

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***GRYLLOTALPA GRYLLOTALPA*'NİN BAKTERİYAL FLORASININ  
VE BİYOLOJİK MÜCADELE AJANLARININ ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ŞERİFE İŞÇİ**

**TEMMUZ 2009  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***GRYLLOTALPA GRYLLOTALPA*'NİN BAKTERİYAL FLORASININ  
VE BİYOLOJİK MÜCADELE AJANLARININ ARAŞTIRILMASI**

**ŞERİFE İŞÇİ**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 10. 07. 2009  
Tezin Savunma Tarihi : 11. 08. 2009**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Kazım SEZEN**

**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ**

**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mahmut EROĞLU**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU**

**Trabzon 2009**

## ÖNSÖZ

*Gryllotalpa gryllotalpa*'nın bakteriyal florasının ve mikrobiyal mücadele ajanlarının araştırıldığı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Kazım SEZEN'e, arazi çalışmaları ve böceklerin sağlanması konusunda gösterdiği yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. İsmail DEMİR'e ve çalışmam sırasında değerli fikirleriyle bana yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ, Yrd. Doç. Dr. Hatice KATI, Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU'na ve yardımını hiçbir zaman benden esirgemeyen arkadaşlarım Mehtap YAKUPOĞLU'na ve Arş. Gör. Emine DEMİR'e ve beni yalnız bırakmayan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu tezin hazırlanması sırasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen fedakâr aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca tez çalışmam süresince laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji bölüm başkanı Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e teşekkür ederim

Şerife İŞÇİ  
Trabzon 2009

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Toprak Altı Zararlıları ve Ekonomik Etkileri.....	3
1.3. <i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> (Avrupa danaburnu) Hakkında Genel Bilgi .....	5
1.4. <i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> (Avrupa danaburnu)'nın Zarar Şekli.....	8
1.5. Zararlılar ile Yapılan Mücadele Yöntemleri .....	9
1.5.1 Doğal Mücadele .....	9
1.5.2. Yasal Mücadele .....	9
1.5.3. Mekanik Mücadele .....	10
1.5.4. Fiziksel Mücadele .....	10
1.5.5. Kültürel Mücadele .....	10
1.5.6. Kimyasal Mücadele .....	10
1.5.7. Biyolojik Mücadele .....	10
1.5.7.1. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar .....	12
1.5.7.1.1. Predatörler .....	12
1.5.7.1.2. Parazitler .....	12
1.5.7.1.3. Mikroorganizmalar .....	13
1.5.7.1.3.1. Bakteriler .....	13
1.5.7.1.3.2. Virüsler .....	15
1.5.7.1.3.3. Mantarlar .....	15
1.5.7.1.3.4. Nematodlar .....	15

1.5.7.1.3.5. Protozoalar .....	15
1.6. <i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> ile Mücadele Yöntemleri.....	16
1.6.1. Kültürel Önlemler .....	16
1.6.2. Kimyasal Mücadele .....	17
1.7. Zararlı Böceklerde Patojen Mikroorganizmaların Belirlenmesi .....	18
1.7.1 Makroskobik İnceleme .....	18
1.7.2. Mikroskobik İnceleme.....	19
1.8. Bakterilerin Tür Tayininde Kullanılan Kriter ve Yöntemler.....	20
1.8.1. Nümerik Taksonomi .....	20
1.8.2. Metabolitik Enzim Profilleri ve Biyokimyasal Özelliklerine Göre Bakterilerin Tanısı ve Karakterizasyonu .....	23
1.8.3. Moleküler Yöntemler .....	27
1.9. Mikroorganizmaların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi .....	28
1.10 Çalışmanın Amacı .....	29
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	30
2.1. Böceklerin Toplanması .....	30
2.2. <i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> Nimfleri için Laboratuarda Uygun Ortam Oluşturulması .....	30
2.3. <i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> 'nın Bakteriyal Florasının Belirlenmesi .....	30
2.3.1. Bakteri İzolasyonu .....	30
2.3.2. Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması .....	31
2.3.3. Bakteriyal İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	31
2.3.3.1. Basit Boyama .....	31
2.3.3.2. Gram Boyama .....	31
2.3.3.3. Endospor Boyama .....	32
2.3.3.4. Kapsül Boyama .....	32
2.3.3.5. Hareket Testi.....	32
2.3.4. Bakteriyal İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	33
2.3.4.1 Bakterilerin Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi .....	33
2.3.4.2. Bakterilerin Büyüebildikleri pH Aralıklarının Belirlenmesi .....	33
2.3.4.3 NaCl Toleranslarının Belirlenmesi.....	33
2.3.5. Bakteriyal İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	34
2.3.5.1. Nişasta Hidroliz Testi .....	34

2.3.5.2.	Jelatin Hidroliz Testi .....	34
2.3.5.3.	İndol Oluşumu Testi .....	34
2.3.5.4.	Sitrat Testi .....	35
2.3.5.5.	Hidrojen Sülfür (H <sub>2</sub> S) Üretim Testleri .....	35
2.3.5.6.	Üre Hidroliz Testleri .....	35
2.3.5.7.	Nitratı İndirgeme Testi .....	36
2.3.5.8.	Katalaz Testleri .....	36
2.3.5.9.	Oksidaz Testleri.....	37
2.3.6.	API 20E Panel Test Sistemi .....	37
2.3.7.	API 50CH Panel Test Sistemi .....	37
2.3.8.	İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi.....	38
2.3.8.1.	İzolatların Genomik DNA'larının İzolasyonu .....	38
2.3.8.2.	16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Çoğaltılması .....	38
2.3.8.3.	16S rRNA Geninin Baz Dizisinin Belirlenmesi ve Gen Bankalarındaki Sıralarla Karşılaştırılması .....	38
2.4.	İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi .....	39
2.4.1.	İzolatların Bioassay İçin Hazırlanması .....	39
2.4.2.	İzolatlardan Hazırlanan Numunelerin <i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> Nimflerine Uygulanması .....	39
2.4.3.	İzolatlardan Hazırlanan Numunelerin <i>M. neustria</i> Larvalarına Uygulanması ..	39
3.	BULGULAR .....	40
3.1.	<i>Gryllotalpa gryllotalpa</i> Ergin ve Nimflerinden Bakteri İzolasyonu .....	40
3.2.	İzolatların Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Tür Tayinlerinin Yapılması.....	40
3.2.1.	İzolatların Morfolojik Özellikleri .....	40
3.2.2.	İzolatların Fizyolojik Özellikleri .....	43
3.2.3.	İzolatların Biyokimyasal Özellikleri .....	45
3.2.4.	API 20E Panel Test Sistemi ile Tespit Edilen Özellikler .....	47
3.2.5.	API 50CH Panel Test Sistemi ile Tespit Edilen Özellikler .....	48
3.3.	İzolatların Bazı Genetiksel Özellikleri .....	49
3.3.1	16S rRNA Genlerinin Baz Dizileri.....	49
3.4.	<i>G. gryllotalpa</i> 'nın İnsektisidal Aktivitesinin Belirlenmesi .....	51

3.5.	İzolatların <i>Malasocoma neustria</i> Üzerindeki İnsektisidal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	52
4.	TARTIŞMA.....	54
5.	SONUÇLAR.....	60
6.	ÖNERİLER .....	61
7.	KAYNAK.....	62
8.	EKLER .....	71
	ÖZGEÇMİŞ	

## ÖZET

*Gryllotalpa gryllotalpa* (Avrupa danaburnu, Orthoptera: Gryllotalpidae) birçok bitki ve meyvenin köklerine zarar veren ekonomik olarak önemli bir zararlıdır. Günümüze kadar bu zararlıya karşı bir biyolojik mücadele yöntemi uygulanmamıştır.

Bu çalışmada, *Gryllotalpa gryllotalpa*'nın bakteriyal florasının belirlenerek bir patojen tespit edilip bu patojenin *G. gryllotalpa*'ya karşı başlatılabilecek bir biyolojik mücadelenin temelini teşkil etmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Tokat ve Trabzon illerinin çeşitli tarım alanlarından toplanan *G. gryllotalpa* ergin ve nimfleri incelenmiş, zararlının bakteriyal florası belirlenmiş ve bu bakteriyal izolatların zararlı üzerindeki insektisidal etkileri araştırılmıştır.

Sonuç olarak, *G. gryllotalpa* nimf ve erginlerinden toplam on beş bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin on ikisi tür seviyesinde, üçü ise cins seviyesinde tanımlanmıştır. Bu çalışma kapsamında bakterilerin tür tayininde, rutin olarak kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin yanı sıra, bakteriler API 20E ve API 50CH panel test sistemleri kullanılarak metabolik enzim profilleri ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiş, moleküler seviyede ise 16S rRNA dizin analizi yöntemi kullanılmıştır. İzole edilen bakterilerin *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Serratia* sp., *Bacillus gibsoni*, *Bacillus* sp., *Providencia vermicola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*, *Enterobacter aerogenes*, *Paenibacillus xylanilyticus*, *Enterobacter* sp., *Providencia rettgeri*, *Serratia nematodophila*, *Providencia alfalifacien*, *Enterobacter hormechei* ve *Bacillus arsenicus* oldukları belirlenmiştir. İnsektisidal aktivite testleri *G. gryllotalpa* (Ort.: Gryllotalpidae) nimfleri ile  $3,6 \times 10^9$  cfu/ml, *Malacosoma neustria* L. (Lep.: Lasiocampidae) larvaları ile ise  $1,8 \times 10^9$  cfu/ml dozunda, on günde yapıldı. İnsektisidal aktivite testleri sonucunda, en yüksek insektisidal aktivite *G. gryllotalpa* üzerinde %100 ile *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve *Bacillus arsenicus*, *M. neustria* üzerinde %75 ve %70 etki göstermişlerdir. Sonuçlarımız özellikle *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Gg1) izolatının *G. gryllotalpa*'ya karşı etkili bir mikrobiyal kontrol ajanı olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteriyal flora, Biyolojik kontrol, *Gryllotalpa gryllotalpa*, Böcek patolojisi, 16S rRNA



## SUMMARY

### Investigation of Bacterial Flora and Microbial Control Agents of *Gryllotalpa gryllotalpa*

*Gryllotalpa gryllotalpa* (Orthoptera: Gryllotalpidae) is an economical important pest which damage on roots of a lot of plants. Up to now, there is no biological control against this pest around the world.

The aim of this study is to determine bacterial flora of the *Gryllotalpa gryllotalpa* and find out an opportunistic pathogen to use are possible microbiological control agent against this pest. For this purpose, *G. gryllotalpa* nymphs were collected from Trabzon and Tokat different fields. The bacterial flora of this pest and the microbial potential of bacterial isolates were determined.

As a result, 15 different bacteria were isolated from *G. gryllotalpa* nymphs. 12 of these bacteria determined and characterized at species level and three of them characterized at genus level. In this study, we determined morphological, physiological and biochemical properties, metabolic enzyme profiles by API 20E and API 50CH panel test systems. 16S rRNA gene sequence analyses were also performed to determine isolates at molecular level. The isolates were identified as *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Serratia* sp., *Bacillus gibsoni*, *Bacillus* sp., *Providencia vermicola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*, *Enterobacter aerogenes*, *Paenibacillus xylanilyticus*, *Enterobacter* sp., *Providencia rettgeri*, *Serratia nematodophila*, *Providencia alfalifacien*, *Enterobacter hormehechi* and *Bacillus arsenicus*. The insecticidal activities were determined against the nymphs of *G. gryllotalpa* (Ort.: Gryllotalpidae) and the larvae of *Malacosoma neustria* L. (Lep.: Lasiocampidae) at  $3.6 \times 10^9$ ,  $1.8 \times 10^9$  cfu/ml dose, respectively within ten days. The highest insecticidal activities are 100% for *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus arsenicus* on *G. gryllotalpa* and 75, 70% on *M. neustria*, respectively. Our results indicate that especially *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Gg1) may be valuable as a microbial control agent for *G. gryllotalpa*.

