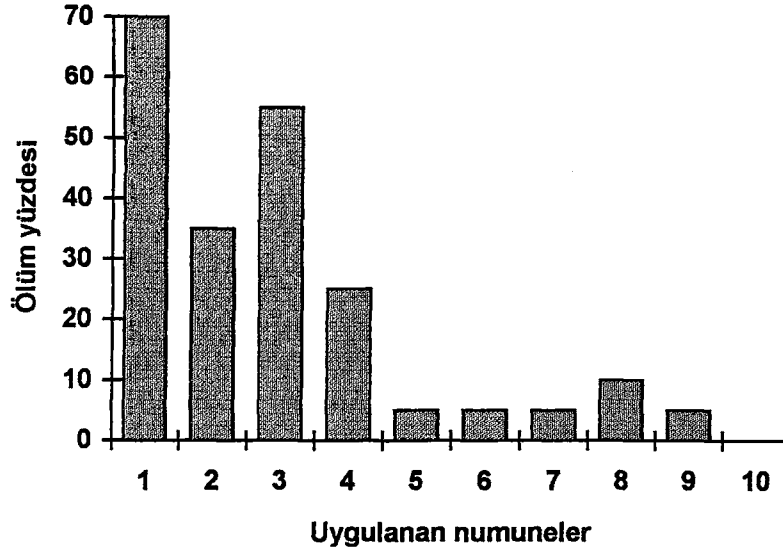
Elde edilen izolatların *Euproctis chrysorrhoea* karşı insektisidal etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan 10 günlük test sonucunda 1 nolu izolatın %10, 2 nolu izolatın %15, 3 nolu izolatın %45, 4 nolu izolatın %5, 5 nolu izolat %25 ve 6 nolu izolatın %30'luk bir insektisidal etki gösterdiği belirlendi. Bu sonuçlar Şekil 3'te gösterilmektedir.



Şekil 3. Bakteriyal izolatların *Euproctis chrysorrhoea* üzerindeki insektisidal etkileri

3.3. *Euproctis chrysorrhoea*'ya Karşı Çeşitli Biyolojik Ajanların İnsektisidal Etkilerinin Araştırılması

Bazı biyolojik ajanların bu zararlı üzerindeki insektisidal etkilerini belirlemek için yapılan bu çalışma sonucunda, *Euproctis chrysorrhoea* larvaları üzerinde *Lymantria dispar* nüklear polihedrosis virüsü (LdNPV) ile %70, *Autographa californica* nüklear polihedrosis virüsü (AcNPV) ile %35, *Bacillus thuringiensis*'in HD-1 toksini ile %55, BTS-1 toksini ile %25, bakteriyal klonlardan pHE4-A ile %5, pHE4-AD ile %5, pHE4-AR ile %5 ve pHE4-ADR ile %10'luk insektisidal etki elde edildi (Şekil 4). Bu ajanlardan etkilenen larvaların genellikle kaplar içinde dağınık olarak buldukları, iştahsız oldukları ve yavaş hareket ettikleri, sağlıklı larvaların ise beslenmeden sonra bir araya gelerek gruplar oluşturdukları gözlemlendi. Kontrol grubu olarak suyun bulunduğu kaptaki hiç ölüm olmadı. Buna karşın diğer bir kontrol grubu olan PBS bulunan kaptaki ise %5'lik bir ölüm gözlemlendi.



Şekil-4. Biyolojik numunelerin *Euproctis chryorrhoea* üzerindeki insektisidal etkileri. 1: LdNPV, 2: AcNPV, 3: HD-1, 4: BTS-1, 5: pHE4-A, 6: pHE4-AD, 7: pHE4-AR, 8: pHE4-ADR, 9: PBS, 10: Su

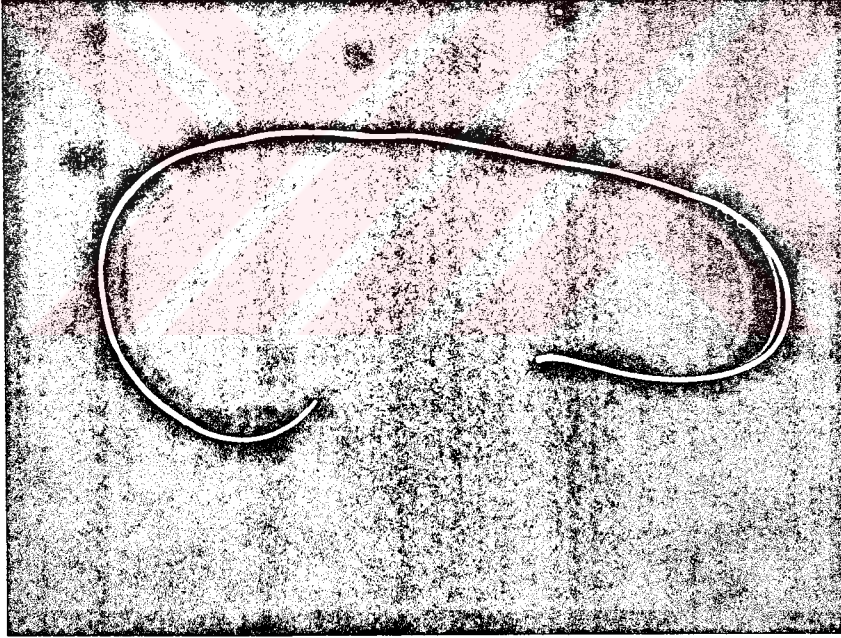
3.4. *Euproctis chryorrhoea*'dan Parazit İzolasyonu

Parazit tespiti için Trabzon ve Gümüşhane'den toplanan 321 larvaların diseksiyonu boyunca, Trabzon'da toplanan larvaların hiç birinde parazit tespit edilemezken, Gümüşhane'den toplanan 32 larvanın 28 tanesinden 64 adet nematod izole edildi. Genellikle her bir larvadan 2 nematod izole edilirken, sekiz larvadan 3'er nematod izole edildi. İzole edilen nematodlar larvaların vücut boşluğunda kıvrılmış haldeydiler. Bunlardan başka 12 nematod'un içinde geliştikleri larvaları öldürerek kendiliğinden dışarı çıkıp serbest kaldıkları gözlemlendi. Böcekten izole edilen nematodların ince, beyaz ve iplik benzeri şekilde oldukları, boylarının enlerinden 100 kattan daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 5). Yapılan ölçümler sonucunda enlerinin 0.2-0.3 mm, boylarının 80-150 mm olduğu tespit edildi. Trabzonda toplanan larvalardaki parazitizasyon %0 iken, Gümüşhane'den toplanan larvalarda %87.5 olarak tespit edildi.

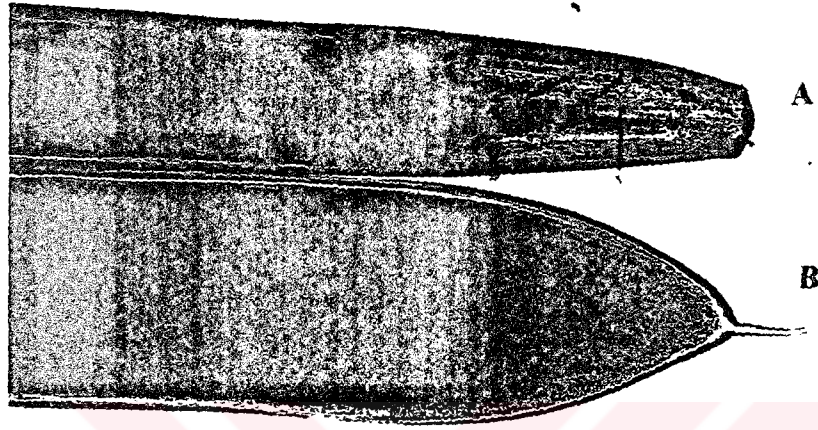
Yapılan morfolojik çalışmalar sonucunda nematodun baş bölgesinin küt şeklinde olduğu, arka uç kısmında ise 0.1 mm uzunluğunda bir çıkıntıya sahip olduğu belirlendi (Şekil 6).