**Keywords:** Bacterial flora, Biological control, *Gryllotalpa gryllotalpa*, Insect pathology, 16S rRNA

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

- Şekil 1. Avrupa danaburnu'na ait çeşitli safhaların görüntüsü; a) ergin b) yumurta..... 7
- Şekil 2. Avrupa danaburnu'nun oluşturduğu zarar şekli ..... 9

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Toprak altı zararlıları.....	4
Tablo 2. Gryllotalpa türlerinin dünyadaki yayılışları.....	6
Tablo 3. Çeşitli <i>B. thuringiensis</i> toksinleri ve etkili oldukları zararlılar.....	14
Tablo 4. Avrupa danaburnu ile yapılan kimyasal mücadelede kullanılan etkin maddeler.....	17
Tablo 5. API 20E test panel sisteminin içerdiği testler.....	25
Tablo 6. API 50CH test panel sisteminin içerdiği testler.....	26
Tablo 7. İzolatların morfolojik özellikleri.....	42
Tablo 8. İzolatların fizyolojik özellikleri.....	44
Tablo 9. İzolatların biyokimyasal özellikleri.....	46
Tablo 10. İzolatların API 20E panel test sonuçları.....	47
Tablo 11. İzolatların API 50CH panel test sonuçları.....	48
Tablo 12. Belirlenen 16S rRNA dizinlerinin Gen bankasındaki genler ile karşılaştırılması.....	50
Tablo 13. <i>G. gryllotalpa</i> ’dan izole edilen izolatların <i>G. Gryllotalpa</i> üzerindeki insektisidal etkileri.....	52
Tablo 14. <i>G. gryllotalpa</i> ’dan izole edilen izolatların <i>M. neustria</i> üzerindeki insektisidal etkileri.....	53

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\Delta T_m$	: DNA'nın tamamlayıcı iki zincirinin birbirinden ayrılma sıcaklığı
ADH	: Arginin Dehidrolaz
AMY	: Amigdalın
ARA	: Arabinoz
bp	: Baz çifti
CIT	: Sitrat
CFU	: Koloni Oluşturabilen Birim
DDT	: Dikloro-Difenil-Trikloroetan
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
EDWIP:	Dünya Böcek Patojenleri Ekolojik Veritabanı
GEL	: Jelâtin
GLU	: Glukoz
H <sub>2</sub> S	: Hidrojen Sülfür
ICP	: İnsektisidal Kristal Proteini
IND	: İndol
INO	: İnositol
LDC	: Lisin Dekarboksilaz
MAN	: Mannitol
MEL	: Melibioz
MK	: Metil Kırmızısı
NPV	: Nukleopolihedrovirüs
ODC	: Ornitin Dekarboksilaz
PBS	: Fosfat Buffer Salın
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi
RHA	: Rhamnoz
RNA	: Ribonükleik Asit
SAC	: Sukroz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

SOR : Sorbitol  
TDA : Triptofan Deaminaz  
URE : Üre  
VIDIL : Böcek Viral Hastalıkları Veritabanı  
VP : Voges Proskauer  
WHO : Dünya Sağlık Örgütü

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Doğada yararlı ve zararlı olmak üzere çok sayıda böcek türü bulunmaktadır. Doğada yaşayan bu böceklerin %99,5'inin insanlar için faydalı olduğu bilinmektedir. Geriye kalan %0,5 ise doğa ve insan için zarar oluşturmaktadır (Serez, 2003). Doğaya ve insana zararlı çok az böcek türü bulunmasına rağmen özellikle bu zararlı böcek türleri tarım alanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Hızlı nüfus artışı ile meydana gelen ürün kayıpları ülkemizi her geçen gün dışa bağımlı hale getirmektedir (Oğurlu, 2000). Geçmişte tarımsal ürün bakımından kendi kendine yeten Türkiye şimdi ise birçok ülkeden tarımsal ürün ithal etmektedir. Bunun en önemli sebeplerinden biri de ekonomik olarak önemli bitkilerde zararlı böcekler ile mücadelenin bilinçli ve tam bir şekilde yapılamamasıdır (Bülbüloğlu, 2000).

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de zararlı böceklerin kontrolünde çeşitli kimyasal insektisitler kullanılmakta yani kimyasal mücadele yürütülmektedir. Fakat kullanılan bu kimyasal insektisitler doğal çevre ve hedeflenmemiş organizmalar üzerinde olumsuz etkilere sahiptir (Huber, 1986; Ecevit, 1988; Ünal, 1998). Kimyasal ilaçların tarım zararlılarına karşı yüksek dozda ve bilinçsiz kullanımları, bunların kimyasallara karşı direnç kazanmalarına neden olmaktadır (Oğurlu, 2000). Kimyasal insektisitler zararlılardan daha çok, onların tabii düşmanları predatör ve parazitleri ortadan kaldırarak zararlıların sayısının daha fazla artmasına neden olmaktadır. Kalıntıları da insanlarda birikerek gelecek nesilleri tehdit etmektedir (Demirbağ ve Beldüz, 1997).

Böceklerin kontrolü için mikrobiyal ajanların kullanımı 1800'lü yıllarda mantarların kullanılmasıyla başlamıştır (Oğurlu, 2000). Ancak mikrobiyal kontrolün önemi 1900'lü yılların ortalarına kadar anlaşılamamış ve fazla gelişmemiştir. Bu tarihten sonra sıklıkla kullanılan kimyasal insektisitlerin zararlı etkilerinin ortaya çıkmasıyla, araştırmalar böcekler üzerinde patojenik etkiye sahip mikroorganizmaların tespiti ve zararlılara karşı kullanımına yoğunlaşmıştır.

Günümüzde, EDWIP (The Ecological Database of the World's Insect Pathogens) ve VIDIL (Viral Diseases of Insect in the Literature Database) verilerine göre 2.285 farklı

mikroorganizma türünün, 9.407 böcek türüyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Toplam 2.285 mikroorganizmanın 1.504 türünü protozoalar, 411 türünü funguslar, 168 türünü virüsler, 146 türünü nematodlar, 51 türünü bakteriler ve 5 türünü diğer mikroorganizmalar oluşturmaktadır (Braxton vd., 2003). Bu veriler toplam sayının sadece bir kısmını oluşturmaktadır.

Kimyasalların kullanımları ile gerçekleştirilen zararlı böcek kontrolüne alternatif bir yöntemde biyolojik mücadele yöntemidir. Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını onlara karşı kullanma olarak tanımlanabilir (Oğurlu, 2000). Doğal düşman terimi, predatörler, parazitler ve hastalık oluşturan mikroorganizmaları kapsar (Peter, 1984).

Biyolojik mücadelede kullanılan elemanlar bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar, protozoa grubuna ait organizmalar ve rekombinant teknikle geliştirilen ajanları kapsamaktadır (Peter, 1984). Biyolojik mücadele ajanları zararlı böceklerde hastalık oluşturarak böcek popülasyonunun dengede tutulmasını ve zararlarının minimuma indirilmesini sağlarlar. Bunların büyük bir çoğunluğu konağa özgü olduğu için yalnızca mücadele yapılmak istenilen organizma üzerinde etkindir. Bu özelliği ile faydalı ve predatör böcekler, hayvanlar ve insanlar gibi hedeflenmemiş organizmalar üzerinde herhangi bir risk oluşturmazlar. Tamamen doğal olmaları sebebiyle ekosistemde herhangi bir kirliliğe yol açmazlar. Bu özellikleri, gelecekte kimyasal insektisitlerin yerini bu biyolojik ajanların alacağını göstermektedir (Oğurlu, 2000).

Zararlı bir tür ile biyolojik mücadele yapılabilmesinin önemli basamaklarından biri zararlı böceğin biyolojisini çok iyi bilinmesidir. Uygulanacak olan biyolojik materyalin hangi dönemlerde ve nasıl verilmesi gerektiğinin belirlenmesi için bu oldukça önemlidir. İkinci basamak ise biyolojik mücadelede kullanılacak ajanın tespit edilmesidir. Böyle bir ajanı tespit edebilmek için mevcut biyolojik ajanların insektisidal etkilerin test edilmesi ve zararlı böcekte muhtemel hastalık oluşturabilen yeni bir patojenin araştırılması gerekmektedir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızdaki amacımız, ülkemiz ekonomisinde büyük bir yere sahip olan tarımda, çeşitli tarım ürünlerine zarar veren Avrupa danaburnu (*Gryllotalpa gryllotalpa*)'nun, biyolojik mücadeleyle uyumlu çalışabilecek ve hatta ona alternatif oluşturabilecek bir mikrobiyal ajanın tespiti çok büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla bu

çalışmada *G. gryllotalpa*'ya karşı etkili bir mikrobiyal mücadele ajanının varlığının tespiti için bakteriyal florasının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Böyle bir mikrobiyal ajan, biyolojik mücadele çalışmalarını destekleyeceği gibi, tarım arazilerinde zarara sebep olan diğer böceklere karşı da kullanılabilir.

## 1.2.Toprak Altı Zararlıları ve Ekonomik Etkileri

Bugüne kadar ülkemizde tespit edilmiş olan bazı toprak altı zararlıları Tablo 1'de gösterilmiştir. Bunların pek çoğunun mikrobiyal florası şu ana kadar çalışılmıştır.

*Agrotis ipsilon*, *Agrotis segatum* (Bozkurt) : Erginleri 40-47 mm, *A. segatum* ise 35-40 mm kanat açıklığına sahip siyahımsı vücutlu kelebeklerdir. Bozkurt larvaları birinci ve ikinci dönemlerinde bitkilerin taze sürgün ve yapraklarını kemirip yiyerek zarar yapar. Sonraki dönemlerde, sadece geceleri toprak yüzeyine çıkarak genç körpe bitkileri kök boğazından kesmek veya kemirmek suretiyle bitkinin kırılıp, kurummasına neden olurlar.

*Agriotes lineatus*, *Agriotes obscurus* (Telkurtları): Telkurtları kışı toprağın 10-20 cm derinliğinde otların diplerinde ergin olarak geçirirler. Larvalar yeni çıkan fidelerin köklerini kemirir, bitkiler ölür. Pamuk tarlalarında bozkurtlar ile birlikte büyük zarara neden olurlar (Aydemir, 2008).

*Anisoplia* spp. (Ekin bambulu): Ergin 10-15 mm boyundadır. Larvalar toprak altında genç tahılın kökünü kemirerek zararlı olmakla beraber büyük zararı erginler yapar. Başaklardaki taneleri kemirerek zarara neden olurlar. Bambul erginleri tarafından kemirilmiş taneler tohumluk olarak kullanılamayacağı gibi tanenin özü yenildiğinden ekmek yapımında da iyi sonuç vermezler. Zarar görmüş tarlalar da eşit dağılım gösterdiği koşullarda m<sup>2</sup> de 3-4 adet ergin olduğunda ekonomik zarara neden olabilir. Ülkemiz tüm tahıl alanlarında yaygındır (Aydemir, 2008).

*Ceutorrhyncus pleurostigma* (Lahana galböceği): Hortumlu böceklerden olan lahana galböceği 3-4 cm boyundadır. Lahana galböceği'nin larvaları konukçu bitkilerin kök boğazında urlar meydana gelir. Fidelikte yaptıkları zarar önemlidir. Ülkemizde Marmara bölgesinde yer yer bu zararlıyla bulaşık durumdadır.

*Delia brassicae* (Lahana sineği): Erginleri 5-6 mm boyundadır. Larva döneminde zararlı olur. Yumurtadan çıkan larva, bitkinin kök boğazı ve köklerin epidermisi altına girer ve galeri açarak zarara başlar. Ülkemizin Karadeniz, İç Anadolu bölgelerinde yaygın olarak bulunur (Aydemir, 2008).



Tablo 1. Toprak altı zararlıları

Bilimsel Adı	Türkçe Adı	Takım-Aile	Zararı
<i>Agrotis ipsilon</i>	Bozkurt	Lepidoptera: Noctuidae	Bitki
<i>Agrotis segetum</i>	Bozkurt	Lepidoptera: Noctuidae	Bitki
<i>Agriotes obscurus</i>	Telkurdu	Coleoptera: Elateridae	Bitki
<i>Agriotes lineatus</i>	Telkurdu	Coleoptera: Elateridae	Bitki
<i>Anisoplia</i> spp.	Ekin bambulu	Coleoptera: Rutelidae	Ürün
<i>Ceutorrhyncus pleurostigma</i>	Lahana galböceği	Coleoptera: Curculionidae	Ürün
<i>Delia brassicae</i>	Lahana sineği	Diptera: Anthomyiidae	Ürün
<i>Delia platura</i>	Tohum sineği	Diptera: Anthomyiidae	Ürün
<i>Gryllotalpa gryllotalpa</i>	Avrupa danaburnu	Orthoptera: Gryllotalpidae	Ürün
<i>Melolontha melolontha</i>	Mayıs böceği	Coleoptera: Scarabaeidae	Bitki
<i>Phragmacossia albida</i>	Enginar kurdu	Lepidoptera: Cossidae	Bitki
<i>Porphyrophora polonica</i>	Kök koşnili	Hemiptera: Margarodidae	Ürün
<i>Psila rosae</i>	Havuç sineği	Diptera: Psilidae	Ürün
<i>Zabrus</i> spp.	Ekin kamburböceği	Coleoptera: Carabidae	Ürün

*Delia platura* (Tohum sineği) : Erginleri yaklaşık 6 mm boyundadır. Larvalar tohum yataklarında veya ocaklarda çimlenmekte olan kabak, kavun, salatalık ve fasulye gibi tohumların toprak içindeki gövdede galeri açarak beslenirler. Ülkemizde yaygın olarak bulunur (Baykal, 2008)

*Gryllotalpa gryllotalpa* (Avrupa danaburnu): Erginleri 4-5 cm boyundadır. Toprağın altında galeri açarak buldukları tüm sebze ve meyvelerin köklerini yiyerek zarar yaparlar (Houston, 2006).

*Melolontha melolontha* (Mayıs böceği): Erginleri 2,5-3 cm boyundadır. Erginleri yaprakla beslenip zarar verse de, esas zararı larvalar yaparlar. Larvalar, fındık bitkisinin 1 cm kalınlığına kadar olan kökleri kolayca koparıp saçak köklerden mahrum bırakırlar. Bunun sonucu olarak da uç kurumaları başlar ve kurumalar ana dallara kadar ilerler. Yaz kuraklarının da tesiriyle tam bir kuruma meydana gelir. Böylece bahçenin elden çıkmasına ve ürün kaybına neden olmaktadır (URL-3).

*Psila rosae* (Havuç sineği): Boyu 4-5 mm'dir. Havuç sineği larvaları en ince köklere kadar girerek beslenseler de asıl zarar ana kök içinde galeri açmaları sonucu görülür. Ülkemizde İç Anadolu, Akdeniz ve Ege Bölgelerinde görülmektedir.

*Phragmacossia albida* (Enginar kurdu): Larvalar enginar kökleri içinde galeri açarak beslenir. İçinde buldukları gözün kurumasına ve köklerin içinin oyularak çürütmesine neden olurlar. Böylece 8-10 yıl ürün vermesi gereken, 5-6 yılda kurumaktadır. Ülkemizde Ege Bölgesinde yaygındır (Aydemir, 2008).