Çizelge 3. Trabzon ve Gümüşhane'den toplanan *Euproctis chrysorrhoea* larvalarında parazitizasyon varlığı

Larvaların top. yer ve zaman	İncelenen larva say.	Parazit tespit edilen larva say.	Parazitizasyon oranı (%)
Trabzon			
23.04.1995	126	-	0
12.05.1996	162	-	0
Gümüşhane			
16.06.1997	32	28	87.5
Toplam	321	28	8.7



Şekil 5. *Euproctis chrysorrhoea*'dan izole edilen enfeksiyon özelliğine sahip nematod



Şekil 6. *Euproctis chrysorrhoea*' dan izole edilen nematodun ışık mikroskopunda görünümü. A) Anteriör B) Posteriyör
Ölçek: 0.1 mm

4. TARTIŞMA

Modern ziraatta böcek zararlılarını kontrol etmek için çok sayıda çeşitli insektisidler kullanılmaktadır. Bununla birlikte kimyasal insektisidlerin zararlı etkileri iyice tanımlanmıştır (2, 29, 30). Son zamanlarda, insektisidlerin yan etkilerinin ortaya çıkartılması bilim adamlarını daha etkili ve güvenli kontrol ajanları bulmaya yöneltmiştir.

E. chrysorrhoea'nın bakteriyal flora ve biyolojik mücadele ajanının araştırılmasının amaçlandığı bu çalışma sonucunda, 6 bakteri ve 1 nematod izole edilmiş, bu bakteri izolatları ile literatürde mevcut olan 8 farklı biyolojik ajanın insektisidal etkileri test edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, 1 nolu izolat gram (-), endosporsuz, basil formunda, hareketli ve fakültatif anaerobik olduğundan dolayı *Enterobacter*; 2 nolu izolat gram (+), endosporsuz, mikroaerobik, hareketli, kokkobasil formunda olduğu için *Lactobacil*; 3, 5 ve 6 nolu izolatlar gram (+), endosporlu, hareketli ve basil formunda olduğu için *Bacillus*; 4 nolu izolat ise gram (+), sporsuz, aerobik, hareketsiz ve kok formunda olduğu için *Micrococcus* cinsine dahil edildi. 3 nolu izolatin yapılan testler sonucunda 5 ve 6 nolu izolatlardan farklı özelliklere sahip olduğu, daha çok *B. sphaericus*'a yakın bir tür olduğu tespit edildi. Literatürde *E. chrysorrhoea*'dan bakteri izolasyonuna rastlanılmamıştır. Sadece bu zararlının %4 oranında bakteri ile enfekte edildiği tespit edilmiştir (31). Ancak, farklı Lepidoptera üyelerinden *Aerobacter* sp., *B. thuringiensis*, *E. coli*, *Micrococcus luteus* ve *Pseudomonas* sp. türleri izole edilmiştir (27). Yine *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* türlerinin bu zararlı üzerindeki etkileri çalışılmıştır (32, 33).

Elde edilen izolatların *E. chrysorrhoea*'nın larvaları üzerine insektisidal etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışma sonucunda en yüksek insektisidal etkiyi %45'lik bir oranla 3 nolu izolat (*Bacillus* sp.) gösterdi. Bunu %30'luk bir oranla 6 nolu izolat (*Bacillus* sp.) ve %25'lik bir oranla 5 nolu izolat (*Bacillus* sp.) takip etti. Diğer izolatlar çok düşük etki gösterdi. *Bacillus* cinsine dahil edilen izolatların daha etkili oluşu sonuçlarımızı teyit etmektedir. Çünkü *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* türleri ile yapılan çalışmalarda yüksek oranda farklı insektisidal etkiler elde edilmiştir (32, 33).

Literatürde mevcut olan biyolojik ajanların insektisidal etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda en büyük etkiyi *Lymantria dispar* nüklear polihedrozis virüsü (LdNPV) gösterdi. LdNPV bulunan kaplarda %75'lik bir ölüm oranı gözlemlendi. Ölü larvalar koyu-lacivert bir renk aldılar. Kontrol grubu olarak alınmış PBS bulunan kapta %5'lik bir ölüm oranı, su bulunan kapta ise hiç ölüm gözlenmemiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında LdNPV %70'lik bir etkiye sahip olduğu ortaya çıkmaktadır. Bulgaristan'da 1984 yılında nüklear polihedrozis virüsü kullanılarak *E. chrysorrhoea* larvaları üzerinde %100'lük bir mortalite elde etmişlerdir (34). Bu, bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. *Autographa californica* nüklear polihedrozis virüsü (AcNPV) ise LdNPV kadar etkili olmadı. LdNPV'nin yüksek insektisidal etkiye sahip olması *E. chrysorrhoea* ile aynı familyadan olan *Lymantria dispar*'dan izole edilmiş olmasıyla açıklanabilir. Bu durumda virüslerin yüksek ölçüde seçici olmasından ileri gelmektedir.

B. thuringiensis'in iki toksininden en büyük etkiyi HD-1 gösterdi. HD-1 etkisiyle ölen larvaların vücudu esnekliğini kaybetti ve koyu lacivert bir renk aldı. Bu toksinin bulunduğu kapta %60'lık bir mortalite gözlenmiştir. Kontrol grubundaki %5'lik ölümü çıkarttığımızda HD-1'in %55'lik bir etkiye sahip olduğu ortaya çıkmaktadır. Gorbunov ve Mishnev'in (35) *E. chrysorrhoea* larvaları üzerinde *B. thuringiensis*'den elde edilen Dendrobacillin ile yaptıkları deneyin sonuçları bizim sonuçlarımızı teyit etmektedir. BTS-1 toksini HD-1'e oranla daha düşük bir mortalite gösterdi.

E. coli klonları larvalar üzerinde çok düşük etki gösterdiler. Ben-Dov ve arkadaşları 1994'te sivrisinek larvaları üzerinde pHE4-A için %55'lik, pHE-AR için %48'lik, pHE4-AD için %95'lik ve pHE4-ADR için %90'lık bir mortalite elde etmişlerdir (28). Bu sonuçlarla bizim sonuçlarımızı karşılaştırdığımızda, *E. coli* klonlarının *E. chrysorrhoea* larvaları üzerinde etkili olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Çünkü farklı *B. thuringiensis* genlerini ihtiva eden suşlar farklı böcek grupları üzerinde farklı oranlarda etkili olmaktadır.

Sonuç olarak, uygulanan sekiz farklı biyolojik ajanın etkilerine baktığımızda *Lymantria dispar* nüklear polihedrozis virüsü (LdNPV) ve *B. thuringiensis*'in Harry Dumagae suşundan izole edilmiş toksin (HD-1) ekonomik olarak büyük zararlar veren *E. chrysorrhoea* ile biyolojik mücadelede etkili bir şekilde kullanılabilir.

E. chrysoorrhoea larvaları üzerinde parazit varlığının tespiti için yapılan çalışmalar sonucunda izole edilen nematod ince, uzun iplik benzeri, düzgün yüzeyle olması ve arka uç kısmında bir çıkıntıya sahip olması nedeniyle Mermithidae familyasına dahil edildi. Trabzon ve çevresinden toplanan larvalarda hiç bir nematoda rastlanmaz iken Gümüşhane ve çevresinden toplanan larvalarda %87.5 oranında parazitizasyonun olması bu mermithidin bu bölgedeki *E. chrysoorrhoea* larvalarında yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda Türkiye’de ve diğer ülkelerde *E. chrysoorrhoea*’dan herhangi bir mermithid izolasyonunun yapılmadığı belirlenmiştir. Dolayısıyla bu izole edilen mermithid Türkiye’de ilk yapılan izolasyondur. Lepidoptera grubu üyelerinde en çok rastlanılan mermithid *Hexameris ablicans* türüdür (19). Susam bitkisinde zararlı, bir Lepidopter olan *Antigastra catalaunis* üzerinde *Hexameris ablicans* ile %73’lük bir enfeksiyon, pamuk zararlısı *Achra janata* üzerinde %92.5’lik bir enfeksiyon tespit edilmiştir (36). Bir başka Lepidopter olan pirinç zararlısı *Tryporyza incertulae* üzerinde *Hexameris cathetospicula* varlığı tespit edilmiştir (37). Yine *E. chrysoorrhoea* çok yakın bir tür olan *L. dispar* tırtıllarına bu mermithidin %60 oranında zarar verdiği tespit edilmiştir (38). Yine bu zararlı üzerinde Almanya’da bir mermithid izole edilmiştir (39). Ayrıca *E. chrysoorrhoea*’ya yakın bir başka tür olan *Hyphantria cunea* üzerinde de *Hexameris* cinsine ait mermithidler izole edilmiştir (40).