*Porphyrophora polonica* (Kök koşnili): Ergin dişi 4,5 mm, ergin erkek 2-3 mm boyundadır. Bitki köklerinde bitki öz suyunu emerek bitki gelişmesini yavaşlatır, bitkide sararmalara, kurumalara ve yoğunluğu fazla olan tarlalarda ürün alınamamasına neden olur. Ülkemizde Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yaygındır.

*Zabrus* spp. (Ekin kamburböceği): Erginler türlere göre farklılık göstermekle birlikte, 12-22 mm boyundadır. Genç larvalar, sonbahar aylarında uygun koşulları bulduklarında ekin yapraklarını toprak içine çekerek yerler. Olgun larvalar ise ilkbaharda yaprak ve sürgünleri yiyerek zararlı olurlar, m<sup>2</sup>'de 3-4 larva olduğunda tarlalarda yer yer yenik bölümler, açık hububat sıraları ve boşluklar görülür. Bu durum verimin önemli ölçüde azalmasına neden olur. Erginler hasada yakın günlerde başak tanelerini, ekimde ise toprak altındaki taneleri kemirerek zararlı olurlar (Aydemir, 2008).

### 1.3. *Gryllotalpa gryllotalpa* (Avrupa danaburnu) Hakkında Genel Bilgi

*Gryllotalpidae* ailesinde bulunan Avrupa danaburnu sıcak ve tropikal bölgelerde bulunur. Dünyada Asya, Afrika, Avrupa ve Avusturalya'da yaygındır (Otte ve Alexander, 1983). *Gryllotalpa* cinsleri dünyanın hemen hemen her yerinde çok geniş yayılış göstermektedir (Tablo 2).

Bu böcek en iyi toprağı kazmaya yarayan ön ayaklarıyla bilinir (Bennet-Clark, 1970, 1987; Daws vd., 1996). Buna ek olarak bazı dişiler ses çıkarır (Petrunkevitch ve Guaita 1901; Baumgartner, 1905, 1910; Tindale, 1928; Zhantiev ve Korsunovskaya, 1973; Nickle ve Carlisle, 1975; Ulagaraj, 1976; Townsed, 1983; Hoffart vd., 2002). Dişilerin koruma ve savunma amaçlı ses çıkardığı bilinmektedir (Walker, 1997).

Basit olarak Avrupa danaburnu kısaç (kazmaya yarayan ön ayaklarıyla) sayısına göre 3 e ayrılır; iki, üç ve dört kısaç sayısına göre. İki kısaçlı *Scapteriscus* cinsine aittir. Üç kısaçlı *Triamescapter* cinsine aittir.

Dört kısaçlı Avrupa danaburnu 3 cinsi (*Gryllotalpe*, *Gryllotalpa*, *Neocurtilla*) ve 35 türüyle dünyanın geniş bir bölümüne dağılmıştır (David ve Castner, 1984).

Tablo 2. *Gryllotalpa* türlerinin dünyadaki yayılışları

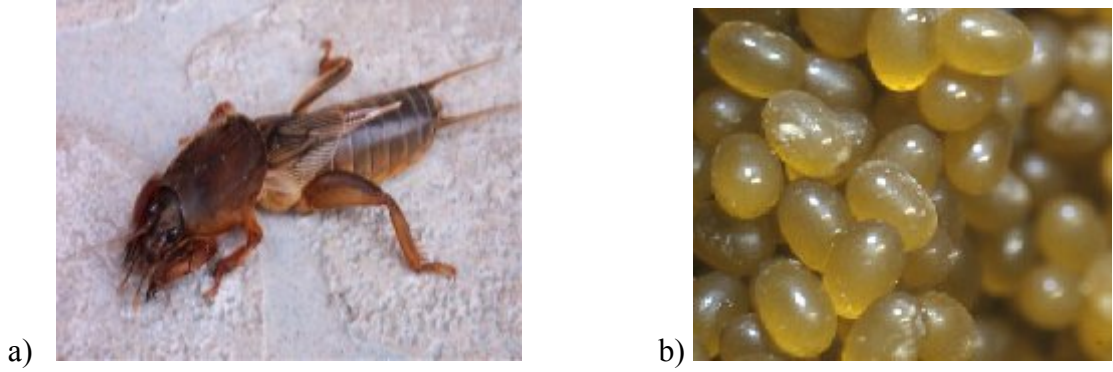
<b>Tür</b>	<b>İsimlendirme</b>	<b>Bölge</b>
<i>Gryllotalpa major</i>	Saussure	Güney-Kuzey Amerika
<i>Gryllotalpa cultriger</i>	Uhler	Kuzey Amerika Merkez Amerika
<i>Gryllotalpa africana</i>	Beauvois	Afrika, Orta Asya, Hawaii
<i>Gryllotalpa bulla</i>	Townsend	Merkez ve Doğu Afrika
<i>Gryllotalpa debilis</i>	Gerstaecker	Tropikal Afrika
<i>Gryllotalpa devia</i>	Saussure	Güney Afrika
<i>Gryllotalpa robusta</i>	Townsend	Kanarya Adaları
<i>Gryllotalpa rufescens</i>	Chopard	Merkez Afrika
<i>Gryllotalpa parva</i>	Townsend	Güney Afrika ve Madagaskar
<i>Gryllotalpa brevilyra</i>	Townsend	Merkez Afrika
<i>Gryllotalpa pluridens</i>	Townsend	Merkez Afrika
<i>Gryllotalpa spissidens</i>	Townsend	Batı Afrika yağmur Ormanları
<i>Gryllotalpa marismortui</i>	Broza, Blondheim ve Nevo	İsrail
<i>Gryllotalpa tali</i>	Broza, Blondheim ve Nevo	İsrail
<i>Gryllotalpa vineae</i>	Bennet- Clark	Asya
<i>Gryllotalpa gryllotalpa</i>	Linnaeus	Asya, Avrupa, Kuzey Amerika
<i>Gryllotalpa monanka</i>	Otte ve Alexander	Avustralya
<i>Gryllotalpa coarctata</i>	Walker, E	Avustralya
<i>Gryllotalpa pilosipes</i>	Tindale	Avustralya
<i>Gryllotalpa inermis</i>	Chopard	Avustralya
<i>Gryllotalpa australis</i>	Erichson	Avustralya
<i>Gryllotalpa brachyptera</i>	Tindale	Avustralya
<i>Gryllotalpa babinda</i>	Otte ve Alexander	Avustralya
<i>Gryllotalpa pluvialis</i>	Mjöberg	Avustralya
<i>Gryllotalpa nitidula</i>	Serville	Avustralya
<i>Gryllotalpa oya</i>	Tindale	Avustralya
<i>Gryllotalpa howensis</i>	Tindale	Avustralya

Avrupa danaburnu (*Gryllotalpa gryllotalpa*) L, takımı Orthoptera, ailesi Gryllotalpidae, cinsi *Gryllotalpa*'dır. Avrupa danaburnu, 1913'den beri Avrupa'dan Amerika'ya kadar geniş bir yayılım göstermektedir (Weiss ve Dickerson, 1918). Saccar, Weiss ve Dickerson bu türün ilk stoklarını Hollanda ve Belçika da belirlemişlerdir (Morse, 1920).

Avrupa danaburnu yaşamının çoğunu toprak altında geçirir. Genellikle yaşama yeri olarak, galeri açmaya uygun olan nemli, bol humuslu, killi-kumlu toprağı seçerler.

Geceleri ve çok bulutlu günlerde faaliyet gösterirler. Gündüzleri genel olarak toprak içindeki galerilerde istirahat halinde bulunurlar (Weiss, 1915).

Avrupa danaburnu, 4-5 cm boyunda, iri vücutlu, esmer kestane renginde bir böcek olup, vücut kadife gibi kısa tüylerle kaplıdır. Baş ileri uzamıştır. Antenler kısa ve kuvvetlidir. Ağız parçaları çiğneyici tiptedir. Gözleri iyi gelişmiş olup, yanlarda bulunur. Kazıcı tipteki ön bacakları oldukça yassılaştırılmış ve kenarları kuvvetli dikenlerle donanmıştır. Üst kanatlar kısadır. Alt kanatlar iyi gelişmiş ve uçuş görevi yaparlar (Şekil 1).



Şekil 1. Avrupa danaburnu'na ait çeşitli safhaların görüntüsü; a) ergin b) yumurta (URL- 1).

Toprağın altında galeri açarak yaşarlar (Houston, 2006). Antenler kıl gibi ve 120 segmentten meydana gelmiştir. Vücudun en geniş kısmı olan pronotum büyük, oval, sert ve üzeri kadife görünümünde ince tüylü ve daha koyu renklidir. Üst kanatlar kısa yuvarlakça, saydam ve esmer renktedir. Damarları koyu renkli ve belirgindir. Alt kanatları uzun ve saydamdır. Yelpaze gibi kendi üzerlerine katlanmış olup vücut boyunca uzanırlar. Uçları arkadan 2 kuyruk gibi sarkar. Kazıcı tipteki ön bacakların bütün bölümleri kalın ve kuvvetlidir. Orta bacaklar diğer bacaklara nazaran daha zayıftır. Arka bacakların iç-üst tarafında az çok belirli aralarla sıralanmış 4-5 ya da 6 adet büyük diken bulunur. Vücudun sonunda, üzerinde uzun ve seyrek kıllar bulunan bir çift uzantı vardır. Polifag bir zararlıdır. Kış uykusuna yatarlar, sıcak bölgelerde ve Mart ayında aktif olurlar. Mayıs ayında olgunlaşmaya başlarlar ve kısa bir süre sonra yumurta bırakma zamanı gelir.

Mayıs ayında çiftleşen dişiler yumurtalarını toprağın 10-20 cm derinliklerinde oval bölme açarak bu bölmelere bırakırlar (Kobakhidze, 1960; Kryzhonavskii ve Dansting 1972).

Bazı bilim adamları, yumurtaların güneş ışığından daha iyi faydalanabilmeleri için bu bölmelerin yeryüzüne daha yakın olduğunu düşünürler. Yumurtalarını ilk bıraktıkları zaman beyazımsı sarı renkte olup, sonraları rengi gittikçe koyulaşır. Ortalama 2-3 mm uzunlukta ve elips şeklindedir (Weiser, 1969). Bir grupta 200-300 yumurta bulunur. Bir dişi yaşamı boyunca 500-600 yumurta bırakabilmektedir. Doğal ortamda Mayıs ayında bırakılan yumurtalar sıcaklık ve nem şartlarına göre değişmek üzere 10-20 günde açılır. Haziran ayı içinde yumurtadan çıkan nimfler birkaç hafta gruplar halinde bu yuvalar içinde kaldıktan sonra dağılırlar (Kovancı, 1995)

Nimfler sonbahara doğru 2 gömlek değiştirir ve 3. dönem nimf halinde toprağın derinliğine inerek kışlarlar. İlkbaharda havaların ısınması ile tekrar aktif hale geçerek 5 gömlek değiştirdikten sonra Ekim ayında ergin olurlar (Aydemir, 2008). Dişiler, erkeklerden genç nimfleri korurlar (Walker ve Figg, 1990). Omnivor böcek olan Avrupa danaburnu, toprak altında birçok omurgasız hayvanlarla yani böcek ve toprak solucanı ile ve bitkilerin toprak altı organlarıyla beslenirler (Zhantiev, 1991).

Nimfler ergine benzer ancak daha küçük ve beyaza yakın açık renklidir ve kanatları gelişmemiştir (Baykal, 2008).

Kışı geçiren erginler, ilkbaharda çiftleşip yumurta bırakırlar. Böylece gelişmesini 2 yılda tamamlarlar (Aydemir, 2008).

Bazı bilim adamları böceğin gelişimini tamamlaması için dört yıla ihtiyaç olduğuna inanırlar (Weiss, 1916; Weiser, 1969).

#### **1.4. *Gryllotalpa gryllotalpa* (Avrupa danaburnu)'nın Zarar Şekli**

Ergin ve nimfleri toprak içinde galeri açarak ilerlerken rastladıkları tohum, kök ve yumru gibi her türlü bitkisel materyali kemirerek zarar verirler. Özellikle yeni dikilmiş veya yeni çimlenmiş sebze fidelerinin köklerini keserek kurumalarına neden olur ve yumrulu sebzelerin de yumrularını kemirirler ( Kryzhanovskii ve Dansting, 1972)

En çok sebzeler, çeltik, buğday, mısır, ayçiçeği, tütün, pamuk, süs bitkileri, patates, meyve ve orman fidanlarında zarar yapar. Şekil 2 Avrupa danaburnunun yapmış olduğu zararları göstermektedir (URL-2).

Avrupa danaburnu yüksek yoğunluklarda oldukça büyük ölçüde zarara neden olmaktadır. Ülkemizin her tarafında yaygındır (Baykal, 2008). Rusya'da domates, lahana,

tütün, orman ağaçları ve diğer sebzelere zarar verir. Benzer olarak Fransa'da karpuz, havuç, soğan tarlalarında büyük zarar verirler (Weiss, 1916; Walker ve Figg, 1990)



Şekil 2. Avrupa danaburnu'nun oluşturduğu zarar şekli (URL-2).

## 1.5. Zararlılar İle Yapılan Mücadele Yöntemleri

### 1.5.1. Doğal Mücadele

İnsanın herhangi bir yardımı olmadan doğal kuvvetlerle böcek popülasyonlarının kontrol altında tutulması olayıdır. Çevre direncinin bir sonucu olarak böceklerin önemli bir kısmı ya çoğalmadan ya da çoğaldıktan sonra ölürlür. Böylece, zarar oluşturan böceğin ortamdaki sayısı ve oluşturduğu zarar düşük seviyede kalmıştır.

### 1.5.2. Yasal Mücadele

Yasal yollardan yararlanılarak, zararlıların yayılmalarını önlemektedir. Karantina, ambargo, muayene ve sertifika uygulamak bunların başında gelmektedir. Bu tür uygulamalar bazen kıtalar ve ülkeler arasında olurken, bazen de bir bölgenin içerisinde bir bölgeye özgü uygulanabilirler.

### **1.5.3. Mekanik Mücadele**

Böcekleri çeşitli yöntemlerle toplamak, pusuya düşürmek, yem tuzakları kurmak, feromonlar kullanmak, tuzak odunları hazırlamak veya gıda değişimi yapmak suretiyle gerçekleştirilen mücadele şeklidir.

### **1.5.4. Fiziksel Mücadele**

Sıcak ve nemden yararlanılarak böceklerin öldürülmesi, elektrik veya radyoaktivite kullanarak böceklerin kısırlaştırılması işlemleri içeren mücadele yöntemidir. (Georgis, 1997).

### **1.5.5. Kültürel Mücadele**

Toprak bakımı, işlenmesi ve gübrenmesi, yabancı ot ve atıkların temizlenmesi ve bitki nöbetleşmesi gibi toprakla ilgili yapılması gereken işleri kapsar.

### **1.5.6. Kimyasal Mücadele**

Çeşitli kimyasal maddelerin toz veya sulu halde kullanılması suretiyle yapılan mücadeledir. Ülkemizde çok yaygın olmasına rağmen, çevreye verdiği olumsuz etkilerden dolayı günümüzde gelişmiş ülkelerde yavaş yavaş bu yöntemden vazgeçilmektedir (Boucias ve Pendland, 1998).

### **1.5.7. Biyolojik Mücadele**

Biyolojik mücadele sözcüğü ilk defa 1919 yılında Kaliforniya üniversitesinden Harry Smith tarafından böcek popülasyonlarının tabii ve çeşitli uygulamalarla kontrol altına alınması için kullanılmıştır (Heimpel, 1962).

Biyolojik mücadelenin tanımı ise, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararı en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Doğal düşman terimi, predatör ve parazitlerle birlikte hastalık oluşturan mikroorganizmaları

kapsamaktadır Ancak, böceklerde hastalık oluşturan mikroorganizmaların kullanımı, genellikle mikrobiyal kontrol olarak adlandırılır (Peter, 1984).

Biyolojik mücadele, kimyasal mücadelenin tüm olumsuz yönlerini ortadan kaldırması bakımından son yıllarda tercih edilmesi gereken bir mücadele yöntemi halini almıştır (Yılmaz, 2004).

Biyolojik mücadelenin bir alt kolu olan mikrobiyal mücadele, zararlı böceklerin kontrolünde patojen mikroorganizmaların kullanılmasını kapsar. Entomopatojen olarak adlandırılan bu mikrobiyal mücadele ajanları (bakteriler, virüsler, funguslar, nematodlar, protozoalar) zararlı böceklerde hastalık oluşturarak böcek popülasyonlarının dengede tutulmasını ve zararlarının en aza indirilmesini sağlarlar. Bu entomopatojenlerin büyük bir çoğunluğu konağa özel olduğu için yalnızca mücadele yapılmak istenilen organizma üzerinde etkindir. Bu özelliği ile faydalı ve predatör böcekler, hayvanlar ve insanlar gibi hedeflenmemiş organizmalar üzerinde herhangi bir risk oluşturmazlar. Tamamen doğal olmaları sebebiyle ekosistemde herhangi bir kirliliğe yol açmazlar. Bu özellikleri, gelecekte kimyasal insektisitlerin yerini bu biyolojik ajanların alacağını göstermektedir.

Biyolojik mücadele, diğer mücadele yöntemlerine göre doğal dengenin korunmasına yardımcı olması, uzun vadede kalıcı sonuçlar vermesi ve nihai hedefe ulaştırabilmesi bakımından en çok tercih edilmesi gereken mücadele yöntemidir (Oğurlu, 2000).

Biyolojik mücadeleyi asıl önemli kılan, doğal dengeyi bozmaması ve zararlı türler üzerinde kalıcı ve dinamik bir etki meydana getirmesidir. Bu iki özellik diğer mücadele yöntemlerinde bulunmaz. Biyolojik mücadele diğer mücadele yöntemlerine göre; yan etkilerinin olmayışı, etkisini uzun süre devam ettirebilmesi, çevreye duyarlı oluşu, başlangıçta masraflı olsa da ilerleyen yıllarda ilk kuruluş harcamalarını tolere ederek en az masrafla en iyi sonucun alınabilmesine imkan vermesi, zararlılarda dayanıklılığa ve bağışıklığa yol açmaması ve zararlıyı direkt olarak öldürmekten başka, üreme gücünü azaltma ve gelişiminde dengesizlikler yaratma, ürünlerin üzerinde pestisitler de olduğu gibi kalıntı bırakmaması gibi dolaylı faydalar sağlaması bakımından birçok avantajlara sahiptir. Buna karşın esaslı bilgi gerektirmesi, başlangıçta risk taşıması ve neticenin geç alınması gibi tolere edilebilecek dezavantajları bulunmaktadır (Debach, 1974).

Biyolojik mücadelenin ilk uygulama dönemleri çok eski tarihlere dayanmaktadır. Asya'da avcı karıncalardan bu hususta yararlandığı ve M.S. 900-1200 yılları arasında narenciye zararlılarına karşı kullanıldığı bilinmektedir. 1200'lü yıllarda Yemen'de palmiye



ağaçlarındaki zararlılara karşı karıncaların kullanıldığı ve Arabistan'da her yıl dağlardan getirilen avcı karınca kolonilerinin, hurma ağaçlarında zarar yapan bir diğer karınca türüne karşı kullanıldığı kayıtlıdır (Oğurlu, 2000).

Türkiye'de ise biyolojik mücadele ile ilgili ilk kayıtlar 1910'lu yıllara rastlamaktadır. Smith tarafından yapılan ilk kayıt incir güvesi, *Ephestia cautella* Wlk. (Lepidoptera, Pyralidae)'nin parazitoidi olan *Bracon hebetor* Say. (Hymenoptera, Braconidae)'nin İzmir'de bol ve yoğun olarak bulunduğu dair bilgiler ihtiva etmektedir. Almanya'dan 1931-1948 yılları arasında birkaç kez, *Bracon hebetor* getirterek Ege'de incir depolarına salınmıştır.

Biyolojik mücadelede elde edilen bu başarılar, uygulayıcıları cesaretlendirmiş ve günümüze kadar büyük bir gelişme göstererek ilerletilmiştir. Son yıllarda çalışmalar ağırlıklı olarak böceklerde hastalık oluşturan mikroorganizmaların izolasyonu, karakterizasyonu ve biyolojik mücadele de kullanımına yönelmiştir (Demirbağ vd., 2008).

### **1.5.7.1. Biyolojik Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar**

Biyolojik mücadelede kullanılan organizmaları predatörler, parazitler ve mikroorganizmalar olarak 3 ana grup altında toplamak mümkündür. Zararlı böceklerin doğal düşmanları olan bu canlılar, zararlıların kontrolünde büyük potansiyele sahiptir.

#### **1.5.7.1.1. Predatörler**

Böcek predatörleri, besin kaynağı olarak böcekleri yakalayan ve yiyen hayvanlardır. Predatör gruplarını balıklar, amfibiler, sürüngenler, kuşlar, böceklerle beslenen çeşitli omurgasız hayvan grupları ve karnivor böcekler oluşturur. Ormanlarda zarar yapan böcekler düşünüldüğünde bu gruplardan kuşlar ve karnivor böceklerin biyolojik mücadelede kullanılma potansiyeli olduğu söylenebilir (Oğurlu, 2000; Demirbağ vd., 2008).

### 1.5.7.1.2. Parazitler

Böcek parazitleri, hayatını tek bir konukçu ferdi üzerinde tamamlayan ve konukçusunu zayıflatan, gerileten, gelişmesine mani olan veya öldüren organizmalara denir. Konukçu ise, paraziti taşıyan canlıya verilen isimdir.

### 1.5.7.1.3. Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar tarafından üretilen insektisitler hedef böcek türü için oldukça spesifik olmaları, bakteriler sayesinde ayrıştırılabilir olmaları ve zararlı böceklerde bu bileşiklere karşı direnç gelişiminin yavaş olması bakımından oldukça avantajlıdırlar

Mikroorganizmalar, biyolojik mücadelede büyük önem taşımaktadırlar. Biyolojik mücadelede kullanılan mikrobiyal etmenlerin birçoğu doğadaki hastalıklı böceklerden izole edilir. Doğada böceklerin hastalanmasına neden olan ve sonra onları öldüren orijini bakteri, virüs, mantar, nematod veya protozoa olan pek çok mikroorganizma mevcuttur (Lipa, 1975). Bu mikroorganizmalar entomopatojen olarak adlandırılır (Burges, 1981; Tanada ve Kaya, 1993; Lacey ve Kaya, 2000; Lacey vd., 2001).

En yaygın şekilde kullanılan mikrobiyal kontrol ajanı *Bacillus thuringiensis* Berliner bakterisidir. Birçok böcek takımına ait türlere karşı aktif olan yeni suşların izole edilmesi ve yapılan genetik düzenlemeler, bu bakterinin kullanım alanlarını genişletmiştir (Lacey vd., 2001).

#### 1.5.7.1.3.1. Bakteriler

Bakteriler çok basit yapılı, genetik materyali bir zarla çevrili olmayan, genellikle klorofilsiz ve bölünerek çoğalan tek hücreli canlılardır.

Entomopatojenik bakteriler, böceklerde kitle halinde ölümlere neden olurlar (Çanakçıoğlu, 1989). Böceklerde patojen olan bakterileri spor oluşturanlar ve spor oluşturmayanlar olmak üzere iki kısma ayırmak mümkündür. Spor oluşturmayan böcek patojeni bakteriler, Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae ve Micrococcaceae familyalarına dahildir. Spor oluşturan bakterilerden en önemlisi ise *Bacillus thuringiensis*'tir. Cry adı

verilen proteinler sayesinde birçok zararlı böceğe karşı etkin bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bu proteinlere ise genel anlamda mikrobiyal insektisit denmektedir (Sezen ve Demirbağ, 1999; Kuzina vd., 2002; Osborn vd., 2002; Demir vd., 2002).

Mikrobiyal insektisit, bir organizmanın ürettiği, belirli bir böcek türünü öldüren bir toksin olabileceği gibi, belirli bir böceği ölümcül olarak enfekte etme kabiliyetine sahip olan bir organizma da olabilir. En çok çalışılan, en etkili ve en sık yararlanılan mikrobiyal insektisitler *Bacillus thuringiensis* türleri tarafından üretilen kristal, Cry proteinleridir (Lampel, 1994; Ananda, 1996). Bu bakterinin, her biri belli bir böceği öldürebilen farklı bir toksini üreten birçok suş ve alttürü bulunmaktadır (Tablo 3).

Tablo 3. Çeşitli *B. thuringiensis* toksinleri ve etkili oldukları zararlılar (Gelernter ve Schwab, 1993).

<i>B. thuringiensis</i> alt türleri	Protoksin Büyükülüğü (kDa)	Hedef Böcek Grupları
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>berliner</i>	130-140	Lepidoptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> KTO,HD-1	130-140	Lepidoptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>entomocidus</i> 6.01	130-140	Lepidoptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> 7,29	130-140	Lepidoptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> IC 1	135	Lepidoptera, Diptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1	71	Lepidoptera, Diptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> ( <i>san diego</i> )	66-73	Coleoptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> PG14	125-145	Diptera
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	68	Diptera

*B. thuringiensis*'de bulunan *cry* genleri insektisidal kristal proteinlerini kodlamaktadır. Bu kristal genler *Cry* I, *Cry* II, *Cry* III ve *Cry* IV olmak üzere 4 gruba ayrılır. *Cry* I proteinleri Lepidoptera'ya karşı, *Cry* II proteinleri Lepidoptera ve Diptera'ya her ikisine karşı, *Cry* III Coleoptera'ya karşı toksik iken, *Cry* IV ise Diptera'ya karşı toksiktir. Bu proteinler A, B, C gibi daha da küçük alt sınıflara ayrılmıştır. Bu alt sınıflar ise toksin genlerinin DNA sekans analizine göre oluşturulmuştur (Crickmore, 1998).

*Bacillus thuringiensis*'in insektisidal aktivitesini oluşturan insektisidal kristal proteinler sporlanma esnasında sentezlenir. Bakteri bu kristal proteini sayesinde spor oluşmasını sağlar (Ferre, 1991; Schnepf, 1998; Bernard ve Jack, 2003).

#### **1.5.7.1.3.2. Virüsler**

Birçok virüsün böceklerin hastalanmasına neden olarak böcek salgınlarını kontrol ettikleri bilinmektedir (Steinhaus, 1956). Çiğneyici ağız yapısına sahip böcekler, özellikle yaprak yiyenler, virüs enfeksiyonlarına karşı daha hassastır. Bu durumda yaprak yiyen Lepidoptera tırtıllarıyla, Hymenoptera'nın yalancı tırtılları, viral ajanlardan daha fazla zarar görürler (Weiser, 1969; Evans, 1986). Virüsler birçok böcek takımıyla ilişkilidir. Bununla birlikte büyük bir kısmı Lepidoptera (%83), Hymenoptera (%10) ve Diptera (%4) takımlarında bulunmaktadır (Granados ve Federici, 1986; Gröner, 1986; Arif ve Kurstak, 1991).