İzole edilen mermithidin morfolojik özelliklerinin incelenmesi sonucunda *Hexameris ablicans*’a benzer özelliklere sahip olduğu tespit edildi. Ancak izole edilen mermithidin boyunun *Hexameris ablicans*’tan daha kısa olması, izolatanın bu türe yakın farklı bir tür olduğu sonucunu göstermektedir. Bu türün hem Türkiye hem de dünyanın diğer ülkeleri için *E. chrysoorrhoea*’dan izole edilen yeni bir kayıt olduğu düşünülmektedir. Ancak bu türün kesin tayini, elektron mikroskobu ile yapılan anatomik çalışmalar sonucunda gerçekleştirilecektir.

5. SONUÇLAR

1) Sonuç olarak bu çalışmada, önemli bir bitki zararlısı olan *Euproctis chrysorrhoea*'nın bakteriyal florası belirlendi.

2) Larvalardan 6 farklı bakteri izole edildi. Elde edilen izolatların yapılan morfolojik, boyama, fizyolojik ve biyokimyasal testleri sonucunda *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* ve *Bacillus* cinslerine ait oldukları tespit edildi.

3) İzolatların insektisidal etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda *Bacillus* cinsine dahil edilen izolatların daha yüksek etkiye sahip oldukları belirlendi.

4) Literatürde mevcut olan sekiz farklı biyolojik ajanın bu zararlı üzerindeki insektisidal etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda *Lymantria dispar* nüklear polihedrozis virüsünün (LdNPV) ve HD-1 toksininin en yüksek insektisidal etkiye sahip oldukları belirlendi.

5) Bu zararlıda parazit varlığının tespiti amacıyla yapılan diseksiyon sonucunda Mermithidae familyasına ait bir nematod belirlendi. Yapılan morfolojik çalışmalar sonucunda bu nematodun *Hexameris ablicans*'a yakın bir tür olduğu sonucuna varıldı.

6. ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda *Bacillus* cinsine dahil edilen izolatların %45'e varan bir etkiye sahip olması, test edilen biyolojik ajanlardan LdNPV ve HD-1'in *E. chrysorrhoea* üzerinde yüksek insektisidal etki göstermeleri ve belirlenen mermithidin %87.5'lik bir parazitizasyonunun belirlenmesi bu zararlı ile mücadelede daha etkili ve çevreye daha az zarar veren bir mücadele yönteminin bulunması açısından büyük öneme sahiptir.

Elde edilen bu bilgiler, bu çalışmada kullanılan metod ve yöntemler gelecekte daha etkili bir biyolojik ajan geliştirilmesinde araştırmacılara yol gösterecektir.



7. KAYNAKLAR

1. Peter, G., Plant Pests and Their Control, Fenemore, London, 1984.
2. Ecevit, O., Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, Samsun, 1988.
3. National Reserch Council, Subcommite on Insect Pest, Insect-Pest Manegement and Control, Washington, 1984.
4. Çanakçıoğlu, H., Orman Entemolojisi, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 1983.
5. Eroğlu, M., *E. chrysorrhoea* (L.) (Lep., Lymantriidae)'nin Biyolojisi ve Zararları Üzerine Araştırmalar, Türkiye II. Entemoloji Kongresi, Adana, 1992.
6. Lipa, J., J., A New *Nosema* sp. of *Euproctis chrysorrhoea* L., Coll. Int. Pathol. Insectes, Paris (1962).
7. Grill, D., Caldumbide, C., The brown tail moth in Loire- Atlantique, Phytoma, 392 (1987) 60-61.
8. Kelly, P., M. ve Speight, M.,R., The Potential Development of A Viral Control Agent for The Brown Tail Moth, *Euproctis chrysorrhoea* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae), Aspects of Applied Biology, 17,2 (1988) 247-248.
9. Cunningham, J., C. ve Longworth, J., F., The Identification of Some Cytoplasmic Polyhedrosis Viruses, J. Invert. Path., New York, 11,2 (1968) 196-202.
10. Acatay, A., Türkiye Orman Böcekleri ve Muhiti, İstanbul, 1953.
11. Çanakçıoğlu, H., Orman Entemolojisi, Genel Bölüm, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 1989.
12. Lipa, J. J., An Outline of Insect Patholoji, Warsaw, Poland, 1975.
13. Poinar, G.O., Identification of The Groups of Insect Patogens, Plenum Press, New York 1978.
14. Arif, B. ve Kurstak, V., Viruses of Invertebrates, New York, USA, Marcel Dekker, Inc., 1991.
15. Gröner, A., Specificity and Safety of Baculoviruses: The Biology of Baculoviruses, Granados, R., ve Federici, B., (I). Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., 177, 1986.