#### **1.5.7.1.3.3. Mantarlar**

Kolay olarak tanınmaları ve doğal olarak yayılmaları nedeniyle en yaygın böcek patojenleri olarak kabul edilirler (Poinar, 1979). 700'ü aşkın fungus türünün böcekleri enfekte ettiği rapor edilmesine karşın, bunlardan ancak 10 tanesi zararlı böceklerin kontrolü için kullanılmak amacıyla geliştirilme aşamasındadır (Hajek ve Leper, 1994). Böcek patojeni olan funguslar genellikle Deuteromycota ve Entomophthorales gruplarına dahildir (Hajek, 1997). Entomopatojenik funguslar çok geniş bir konak spektrumuna sahiptirler. Birçok böcek takımına ait türleri enfekte edebilirler. Bir entomopatojenik fungus birden fazla böcek türünü enfekte edebilir.

#### **1.5.7.1.3.4. Nematodlar**

Böceklerde parazit olarak yaşayan ve bazı durumlarda ölümlerine yol açan birçok nematod türü bulunmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda 30'u aşkın nematod familyasına ait türlerin, böcekler ve diğer omurgasız hayvanlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Poinar, 1979; Kaya ve Stock, 1997). Son yıllarda yapılan çalışmalar, zararlı böceklerin biyolojik kontrolünde kullanılma potansiyeli taşımaları bakımından 7 familya üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlar Mermithidae, Tetradenematidae, Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae, Sphaerulariidae, Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarıdır (Wilson vd., 1993; Kaya ve Stock, 1997; Wilson ve Gaugler, 2000).

### 1.5.7.1.3.5. Protozoalar

Protozoa enfeksiyonları böcek popülasyonlarını dengede tutması bakımından büyük bir öneme sahiptirler (Maddox, 1987; Brooks, 1988). Entomopatojenik protozoalar genellikle konağa özeldirler. Böceklerde oluşturdukları hastalıklar yavaş ilerler. Virülansları düşüktür ve çoğu kez böceklerde kronik enfeksiyonlar oluştururlar. Virülanslarının düşük olması nedeniyle protozoaların enfekte ettiği böceklerin ölümü bazen haftalar sürebilir (Hoffman ve Frodsham, 1993).

Çoğu entomopatojenik protozoanın hayat döngüsü karmaşıktır. Sadece canlı konak içerisinde gelişebilirler ve çoğu türün gelişimini tamamlayabilmesi için bir ara konağa ihtiyacı vardır (Maddox, 1987).

Protozoalar tarafından enfekte edilen böceklerin hareketleri yavaşlar ve tembelleşirler. Bu nedenle gelişimleri de yavaşlar. Beslenme ve üreme faaliyetlerinde azalma görülür. Ölümün gerçekleşebilmesi için enfeksiyon seviyesinin çok yüksek olması gerekir. Güçsüz düşen böceklerin değişen ortam koşullarına karşı olan dirençliliği azalır ve diğer organizmaların saldırılarına açık hale gelirler (Hoffman ve Frodsham, 1993).

## 1.6. *Gryllotalpa gryllotalpa* ile Mücadele Yöntemleri

### 1.6.1. Kültürel Önlemler

Toprağın zamanında ve iyi şekilde işlenmesiyle de zararlının toprak altında bulunan yaşam ortamları bozularak açığa çıkan yumurta, nimf ve erginlerinin sıcak ve doğal düşmanlar tarafından imhası sağlanmış olmaktadır.

Zararlının sıcak ve gübreli toprakları sevmesinden hareketle, bahçelerin uygun yerlerine yaz sonuna doğru yanmamış çiftlik gübresi kümesi bırakılarak ilkbaharda burada toplanan nimf erginlerinin öldürülmesi popülasyonu azaltma bakımından oldukça yararlıdır.

### 1.6.2. Kimyasal Mücadele

Avrupa danaburnuna karşı zehirli yemlerle erken ilkbahardan sonbahara kadar mücadele yapılabilir. Zehirli yem uygulaması yapılacak bahçeler akşamüzeri iyice sulanır. Buğday kepeği ile hazırlanan zehirli yem, lastik eldiven giyilmiş el ile hava kararmadan bitkilerin diplerine yakın gelecek şekilde serpilir. Zehirli yem hazırlanmasında 1 dekar için 8-10 kg kepek, 1\2 kg toz şeker ve aşağıdaki tabloda dozu belirtilen ilaçlardan birisi kullanılır. Ayrıca buğday kepeği 3-4 litre su ile iyice nemlendirilir (Baykal ve Kovancı, 1995). Aşağıdaki tabloda (Tablo 4) Avrupa danaburnuna karşı kullanılan maddeleri göstermektedir.

Tablo 4. Avrupa danaburnuyla yapılan kimyasal mücadelede kullanılan etkin maddeler (Baykal ve Kovancı, 1995).

<b>Etki maddenin adı ve Formülasyonu</b>	<b>Formülasyonu</b>	<b>Dekara preparat yüzdesi</b>
Chlorpyripos-ethyl 25	WP	400g\8 kg kepeğe
Endasülfan 35	WP	100g\10 kg kepeğe
Endosülfan 5	Toz	500g\10 kg kepeğe
Parathion-methyl35	EC	100 cc\8 kg kepeğe
Tricholorfon 80	SP	250g\8 kg kepeğe

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de zararlı böceklerin kontrolünde çeşitli kimyasal insektisitler kullanılmaktadır. Fakat kullanılan bu kimyasal insektisitler doğal çevre ve hedeflenmemiş organizmalar üzerinde olumsuz etkilere sahiptir (Ecevit, 1988; Ünal, 1998). Özellikle 1950'lerden sonra insektisitlerin olumsuz etkilerinin ortaya çıkarılması, zararlı böceklerin kontrolü için yapılan çalışmaların daha etkili ve güvenli kontrol ajanları bulmaya yönlendirmiştir.

Zararlılarla mücadele için uygulanan kimyasallar, hedef zararlı böceğin haricinde diğer canlıları da olumsuz yönde etkilemektedir. Kimyasalların yoğun bir şekilde kullanılması zaman içinde zararlı böceklerde insektisitlere karşı dayanıklılık mekanizmasının gelişmesine neden olur. Gerçekleşen bu dayanıklılık mekanizması ilaçtan kaçma gibi davranışsal dayanıklılıklar olabileceği gibi birbirine çok yakın akraba türler

arasında dahi zararlıya direnç gösterebilecek ırkların oluşabilmesi şeklinde de gerçekleşebilir (Ecevit, 1988).

Kimyasal insektisitler yalnızca böcek türlerine değil doğada bulunan bitki örtüsüne de zarar verirler. Kimyasal insektisitlerin doğada toprak ve bitkilerde birikmelerinden dolayı yok olmaları çok uzun sürmektedir. Oluşan bu birikim toprakta ki normal mikrobiyal popülasyonu bozarak veriminin düşmesine neden olduğu gibi bitkiler aracılığı ile besin zincirine dahil olarak besin zincirinin en üst seviyesindeki canlılara kadar ulaşır. Belli bir alana uygulansalar dahi kolayca yok olmadıklarından dolayı rüzgar ve yağmur gibi doğal olaylarla çok daha geniş alanlara yayılabilmeleri insektisitlerin zararını daha da artırmaktadır (Ünal, 1998).

Son 25 yılı aşkın bir süredir, zararlı böceklerin kontrolünde bahsedilen bu zararları nedeniyle kimyasal insektisit kullanmanın yerine alternatif araçlar aranmaya başlanmıştır (Bernard ve Jack, 2003).

## **1.7. Zararlı Böceklerde Patojen Mikroorganizmaların Belirlenmesi**

### **1.7.1. Makroskobik İnceleme**

Mikroorganizmalar tarafından enfekte edilen böceklerde, patojenin özelliğine bağlı olarak bazı karakteristik hastalık belirtileri görülür.

Bu belirtileri çoğu kez makroskobik olarak gözlemlemek mümkündür. Bu belirtiler; renk değişimleri, fiziksel değişiklikler ve davranış anormallikleri olarak görülebilmektedirler.

Renk değişimleri, enfeksiyonlu böceklerin belirlenmesiyle ilgili olarak en kolay gözlemlenebilecek hastalık belirtileridir. Canlı ve ölü böceklerde gözlemlenebilirler. Canlı böceklerde, entomopatojenlerin neden olduğu renk değişimi, bu böceklerin integümentlerinin şeffafdan yarı şeffafa dönüşmesiyle ilgilidir (Lacey ve Brooks, 1997).

Fiziksel değişimler ise bazı fungus türleri böcek vücudunun yüzeyinde aşırı ve renkli bir gelişim gösterebilirler. Enfeksiyon sonucu ölmüş böceklerin kadvraları çoğu

kez mumyalaşır, yumuşar, sıvı hale geçer, katılaştır veya kurur. Virüs enfeksiyonları sonucu birçok anatomik bozukluk ortaya çıkabilir (Lacey vd., 1996).

Ayrıca entomopatojenlerle enfekte olan böceklerde bazı davranış bozuklukları gözlemlenebilir. Bu bozukluklar arasında çok obur olan böceklerin beslenmeyi bırakması, agresiflik, alışılmadık yayılım ve çiftleşme davranışları sayılabilir. Örneğin; virüsler tarafından enfekte edilen bazı böcekler konak bitkinin en yüksek noktasına tırmanır ve bacaklarından asılarak ölürler (Lacey ve Brooks, 1997).

Arazi çalışmalarında canlı, hastalıklı veya ölü böcekler toplanırken bu işaretler göz önünde bulundurulmalı ve not edilmelidir. Çoğu durumda bu makroskobik incelemeler hastalığın doğru teşhisini yapmak için gerekli bilgiyi vermektedir (Lipa, 1975).

### 1.7.2. Mikroskobik İnceleme

Makroskobik incelemenin sonuçlandırılmasından sonra mikroskobik incelemeye başlanır. Böceklerde bulunan patojenlerin belirtileri ve mikroskobik incelemeleri patojenin grubuna göre farklılık gösterir.

**Bakteriler:** Bakterilerin karakteristik özelliklerini sıralamak zordur. Çünkü bir çok bakteri türü sağlıklı böceklerin vücudunda enfeksiyon oluşturmaksızın yaşayabilir. Bakteriler böceklerin hemolenfide bulunurlar. Böceğin kütikulasında herhangi bir hasar meydana getirmezler. Bu nedenle diğer entomopatojenlerin meydana getirdikleri makroskobik değişmelere bakterilerde pek sık rastlanmaz. Spor oluşturan bakterilerin enfeksiyonları daima böcek için öldürücüdür. Spor oluşturan çubuk şekilli bakteriler ışık mikroskobu altında gözlemlenebilir. Bir bakterinin neden olduğu bir hastalıktan şüphelenildiğinde, böcek hemolenfinden numuneler hazırlanarak genel besiyerleri üzerine ekim yapılmalıdır.

**Virüsler:** Virüslerin neden olduğu enfeksiyonlarda, bozulma ve hücre dağılması hipodermiste kolaylıkla görülebilir. Yağ dokularında kristale benzer inklüzyon yapıların varlığı viral bir hastalığın olduğunu gösterir.

**Nematodlar:** Nematodlar bazen böcek kütikulasında gözlemlenebilir. Fakat nematodların belirlenmesi için çoğu kez böceğin diseksiyonu gerekir. Eğer böcek ölü ise,



gliserin ya da laktofenol içerisinde diseksiyon yapmak daha uygundur. Malpigi tüpleri, hemosol, bağırsak gibi kısımlar incelenerek nematod varlığı tespit edilir. Böceklerde bulunan nematodların boyutları 1 mm ile birkaç santimetre arasında değişir. Cins ve tür düzeyinde tanımlama için ergin nematodların belirlenmesi, ölçümlerinin yapılması ve çeşitli kısımlarının fotoğraflanması gerekir (Kaya ve Stock, 1997).

**Protozoalar:** Protozoa enfeksiyonlarının belirlenmesi için böceğin diseksiyonu gerekir. Olgun sporlar hemolenfte çok kolayca görülebilir. Bazı durumlarda protozoa sporlarını, fungus sporlarından ayırmak için Giemsa boyaması gerekebilir (Undeen ve Vavra, 1997).

## **1.8. Bakterilerin Tür Tayininde Kullanılan Kriter ve Yöntemler**

### **1.8.1. Nümerik Taksonomi**

Nümerik taksonomi, bakterilerin karakterizasyonun ve sistematığının yapılması amacıyla hazırlanan bir dizi testi içerir. Bu testler, mikroorganizmalar arasındaki farklılıklardan faydalanarak doğru taksonomik katagorilere yerleştirilmelerini sağlar.

Bu testler sonucunda bakterilerin, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve büyüme özellikleri ortaya çıkarılır.

**Morfoloji:** Bakterilerin tür tayinlerinde ilk olarak ortaya çıkarılması gereken özellik, hücre şeklidir. Hücre şeklinin ortaya çıkartılması için basit boyama yapılır ve mikroskop altında incelenir (Benson, 1985).

Bakteriyolojide kullanılan en önemli ayırt edici boyamalardan birisi de Gram boyamadır. Bu boyama yöntemi, bakterilerin hücre duvarındaki farklılığın ortaya çıkarılması amacıyla yapılır. Gram boyama sonucuna göre bakteriler, Gram pozitif ve Gram negatif olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bu özellik bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan en önemli kriterlerden birisidir (Sneath, 1986).

Bazı bakteriler, ortam şartları yaşam için uygun olmayan hale geldiğinde, endospor olarak adlandırılan yeni bir hücre içi yapı meydana getirirler. Bir bakterinin endospor

oluşturup oluşturmadığının bilinmesi ve varsa endosporun pozisyonu taksonomik açıdan önemlidir. Bu özelliklerin belirlenmesi amacıyla endospor boyama yapılır.