16. Weiser, J., An Atlas of Insect Diseases, Publishing House of The Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1969.
17. Martignoni, M. E. ve Iwai, P. J., A Catalog of Viral Diseases of Insects, Mites, and Ticks, Fourth Edition, London, 1986.
18. Burges, H.D. ve Hussey, N.W., Microbial Control of Insects and Mites, Academic Press, London, New York, 1971.
19. Kaiser, H., Terrestrial and Semiterrestrial Mermithidae, In Manual of Agricultural Nematology, Edit.; Nickle, W. R., , Marcel Dekker, Inc., New York, 1991.
20. Lipa, J.J., Hernandez, P. ve Santiago, C., Gregarines (Eugregarinorida: Apicomplexa) in Natural Populations of *Dociostauraurus maroccanus*, *Calliptamus italicus* and other Orthoptera, Acta Protozoologica, 35 (1996) 49-59.
21. Benson, H.J., Microbiological Applications, a Laboratory Manual in General Microbiology, Brock, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, 1985.
22. Cappuccino, J.G. ve Sherman, N., Microbiology, a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York, 1992.
23. Canganella, F. ve Trovatelli, L.D., Ecological and Physiological Studies on Thermophilic Bacilli from Sulfataric Hot Springs of Central Italy, J. Basic Microbiol. 35,1 (1995) 9-19.
24. Sneath, A.P., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Sneath, A.P., Mair, N.S., Sharpe, M.S. ve Holt, J.G., Williams and Wilkins, Baltimore, 1986.
25. Lipa, J.J., Aldebis, H.K. ve Vargas, O., Occurrence, Biological Activity, and Host Range of *Entomopoxvirus B* from *Ocnogyna baetica* (Lepidoptera: Arctiidae), Journal of Invertebrate Pathology, 63 (1994)130-134.
26. Vaughn, J. L., Goodwin, R. M., Tomkins, G.T. ve Mccawley, P., The Establishment of Two Cell lines from The Insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). In Vitro, 13 (1977) 213-217.
27. Lipa, J.J., ve Wiland, E., Bacteria Isolated from Cutworms and Their Infectivity to *Agrotis* spp. (Lepidoptera, Noctuidae), Acta Microbiologica Polonica, 4,3 (1972) 127-140.
28. 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, 177(1995) 2851-2857.

29. Huber, J., Use of Baculoviruses as Pesticides: The Biology of Baculoviruses, Granados, R.R. ve Federici, B. A., (II). Boca Raton, Florida, CRS Pres, Inc.,181, 1986.
30. Bohmfalk, G.T., Practical Factors Influencing The Utilization of Baculoviruses as Pesticides: The Biology of Baculoviruses, Granados, R.R. ve Federici, B. A., (II). Boca Raton, Florida, CRS Pres, Inc.,223, 1986.
31. Purrini, K., Pathogens Infecting *Euproctis chrysorrhoea* in Kosova District, Yugoslavia, Anzeigen fur Schadlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz,48, 12 (1975) 182-184.
32. Currado, I. ve Brussing, G., Control Experiments with *Bacillus thuringiensis* Berl., in The Forests of Piemonte, Difesa della Pianta, 8, 2 (1985) 329-343.
33. Cabral, MTEC, The Effect of *Lymantria dispar* and *Euproctis chrysorrhoea* on The Activity of *Bacillus thuringiensis*, Anais do Instituto Superior de Agronomia, Universidade Tecnica de Lisboa, 37(1977)179-221.
34. Atasanov, A., Nuclear Polyhedrosis Virus in Larvae of The Brown-tail Moth, Rastitelna Zashchita, 32, 4(1984)30-31.
35. Gorbunov, A. F. ve Mishnev, A. K. Needle-eating pests of forest in southern Ukraine, Lesovodstvo-i-Agrolesomelioratsiya, 66 (1983) 53-58.
36. Chatterjee, P. N. ve Singh P., Mermithid Parasites and Their Roles in Natural Control of Insects Pests, Ind. For. 91(1965)714-721.
37. Poinar, G. O., Jr. ve Chang, P., *Hexameris cathetospiculae* n. sp. (Mermithidae: Nematoda), A Parasite of the Rice Stemborer, *Tryporyza incertulas* (Wlk.) (Pyralidae: Lepidoptera) in Malaysia, J. Nematol., 17 (1985) 360- 363.
38. Polozhentsev, A. P. ve Artyukhovsky, A. K., Beneficial Worm-Destroyers of the Gipsy Moth, Lesnoe Khozyastvo, 4 (1953) 46.
39. Fuester, R.W., Drea, J.J., Gruber, F. and Hoyer, H., Larval Parasites and Other Natural enemies of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) in Burgenland, Austria and Germany, Environmental Entomology, 12, 3 (1983) 724-737.
40. Wei, C.G. ve Wu, P.Y., Experiments on The Control of The Insect Pests of The Forest and Fruit Tree by Mermithid Nematodes, Natural Enemies of Insects, 6,1(1984) 43- 44.