Bazı bakteriler hücrelerin dış yüzeyinde polisakkaritlerden oluşan ve kapsül adı verilen bir yapıya sahiptir. Bu yapının varlığı veya yokluğu sistematikte kullanılan karakterlerden biridir. Bunu belirlemek için kapsül boyama yapılır (Cappuccino ve Sherman, 1992).

**Büyüme:** Bakterilerin inoküle edildikleri besiyerinde oluşturdukları, koloni morfolojisi, pigment oluşumu ve üreme süresi gibi karakterlerdir. Bu karakterlerden her biri sistematik açıdan büyük önem taşır ve mikroorganizmanın farklı taksonomik kategoriye yerleştirilmesini sağlar.

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

Sıcaklık, hücresel enzimler üzerinde etkili olarak, kimyasal reaksiyonların hızını etkilemektedir. Genellikle, bütün hücre tiplerinde optimum sıcaklık 20-40°C civarındadır. Fakat bazı bakteriler (örneğin, termofilik bakteriler) ısıya dayanıklı enzimler üretirler. Dolayısıyla çok daha yüksek sıcaklıklarda hücresel aktivitelerini devam ettirebilirler. Yine bazı bakterilerin düşük sıcaklıklarda (örneğin 4°C'de) büyüebildikleri bilinmektedir (Palleroni, 1986). Bu nedenle sıcaklık toleransı bakteri sistematğinde kullanılan bir kriterdir.

Hücresel enzim aktivitelerini etkileyen bir diğer fiziksel etki de pH'dır. Hücrelerin genellikle yaşayabildiği optimum pH, nötral pH olan 7'dir. pH'da meydana gelen artış ve düşüşlerin her ikisi de, hücrelerdeki kimyasal reaksiyon hızlarının düşmesine yol açar. Bunun nedeni hücresel enzimlerin bozulmasıdır (Palleroni, 1986).

Çoğu bakterinin hayatlarını devam ettirmeleri için gerekli olan gaz atmosferik oksijendir. Mikroorganizmalar atmosferik oksijen ihtiyaçlarına göre aeroblar, mikroaerofiller, tamamen aeroblar, aerotolerant anaeroblar ve fakültatif anaeroblar olarak gruplandırılmaktadır (Cappuccino ve Sherman, 1992).

**Biyokimya:** Biyokimyasal katalizörler olarak bilinen enzimler, hem hücre içindeki hem de hücre dışındaki olayları katalizleyerek biyokimyasal aktiviteler meydana getirmektedirler (Sneath, 1986). Bu olaylar iki şekilde incelenmektedir.

a) Hücre dışı enzimler: Büyük molekül ağırlığına sahip olan maddeler hücre zarından geçemezler. Bu nedenle bu maddeler (polisakkaritler, lipidler, proteinler) daha düşük molekül ağırlığına sahip olan maddelere dönüştürülmelidir. Ancak bu durumda hücre zarından geçebilirler. Hücre dışındaki substratlara etki eden enzimler genel olarak, hücre dışı enzimler olarak adlandırılır. Hücre dışında görev yapan bu enzimler nişasta, lipid, jelatin gibi maddelerin hidrolizinden sorumludur. Bu enzimlerin varlığı veya yokluğu, mikroorganizmalar arasındaki genetiksel benzerlikleri veya farklılıkları göstermesi açısından sistematik olarak önemlidir.

Jelatin, zorunlu aminoasitlerden biri olan triptofanı içermeyen ve bu özelliği nedeniyle eksik protein olarak adlandırılan bir makromoleküldür.

Eksik bir protein olması dolayısıyla, hücre için besleyici değeri tartışılır olmasına rağmen, bakteri türlerinin karakterizasyonunda önemlidir (Cappuccino ve Sherman, 1992). Bakteriler bu proteini, jelatinaz enzimi yardımıyla aminoasitlerine kadar parçalar. Jelatinaz enziminin varlığı, jelatin hidroliz testi ile ortaya çıkarılmaktadır.

b) Hücre içi enzimler: Bu enzimler hücre içersinde faaliyet gösterir ve hücre için gerekli olan yeni protoplazmik ihtiyaçların sentezinden sorumludur. Bu tip enzimlerin kullanılmasıyla oluşan son ürünlerin anlaşılması, sadece özel enzim sistemlerinin aydınlatılması için değil, aynı zamanda bakterilerin sınıflandırılması ve teşhisi için de kullanılmaktadır (Cappuccino ve Sherman, 1992).

Çoğu mikroorganizmalar, kendileri için gerekli olan enerjiyi, karbonhidratlar gibi substratların biyooksidasyonunu gerçekleştiren enzimler yardımıyla elde ederler. Bazı mikroorganizmalar, glukoz gibi şekerleri anaerobik olarak fermente ederken, diğerleri ise aerobik veya fakültatif anaerobik olarak fermente etmektedirler. Bazı mikroorganizmalar da, glukozu fermente edebilecekleri enzim sistemlerinden yoksun olabilirler. Mikroorganizmalar karbonhidratların fermentasyonu sonucunda, organik asitlerin yanı sıra hidrojen ve karbondioksit gibi gazlar meydana getirirler. Karbonhidrat fermentasyonu testleri ile meydana gelen bu ürünler kullanılarak bir mikroorganizmanın herhangi bir karbonhidratı fermente edip etmedikleri anlaşılır (Sneath, 1986).

Triptofan, bazı bakterilerin enzimatik reaksiyonları için, oksidasyona uğraması gereken bir aminoasittir. Triptofanın sonuçta indol üretilen şekilde hidrolize edilebilme kabiliyeti tüm organizmalar için karakteristik olan bir özellik değildir ancak biyokimyasal

bir işaret olarak iş görmektedir. İndol testi yapılarak, mikroorganizmaların triptofanı oksidasyona uğratarak uğratmadıkları ortaya çıkarılmaktadır (Sneath, 1986).

Voges-Proskauer testi yardımıyla, bazı bakterilerin glukoz metabolizması sonucunda oluşan organik asitlerden, asetilmetil karbinol gibi nötral veya asidik olmayan son ürünleri üretebilme kabiliyetleri ortaya çıkarılır (Sneath, 1986).

Bazı bakteriler, fermente edebilecekleri glukoz veya laktoz ortamda mevcut olmadığında, enerji elde etmek için karbon kaynağı olarak sitrati kullanabilmektedirler. Mikroorganizmaların sitrati kullanıp kullanmadıkları, sitrat kullanım testleriyle ortaya çıkarılır (Sneath, 1986).

Mikroorganizmaların hidrojen sülfür ( $H_2S$ ) üretilip üretilmediği, bakteri sistematiğinde kullanılan kriterlerden biridir. Kükürt atomları, inorganik bileşiklerin oksidasyonu sırasında hidrojen akseptörü olarak iş görmektedir.

Bazı aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin nitratı indirgemesi, moleküler oksijen olmadığı durumlarda meydana gelir. Bakterilerin nitratı, nitrit veya amonyaka indirgeyip indirgemediği, nitrat indirgeme testi ile ortaya çıkarılmaktadır (Sneath, 1986).

Katalaz veya peroksidaz adı verilen enzimleri üretebilen bakteriler, bu enzimler yardımıyla, hücre için zararlı etki yapan hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) ortadan kaldırırlar. Bakterilerin katalaz enzimini üretilip üretilmediği, katalaz testi ile ortaya çıkarılır (Sneath, 1986).

Oksidaz enzimi, aerobik solunum sırasında elektron taşınımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bakterilerin oksidaz enzimine sahip olup olmadıkları, oksidaz testi ile belirlenir (Sneath, 1986).

### **1.8.2. Metabolik Enzim Profilleri ve Biyokimyasal Özelliklerine Göre Bakterilerin Tanısı ve Karakterizasyonu**

Karbonhidratlar yapı ve depo molekülü olup, enerji kaynağıdır. Mikroorganizmaların, çeşitli karbon kaynaklarını enerji kaynağı olarak kullanma ihtiyacında gösterdiği farklılıklar, tanı ve karakterizasyonda kullanılabilir. Bakteriler hayatlarını sürdürmek için biyoenerjiye ihtiyaç duymakta ve dışardan aldıkları

karbon kaynaklarını metabolik enzimlerle parçalayarak biyolojik enerjiye dönüştürmektedirler. Mikroorganizmaların farklı karbon kaynaklarını (basit şekerler, alkoller, aminoasitler, deterjanlar, aminoasit benzeri moleküller) kullanımında gösterdikleri farklılıklar metabolik profil olarak adlandırılmaktadır ve profildeki bu farklılık sahip oldukları metabolik enzim çeşitliliğine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Black ve Sweetmore, 1994; Gamo ve Shoji, 1999). Mikroorganizmaların arasındaki metabolik farklılıkları saptamak için farklı moleküler teknikler geliştirilmiştir.

İlk defa 1989 yılında, farklı karbon kaynaklarının kullanımına bağlı olarak mikroorganizmaların tanısı, sınıflandırılması ve karakterizasyonunda çalışmak üzere bir test paneli (çok gözlü mikro kap) sistemi geliştirilmiştir. 1990'lı yılların ikinci yarısından itibaren özellikle klinik laboratuvarlarda yapılan rutin testlerde kullanılmak için hizmete sunulmuştur.

Hazırlanan mikroorganizma süspansiyonlarının panel testleri üzerindeki farklı karbon kaynakları ile kodlanmış çukurcuklara verilmesi sonucunda, onların karbon substratlarını kullanımına bağlı olarak ortamda organik asit içerikli metabolitler üretilmekte ve ortam asidik özellik kazanmaktadır. Oluşan organik asit ise pH indikatörü boya ile reaksiyona girmekte ve sonuç renklenme şeklinde gözlenmektedir.

Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar da panel testleri tekniğinin, mikrobiyal tanı, sınıflandırma ve karakterizasyonda kullanılabilecek etkili, hızlı, güvenilir, hassas ve düşük maliyetli bir yöntem olduğu onaylanmaktadır (Şahin, 2003).

API 20E Panel Test Sistemi: Bir panel içerisine yan yana yerleştirilmiş kuyucuklardan oluşmaktadır. Her bir kuyucuk farklı bir biyokimyasal özelliği belirlemek amacı ile çeşitli substrat veya indikatörleri içermektedir (Tablo 5). Testlerden bazıları inkübasyondan sonra direk olarak testin sonucunun çeşitli renklerle belirlenmesini sağlarken, diğer bir kısmı ise ayıraç damlatıldığında renk değişikliği ya da kabarcık oluşumu gibi gözle görülebilen değerlendirmeler yapılabilmesini sağlar. Ekimi yapılacak olan izolatlar bu test paneline aktarılmadan önce genel sıvı bir besiyerinde Mc Farland standardına göre 1, yavaş büyüyen izolatlarda ise bu standart 2 olacak şekilde süspansiyonları hazırlanır (Ek 1).

Tablo 5. API 20E panel test sisteminin içerdiği testler

Testler	Substrat	Belirlenen Reaksiyon	Negatif Sonuçlar	Pozitif Sonuçlar
<b>ONPG</b>	ONPG	Beta-galaktosidaz	Renksiz	Sarı
<b>ADH</b>	Arginin	Arginin dihidrolaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
<b>LDC</b>	Lisin	Lisin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
<b>ODC</b>	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
<b>CIT</b>	Sitrat	Sitrat kullanımı	Açık yeşil / Sarı	Mavi-Yeşil / Mavi
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Na thiosulfate	H <sub>2</sub> S üretimi	Renksiz / Gri	Siyah tortu
<b>URE</b>	Üre	Üre hidrolizi	Sarı	Kırmızı / Turuncu
<b>TDA</b>	Triptoofan	Deaminaz	Sarı	Kahverengi / Kırmızı
<b>IND</b>	Triptofan	İndol üretimi	Sarı	Kırmızı (2 dk.)
<b>VP</b>	Na piruvat	Aseton üretimi	Renksiz	Pembe / Kırmızı (10 dk)
<b>GEL</b>	Kömür jelatin	Jelatinaz	Siyah tabaka dağılmamış	Siyah tabaka dağılmış
<b>GLU</b>	Glukoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi-Yeşil	Sarı
<b>MAN</b>	Mannitol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
<b>INO</b>	İnositol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
<b>SOR</b>	Sorbitol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
<b>RHA</b>	Ramnoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
<b>SAC</b>	Sucrose	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
<b>MEL</b>	Melibiose	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
<b>AMY</b>	Amigdalin	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
<b>ARA</b>	Arabinoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı

Ferm. / oks.: Fermantasyon ve oksidasyon olaylarını göstermektedir.

API 50CH Panel Test Sistemi: İzolatların karakterizasyonlarında API 20E test sistemlerinin sahip olduğu testlerden daha fazla sayıda teste sahip olan bu sistem, Gram + bakterilerin teşhisinde kullanılır (Tablo 6). Ekimi yapılacak olan izolatlar bu test paneline aktarılmadan önce genel sıvı bir besiyerinde Mc Farland standartlarına göre 0,5 olacak şekilde süspansiyonları hazırlanır (Ek 1).

Tablo 6. API 50CH panel test sisteminin içerdiği testler

<b>Test adı</b>	<b>Substrat</b>
K	Kontrol
Gly	Gliserol
Ery	Erytritrol
Dara	D-Arabinoz
Lara	L-Arabinoz
R1b	D-Riboz
Dxyl	D-Ksiloz
Lxyl	L-Ksiloz
Ado	D-Adonitol
Mdx	methyl-βD-xylopyranoside)
Gal	D-Galaktoz
Glu	D-Glukoz
Fru	D-Fruktoz
Mne	D-Mannoz
Sbe	L-Sorboz
Rha	L-Rhamnoz
Dul	Dulkitol
Ino	İnositol
Man	D-Mannitol
Sor	D-Sorbitol
Mdm	Metyl-αD-mannopyranoside
Mdg	Metyl-αD-glukopyranoside
Nag	N-acetylglukosamine
Amy	Amygdaline
Arb	Arbutin
Esc	Eskulin
Sal	Salicin
Cel	D-Celiobioz
Mal	D-Maltoz
Lac	D-Lactoz
Mel	D-Melibioz
Sac	D-Sakkaroz
Tre	D-Trehaloz
Inu	Inulin
Mlz	D-Melezitoz
Raf	D-Raffinoz
Amd	Amidon
Glyg	Glikojen
Xlt	Xylitol
Gen	Gentiobioz
Tur	D-Turanoz
Lyx	D-Lyxoz
Tag	D-Tagatoz
Dfuc	D-Fucoz

“Tablo 6’nın devamı”

Test adı	Substrat	
Lfuc	L-Fukoz	
Darl	D-Arabitol	
Larl	L-Arabitol	
Gnt	Potassium Glukonate	
2kg	Potassium	2-
	Ketoglukonate	
5kg	Potassium	5-
	Ketoglukonate	

### 1.8.3. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler, mikroorganizmaları meydana getiren makro moleküllerin içeriklerine, çeşitlerine ve oranlarına bağlı olarak elde edilen farklılıklardan hareket edilerek oluşturulmuştur. Bu yöntemler, karbonhidratları, lipitleri, proteinleri ve genetik materyali (DNA ve RNA) çalışma materyali olarak kabul etmekte ve bunlardan birinin veya kombinasyonlarının kullanımı ile mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonlarının yapılmasını sağlamaktadır (Manceau ve Horvais, 1997).

**16S rRNA Dizin Analizi:** Mikrobiyal tanımlama yöntemlerinin en önemlilerinden biri haline gelmiştir. Bu yöntemde her türün ribozomlarının 16S’lik küçük alt birimini kodlayan DNA sırasının oldukça özelleşmiş olmasından faydalanılır. Bakteri genomundaki 16S rRNA geninde devamlı aynı olan yani değişmeyen ve değişken olan bölgeler bulunmaktadır. Bakteri türlerinin teşhisinde bu değişken bölgeler kullanılmaktadır. 16S rRNA geninde 8 adet değişmeyen ve 9 adet değişken bölgenin olduğunu ortaya çıkarmış ve bazı araştırmacılar bu özellikleri kullanarak kültür edilmemiş bakterilerin bile 16S rRNA’larını polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yardımıyla özel primerler kullanarak artırmışlardır (Gray vd 1984; Reeves ve Nayduch, 2002).

**DNA-DNA Hibridizasyonu:** Nükleik asit dizileri arasındaki benzerliğin ortaya çıkarılması prokaryotların sistematığının yapılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Böylece genomlar arasındaki benzerlikler gerçekçi bir şekilde ortaya çıkarılmaktadır. Nükleik asit sıralarının ortaya çıkarılması esasına dayanan karşılaştırma çalışmalarında daha çok *in vitro* nükleik asit hibridizasyonunu esas alan çalışmalar yapılmaktadır (Stackebrandt ve Goodfellow, 1991).



Yeni bakteri türlerinin ortaya çıkarılmasında en çok kabul edilen parametre genomlar arasındaki DNA benzerliğidir.  $\Delta T_m$  (DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılma sıcaklığı) değerindeki benzerliğin oranı olarak ifade edilen bu değer mikroorganizmalar arasındaki uzaklığı göstermektedir. Bu değerler primer yapı seviyesinde genomik dizi benzerliğinin dolaylı bir yansımasıdır (Goodfellow ve O'Donnell, 1993). Bu yüzden de DNA'nın ayrılıp yeniden birleşmesini konu edinen yaklaşımlar birbirleriyle çok yakın olan prokaryotların akrabalığının gösterilmesinde çok kullanışlı yöntemlerdir (Wayne vd., 1987). Yapılan birçok çalışmada, DNA benzerliği ile kemotaksonomik, genomik, serolojik ve fenotipik benzerlikler arasında ilişki olduğu bulunmuştur ve bundan dolayı, DNA'nın iki zincirinin yeniden birleşmesi, türlerin ayrılmasında standart bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Stackebrandt ve Goebel, 1994). Yapılan birçok çalışma sonucunda tam olarak tanımlanmış birçok türün suşları arasında optimum hibridizasyon şartları uygulandığında % 70'den fazla bir benzerliğin olduğu görülmektedir (Schleifer ve Stackebrandt, 1983). Yapılan bütün bu çalışmalar bakteriyel sistematik komitesinin tür tanımında DNA-DNA bağlanma derecesine verdiği öneme ışık tutmaktadır. Bu komitenin kararı, bir bakteri türünün suşları arasındaki  $\Delta T_m$  derecesinin  $5^\circ\text{C}$  altındaki bir değerdeki DNA-DNA benzerliğinin %70 veya daha fazla olması gereğini ortaya koymaktadır (Wayne vd., 1987).

### 1.9. Mikroorganizmaların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Böceklerden izole edilen mikroorganizmaların, izole edildikleri böcek üzerinde patojenik bir etkiye sahip olup olmadıkları virulans testleriyle belirlenir.

Bu testler için böceğin biyolojisi göz önünde tutularak yaşayabilecekleri uygun ortamlar hazırlanır ve sağlıklı böcekler kullanılır. *In vitro* şartlarda üretilen mikroorganizmaların saf kültürleri hazırlanır ve uygulanır. *In vitro* olarak üretilmeyen virüsler, protozoalar ve diğer mikroorganizmaların enfeksiyon numunesi, ölü ve hastalıklı böceklerden elde edilir. Böceklerin enfeksiyonu için birçok metot bilinmektedir. Bu metodlar; besin içinde enfeksiyon, kütikula içine enfeksiyon, ağız ve çevresi içine enfeksiyon, mikroorganizmaları oral ve anal açıklıklar üzerine yerleştirmek, mikrobeseleme ve mikroenfeksiyon şeklinde sıralanabilir (Lipa, 1975).

Virülans testleri (biyoassay) süresi, uygulanan mikroorganizmaya göre değişiklik göstermektedir. Bakteriler ve virüsler gibi mikroorganizmaların virulans testlerinin genelde

5-10 gün sürdürülürken, böceklerde kronik enfeksiyonlar oluşturan protozoaların virülans testleri birkaç ay sürdürülebilir. Virülans testleri sırasında, diğer ölüm nedenlerinin sonuçlarından, mikroorganizmaların neden olduğu ölümleri ayırmak için, ölü böceklerin diseksiyonu yapılmalı ve gerçek ölüm nedeni araştırılmalıdır (Lipa, 1975; Lacey, 1997).

Yapılan virülans testlerinin sonuçları, istatistiksel metotlar kullanılarak matematiksel olarak ifade edilir. Bu amaç için kullanılan birçok metot bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı Abbott Formülüdür (Abbott, 1925) tarafından geliştirilen bu yöntem şu şekilde formüle edilebilir;

$$(\%) \text{ Ölüm oranı : } \frac{\text{Toplam ölüm oranı (\%)} - \text{Kontrol grubundaki ölüm oranı (\%)}}{(\%) 100 - \text{Kontrol grubundaki ölüm oranı (\%)}}$$

### 1.10. Çalışmanın Amacı

Tarım da büyük zararlara yol açan böceklerden biri olan, Avrupa danaburnu (*Gryllotalpa gryllotalpa*)'nun bakteriyal florasını belirlemek ve böylece bu zararlıya karşı etkin şekilde kullanılabilecek bir mikrobiyal kontrol ajanının varlığını araştırmaktır. Bu çalışma sonucunda bu zararlıya yönelik bir biyolojik kontrol ajanının tespiti, halen uygulanmakta olan çok zahmetli ve masraflı kimyasal mücadele çalışmalarına alternatif oluşturabilecek ve Türkiye'de tarım veriminin artmasını sağlayacağından ülkeye ekonomik açıdan katkılar sağlayacaktır. Aynı zamanda bu çalışma, ileride gerçekleştirilebilecek olan herhangi bir biyolojik mücadelenin temelini oluşturma özelliğine sahip olabilecektir.

## **2. YAPILAN ÇALIŞMALAR**

### **2.1. Böceklerin Toplanması**

Bu çalışma için gerekli olan *Gryllotalpa gryllotalpa* (Avrupa danaburnu) nimfleri, 2008 ve 2009 yıllarında Mayıs aylarının 1. ve 2. haftalarında, Tokat ilinin Zile ilçesinde ve Trabzon ilinde çeşitli tarım alanlarından toplanmıştır. Toplanan nimfler, toplandıkları yer ve tarih not edildikten sonra, içerisinde buldukları kumlu-killi topraktan çıkarılmadan laboratuara getirildi.

### **2.2. *Gryllotalpa gryllotalpa* Nimfleri için Laboratuarda Uygun Ortam Oluşturulması**

Laboratuara getirilen nimfler ilk olarak plastik kaplara yerleştirilerek gözlemlendi. Nimfler için ideal ortam olan kumlu-killi nemli toprak ortamlar hazırlandı ve bununla ilgili çalışmalar gerçekleştirildi.

### **2.3. *Gryllotalpa gryllotalpa*'nın Bakteriyal Florasının Belirlenmesi**

#### **2.3.1. Bakteri İzolasyonu**

Toplanan *G. gryllotalpa* nimflerinin bakteriyal florası belirlenmesi çalışmaları sonucunda 15 bakteri izole edildi. Elde edilen izolatların tür tayinlerinin tespiti için morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testler yapıldı.

Laboratuara getirilen sağlıklı *G. gryllotalpa* nimfleri 1 adet, steril tüp içerisine konularak %70'lik etil alkol ile 5 dakika yüzey sterilizasyonuna maruz bırakıldılar. Sonra içerisinde steril saf su bulunan petrilere alınarak 2-3 kez yıkanıp alkolden arındırıldı. Daha sonra tüpün üzerine 1 ml nütrient broth besiyeri ilave edildi. Steril bir homojenizatör ile larvaların iyice ezilmesi sağlandı. Elde edilen bu karışım bir tülbent vasıtasıyla süzülerek süzüntü başka bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Bu süzüntüden 10µl, 50µl ve 100µl alınarak üç ayrı nütrient agar besiyerine ekim yapıldı. Bu ekimler 30°C'lik etüvde 2-3 gün süre ile inkübasyona tabi tutuldular. Kalan süzüntü atılmayıp 30°C'de 5-6 saat inkübe edildi. Bu

inkübasyonun amacı çok düşük miktarlarda olabilecek olan mikroorganizmaların sayısını artırarak sonraki ekimde ortaya çıkabilmelerini kolaylaştırmaktır. Bu inkübe edilen süzüntüden 10 ve 50µl alınarak tekrar nütrient agar besiyerlerine ekim yapıldı.

### **2.3.2. Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması**

İnkübasyonun ardından nutrient agar besiyeri üzerinde üreyen bakteriyal koloniler binoküler mikroskop altında incelendi ve farklı koloni renk ve morfolojilerine sahip olanlar steril edilmiş platin özeyle dikkatlice seçilerek çizgi ekimleri yapıldı ve saf kültürler elde edildi. Elde edilen saf koloniler, numaralandırılarak, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere %87'lik steril gliserol içersinde – 80 °C'de stoklandı.

### **2.3.3. Bakteriyal İzolatların Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi**

#### **2.3.3.1. Basit Boyama**

Elde edilen izolatların hücre şekillerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak basit boyamalar yapıldı. Bu amaçla her bir izolat nutrient broth besiyerine ekildi ve 30°C'ye ayarlı su banyosunda inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik kültürlerden bakteriyal smear hazırlandı. Hazırlanan smearlar alevden geçirilmek suretiyle tespit edildi. Daha sonra kristal viole boya solüsyonu ilave edildi, 1-2 dakika beklendikten sonra, dH<sub>2</sub>O ile yıkandı ve kuruduktan sonra mikroskop altında incelendi (Benson, 1985).

#### **2.3.3.2. Gram Boyama**

Gram boyama, bakterilerin hücre duvarının içeriği hakkında bilgi veren bir boyama türüdür. Gram negatif olarak boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka, gram pozitif olarak boyanan bakterilere göre çok daha incedir. Gram boyama için her bir izolat nutrient broth besiyerine ekildi ve 30°C'ye ayarlı su banyosunda 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. Bakteriyal smear hazırlandı ve alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smear, 1 dakika kristal viole ile muamele edilerek dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Kuruması beklenmeden 1 dakika lügolle muamele edildi. Aseton-alkolle renk giderilinceye kadar

yıkandıktan sonra, renk kaybını durdurmak için hemen dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. 30-60 saniye safraninle muamele edildi ve tekrar dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Açık havada kurutulduktan sonra mikroskop altında incelemeye alındı. Mor renkle boyanan bakterilerin gram pozitif, pembe renk ile boyanan bakterilerin ise gram negatif olduğuna karar verildi (Cappuccino ve Sherman, 1992).

#### **2.3.3.3. Endospor Boyama**

İzolatların endospor oluşturup oluşturmadığını ve varsa endosporun hücre içersindeki pozisyonunu belirlemek amacıyla, her bir izolat nutrient broth besiyerine ekildi ve 48-72 saat 30°C'ye ayarlı su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından bakteriyal smear hazırlandı ve alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smearlar küçük bir filtre kağıdıyla kapatılarak, malaşit yeşili ile 5 dakika boyunca su buharı üzerinde boyandı. dH<sub>2</sub>O ile yıkandı ve 30-60 saniye boyunca safraninle muamele edildi. Tekrar dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak açık havada kurutuldu. Mikroskop altında incelenerek kırmızı renkli hücreler içersinde yeşile boyanmış sporların varlığı araştırıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992).