8. EKLER

8.1. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar

8.1.1. Besiyeri ve Kimyasallar

Bakteriyolojik agar, agaroz, brain heart infizyon broth, glukoz, jelatin (Difco), nişasta, nutrient broth, nutrient agar, pepton, tripton soy broth, tryptic soy agar, tripton water

Amonyum asetat, amonyum oksalat, aseton (Carlo Erba), bovin serum albumin (BSA), brom fenol blue, diamonyum hidrojen fosfat, diketil α -naftolamin, etidium bromür, etilen diamintetraasetik asit (EDTA), fenol red, fenol: klorofolrm:İzoamilalkol, fenol, gliserol, guanidium thiocyanata, izoamil alkol, ksilen, kristal viyole, malaşit yeşili, metanol, pararosaline asetat, pararosaline hidroklorid (Sigma), p-dimetil amino benzaldehit, potasyum klorür, potasyum asetat, safranin, sitrik asit, sodyum klorür, sodyum molipten, sulfonilic asit, sodyum dodesil sülfat (SDS), syanol FF, sarkosyl, tannic asid (Merck), tris bazı, trisodyum sitrat, üre, yeast extract. Kullanılan tuz bileşikleri % 99 ya da daha saftırlar.

8.1.2. Besiyeri, Ayıraç ve Boyaların Hazırlanışı

8.1.2.1. Besiyerilerin Hazırlanışı

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

Gliserol agar: 100 ml nutrient agar, 1 g yeast extract, 2 ml gliserol karıştırılarak otoklavda steril edildi.

Fenilalanin agar: 3 g yeast extract, 2 g DL-fenilalanin, 1 g disodyum hidrojen fosfat, 5 g sodyum klorür, 12 g agar 1000 lt ddH₂O'da çözüldü, pH'sı 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, 0.2 g potasyum klorür, 0.2 g magnezyum sülfat, 0.2 g, yeast extract, 15 g agar 1000 ml ddH₂O'da çözüldü, pH'sı 7.0'a ayarlanmadan önce %0.04 (w/v) oranında hazırlanan bromcresol purple solusyonundan 15 ml ilave edildi, otoklavlanarak steril edildi.

Fermentasyon özelliklerine bakılacak şekerlerin hazırlanması: Öncelikle her bir besiyerin hazırlanacağı test tüpleri otoklavla steril edildi, %10 oranındaki karbohidrat solüsyonları ise filtreden geçirilmek suretiyle steril edildi. Daha sonra 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 99 ml steril nutrient brothla karıştırılarak besiyeri hazırlanmış oldu.

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

Nitrat broth: 5g pepton, 3g beef extract, 1g potasyum nitrat, 1.000 ml ddH₂O'da çözüldü, pH 7.0'a ayarlanarak otoklavda steril edildi.

Nutrient agar: 5 g pepton, 3 g beef extract, 15 g agar 1.000 ml ddH₂O'da çözüldü. Otoklavlanarak steril edildi. Çalışmada, ayrıca ticari olarak satılan nutrient agar kullanıldı.

Nutrient broth: 3 g beef extract, 5 g pepton 1.000 ml 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 120 g 1000 ml 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.

Sabouraud dextroz agar: 10 g pepton, 40 g dekstroz, 15 g agar 1.000 ml ddH₂O'da çözüldü, pH'ı 5.6'ya ayarlandı, otoklavlanarak steril edilerek kullanıldı.

Sabouraud dextroz broth: 10 g pepton, 20 g dekstroz, 15 g agar 1.000 ml ddH₂O'da çözüldü, pH'sı 5.6'ya ayarlandı ve otoklavlanarak steril edildi.

Sitrat ve propionat kullanım besiyerleri: 1 g trisodyum sitrat 2H₂O (veya 2g sodyum propionat), 1.2 g magnezyum sulfat 7H₂O, 0.5 g diamonyum hidrojen fosfat, 1 g potasyum klorür, 40 ml eser element solüsyonu, 15 g agar, 920 ml ddH₂O ve 20 ml %0.04'lük fenol red solüsyonu karıştırdı, otoklavlanarak steril edilmeden önce pH'sı 6,8'e ayarlandı. Eser element solüsyonu şöyle hazırlandı: 50 mg etilendiamintetraasetat, 200 mg FeSO₄.7H₂O, 10 mg ZnSO₄, 3 mg MnCl₂.4H₂O, 30 mg H₃BO₃, 20 mg CoCl₂.6H₂O, 1 mg CuCl₂.2H₂O, 2mg NiCl₂.6H₂O, 3 mg NaMoO₄2H₂O, 1000 ml ddH₂O'da çözümlenerek hazırlandı.

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

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

Voges-Proskover broth: 7 g pepton, 5 g glukoz, 5 g glukoz, 5 g sodyum klorür, 1.000 ml ddH₂O'da çözüldü, pH'ı 6.5'e ayarlandı, otoklavlanarak steril edildi.

8.1.2.2. Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı

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

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

Jelatin hidrolizi ayıracı: Sodyum sülfat (Na_2SO_4) ile doyurulmuş $1\text{NH}_2\text{SO}_4$ ayıraç olarak kullanıldı.

Flagella boyası: Flagellaların boyanması için gerekli olan boya üç farklı solüsyondan oluşmaktadır. A) 0.9 pararosaline asetat ve 0.3 g pararosaline hidroklorid 100 ml %95'lik etil alkolde çözüldü. Solüsyonun tam karışması için bir gece oda sıcaklığında saklandı. B) 3 g tannik asit 100 ml dH_2O 'da çözümlenerek hazırlandı. Sonuçta hazırlanan bütün bu solüsyonlar birbirine karıştırılarak flagella boyası hazırlanmış oldu. Karışım iki saat $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletildikten sonra kullanıldı.

İyot çözeltisi: 1 g iyot 2 g potasyum iyodür, 60 ml %5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO_3), 240 ml distile H_2O ile karıştırılarak hazırlandı.

Katalaz ayıracı: Ayıraç olarak %10'luk hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi kullanıldı.

Nitrit ayıracı: Bu ayıraç ortamdaki nitratın nitrate indirgenip indirgenmediğinin ortaya çıkarılması için kullanıldı. Bu amaçla iki ayrı ayıraç kullanıldı. Ayırıcılardan birincisi 1 N hidroklorik asit solüsyonudur. Kullanılan diğer ayıraç ise şu şekilde hazırlandı. A) 8 g sulfonilik asit, 5 N asetik asit 1.000 ml distile suda çözüldü. B) 6 ml dimetil α -naftolamin, 5 N asetik asit 1000 ml distile suda çözümlenerek hazırlandı.

Safranin: 2.5 g safranin O, 100 ml dH_2O 'da çözüldü, süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek kullanıldı.

Kristal viyole boyası: Bu boya iki ayrı solüsyon halinde hazırlanıp ardından ikisi birbirine karıştırıldı. A) 1 g kristal viyole, 10 ml etanol, 90 ml distile su ile karıştırıldı. B) 4 g amonyum oksalat ve 400 ml dH_2O karıştırıldı. Bu her iki solüsyon hazırlandıktan sonra birbirine karıştırılarak kullanıldı.

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

Pikrik asit: Katı haldeki pikrik asitten 1 g alınarak 100 ml dH_2O içinde çözüldü.

9. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Çarşamba'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Çarşamba'da tamamladıktan sonra 1989-1990 öğretim yılında K.T.Ü. Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 1993 yılında bu bölümden biyoloji öğretmeni ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl M.E.B'na bağlı olarak öğretmenliğe başladı. 1994 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve şu anda M.E.B'na bağlı olarak öğretmenlik görevine devam etmektedir.