#### **2.3.3.4. Kapsül Boyama**

İzolatların kapsül yapısına sahip olup olmadıklarının belirlenmesi için her bir izolat nutrient broth besiyerine ekilerek, 30°C'ye ayarlı su banyosunda 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Bakteriyal smear hazırlandı ve açık havada kurutuldu. Kristal viole boyası ile 5-7 dakika boyandı. %20'lik CuSO<sub>4</sub> ile yıkandı ve açık havada kurutulduktan sonra mikroskop altında incelendi. Kapsül boyama negatif bir boyama yöntemidir. Buna göre, mavi renkli bir sahada, mor-eflatun renkli boyanmış hücrelerin etrafında boyanmamış şeffaf bir bölgenin olması, kapsülün varlığını gösterir (Cappuccino ve Sherman, 1992).

#### **2.3.3.5. Hareket Testleri**

İzolatların hareketli olup olmadığının araştırılması için "lam-lamel arası preparasyon" tekniği kullanıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992). Bu teknikle izolatların

hareketli olup olmadığının ortaya çıkarılması için hazırlanan 24 saatlik kültürlerden bir öze dolusu alındı ve temiz bir lam üzerine konulup lamelle kapatıldı. Hazırlanan bu preparat mikroskopta incelendi ve izolatların hareketli olup olmadığına karar verildi.

### **2.3.4. Bakteriyal İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **2.3.4.1. Bakterilerin Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi**

İzolatların maksimum ve minimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla bakteriler nutrient broth besiyeri içerisine ekildiler (Sneath, 1986).

İzolatların büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla nutrient broth besiyeri içinde yapılan 16-24 saatlik kültürlerden,  $OD_{600} = 0,1$  olacak şekilde yeniden nutrient broth besiyerine ekim yapıldı. Hazırlanan kültürler 27, 30, 37, 40 ve 50°C'de 18 saat sallayıcıda büyütüldüler. Yapılan bu kültürlerden örnekler alınarak spektrofotometrede  $OD_{600}$ 'de absorbans değerleri ölçülerek bakterilerin büyüdüğü sıcaklıklar ortaya çıkarıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992).

#### **2.3.4.2. Bakterilerin Büyüebildikleri pH Aralıklarının Belirlenmesi**

İzolatların büyüebildiği pH aralığının belirlenmesi için izolatlar değişik pH değerlerine (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) sahip nutrient broth besiyerlerine inoküle edildiler ve 30°C'ye ayarlı etüvde üç gün inkübe edildiler. İnkübasyon neticesinde üreme olup olmadığına spektrofotometrede ( $OD_{600}$ 'de) ölçümler yapılarak karar verildi (Cappuccino ve Sherman, 1992).

#### **2.3.4.3. NaCl Toleranslarının Belirlenmesi**

İzolatların NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla %2, 4, 6, 7, 8.5 oranında NaCl eklenmiş nutrient broth besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerlerinden 4'er ml deney tüplerine alınarak her bir izolattan ekim yapıldı. 14 gün boyunca 30°C'ye ayarlı etüvde inkübe edildiler. Üreme olan ve olmayan tüpler belirlenerek, izolatların hangi oranlarda tuzu tolere edebildiklerine karar verildi (Sneath, 1986).

### **2.3.5. Bakteriyal İzolatların Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi**

#### **2.3.5.1. Nişasta Hidroliz Testi**

İzolatların nişastayı hidroliz edip etmediklerinin belirlenmesi için “nişasta agar besiyerleri” hazırlandı. Bu besiyerini içeren petrilere her bir izolattan çizgi ekim yapıldı. 3 ve 7 gün boyunca 30°C’ye ayarlı etüvde inkübe edildiler. İnkübasyondan sonra petrilere üzerine lügol ilave edildi ve koyu kahverengi rengin oluşumu nişastanın hidroliz olduğunu, mavi rengin oluşumu ise nişastanın hidroliz olmadığını gösterdi (Benson, 1985).

#### **2.3.5.2. Jelatin Hidroliz Testi**

Jelatinin besleyici etkisinin olup olmadığı, zorunlu bir amino asit olan triptofanı içermediği için hala tartışılan bir konudur. Ancak, bakteri sistematiği açısından büyük önem taşımaktadır. Jelatin, insan ve hayvanlardaki bağ dokusunun ana maddelerinden biri olan kollojenin hidrolizi sayesinde elde edilen bir proteindir. Jelatin, 25°C’nin altındaki sıcaklıklarda jel özelliğini koruyarak katı kalırken, 25°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda sıvı hale dönüşür.

Jelatinin izolatlar tarafından hidroliz edilip edilmediğinin ortaya çıkarılması amacıyla hazırlanan nutrient jelatin besiyeri, steril deney tüplerine döküldü. İzolatların her biri, bu deney tüplerine ekildikten sonra 30°C’de, 72-96 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda inkübe edilen tüpler etüvden alınarak, 20°C’ye ayarlı yeni bir etüve aktarıldılar. Burada 4 saat inkübe edildikten sonra besiyerinin sıvı oluşuna göre testin pozitif, katı oluşuna göre negatif olduğuna karar verildi (Cappucino ve Sherman, 1992).

#### **2.3.5.3. İndol Oluşumu Testi**

Triptofan aminoasidi bazı bakteriler tarafından karbon, azot ve enerji kaynağı olarak kullanılırken, bazı bakteriler tarafından da maddelerin enzimatik yollarla oksidasyonlarını artırmak amacıyla kullanılır. Bakteriler triptofan aminoasidi içeren besiyerlerinde büyüdüklerinde, triptofanaz enzimi üretilir, triptofanı parçalayarak indol, pürvik asit ve

amonyum oluşumunu sağlarlar. Bakterilerin triptofanı kullanıp kullanmadıkları, ortamda indolün varlığı veya yokluğu ile anlaşılır.

Bu test için “triptofan broth besiyeri” hazırlandı. Steril tüplere 4'er ml döküldü ve herbir izolattan tüplere ekim yapıldı. 30°C'de, 48 saat inkübe edildi. Daha sonra tüplere ayıraç olarak 1 ml kovack's kimyasalı ilave edildi. Tüpün üst kısmında kırmızı bir halkanın oluşup oluşmamasına göre testin sonucunun pozitif veya negatif olduğuna karar verildi.

#### **2.3.5.4. Sitrata Testi**

Bazı bakteriler ortamda fermente edebilecekleri maddeler (glukoz, laktoz gibi) bulunmadığı durumlarda sitrati karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler. İzolatların sitrati fermente edip etmediklerinin belirlenmesi için, “Simmon's sitrat besiyerinden” slantlar hazırlandı. Her bir izolattan slantlara ekim yapıldı ve 30°C'de, 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından besiyerinin renginin yeşilden maviye dönüşüp dönüşmemesine göre testin sonucuna karar verildi.

#### **2.3.5.5. Hidrojen Sülfür (H<sub>2</sub>S) Üretim Testi**

İzolatların hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) üretilip üretilmediğinin belirlenmesi amacıyla Kligler Iron Agar (KIA) besiyeri kullanıldı. Herbir izolat, KIA besiyerinden hazırlanan slantlara ekildi ve 30°C'de 48-72 saat inkübe edildi. Eğer izolatlar sülfat kaynağı olarak besiyeri içerisinde bulunan sodyum tiosülfattan H<sub>2</sub>S üretirlerse, oluşan H<sub>2</sub>S, yine besiyeri içerisinde indikatör olarak bulunan demir sülfat ile reaksiyona girerek siyah bir çökelek oluşturur. İnkübasyonun ardından slantların alt kısmında siyah rengin oluşup oluşmamasına göre testin sonucuna karar verildi (Benson, 1985).

#### **2.3.5.6. Üre Hidroliz Testi**

Bazı bakteriler üreaz enzimi üreterek, üreyi alkalik bir son ürün olan amonyak ve CO<sub>2</sub>'e dönüştürürler. İzolatlarda üreaz enziminin varlığının belirlenmesi amacıyla “üre hidroliz besiyerleri” hazırlandı. Herbir izolattan besiyerine ekim yapılarak, 30°C'de 48-72



saat inkübe edildi. Eğer izolatlar üreaz enzimi üretiyorlarsa, ürenin amonyağa parçalanması sonucu alkali bir ortam oluşur. Bu da, besiyeri içerisinde indikatör olarak bulunan fenol kırmızısının, besiyerinin rengini koyu pembeye dönüştürmesine yol açar. İnkübasyonun sonucunda besiyerinin koyu pembeye dönüşüp dönüşmediğine bakılarak testin sonucuna karar verildi (Cappucino ve Sherman, 1992).

### **2.3.5.7. Nitratı İndirgeme Testi**

Nitratın indirgenmesi, bazı aerobik ve fakültatif anaerobik bakteriler tarafından moleküler oksijenin yokluğunda meydana gelen anaerobik bir olaydır. Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrat redüktaz enzimi sayesinde nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) indirgenir. İzolatların nitratı nitrite indirgeyip indirgemediklerinin ortaya çıkarılması amacıyla “nitrat broth besiyeri” hazırlandı ve steril tüplere 4'er ml döküldü. Her bir izolattan tüplere ekim yapıldı ve  $30^\circ\text{C}$ 'de 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda izolatların nitratı indirgeyip indirgemedikleri ortama iki farklı çözeltinin ilavesiyle belirlendi. Ortama Çözelti-I (sülfanilik asit) ve Çözelti-II (dimetil- $\alpha$ -naftilamin)'den 250'şer  $\mu\text{l}$  eklenmesi sonucu, koyu kırmızı renk oluşumu gözlenip gözlenilmemesine göre testin sonucuna karar verildi (Benson, 1985).

Ayrıca, testin negatif sonuç vermesi yani herhangi bir renk değişiminin gözlenilmemesi durumunda iki muhtemel sonuç vardır. Ya nitrat izolatlar tarafından nitrite indirgenememiştir ya da nitritten sonra amonyum veya moleküler azota kadar parçalanmıştır. Bu durumun belirlenmesi için ortama (çözelti-I ve çözelti-II ilavesi sonucu renksiz olan besiyerine) çinko tozu ilave edildi. Çinko tozu ilavesinden sonra pembe renk oluşumu negatif sonuç olarak değerlendirildi. Çünkü bu durum, nitratın nitrite izolatlar tarafından değil de, çinko tarafından indirgenmiş olduğunu gösterir. Eğer çinko tozu ilavesi sonucu hala renk değişimi gözlenmiyorsa, nitratın nitritten sonra amonyum ve azota indirgenmiş olduğu anlaşılır (Benson, 1985).

### **2.3.5.8. Katalaz Testi**

Bakteriler, aerobik solunum sırasında hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve bazı durumlarda ise tamamen toksik olan süperoksitler üretmektedir. Mikroorganizmalar, oluşan bu ürünlerin olumsuz etkisinden, bu maddeleri katalaz ve peroksidaz enzimlerinin yardımıyla

yıkarak kurtulmaya çalışırlar. İzolatların katalaz enzimi oluşturup oluşturmadıklarının ortaya çıkarılması amacıyla “triptik soy agar besiyeri” hazırlandı. İzolatlar bu besiyerini içeren petrilere ekildikten sonra, 24-48 saat 30°C’de inkübe edildiler. İnkübasyonun ardından petrilere %10’luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz kabarcıklarına göre testin pozitif olduğuna karar verildi (Cappucino ve Sherman, 1992).

#### **2.3.5.9. Oksidaz Testi**

İzolatların oksidaz enzimi üretilip üretilmediğinin belirlenmesi amacıyla triptik soy agar besiyerleri hazırlandı. Her bir izolattan bu besiyeriyi içeren petrilere çizgi ekim yapıldı. 30°C’de 24-48 saat inkübe edildikten sonra petrilere oksidaz testi ayırıcı ilave edildi. Oluşan siyah renge göre testin pozitif olduğuna karar verildi (Benson, 1985).

#### **2.3.6. API 20E Panel Test Sistemi**

Bu test uygulanırken nütrient agar üzerinde büyütülmüş gece kültürleri bir öze ile alınarak %0.85 NaCl içerisinde iyice karışması sağlanır. Burada aktarılabilecek olan kültür miktarı McFarland standardı kullanılarak belirlenir (Bak Ek 1.). Hazırlanan bu kültür daha sonra tüm kuyucuklara doldurulur, bu aşamada bazı kuyucuklar tam doldurulurken bazı kuyucukların ise mineral yağ ile üzeri kapatılır. Bu aşamada kuyucuk içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmelidir. Daha sonra bu API panelleri 18-24 saat inkübasyona tabii tutulurlar. Elde edilen sonuçlar Tablo 5’de tanımlandığı gibi renklerine bakarak sonucun pozitif mi yoksa negatif mi olduğuna karar verildi.

#### **2.3.7. API 50CH Panel Test Sistemi**

İzolatların bu test sisteminde değerlendirilmelerinin yapılabilmesi bir gece önceden bakterileri genel bir besiyeri olan trptone soy agar besiyeri üzerine çizgi ekimleri yapıp elde edilen tek koloniler 3ml besiyeri içerisinde 3 ml sıvı besiyeri içerisinde Mc Farland standardı 0,5 olacak şekilde hazırlanır. Hazırlanan bu bakteri karışımı panel testleri sahip olduğu başlangıç gözeneğine ilave edilip panel dik tutularak bakteri karışımının tüm test kuyucuklarına aynı anda ulaşması sağlandı. Ekimi yapılmış panel testleri yerleştirildikten

sonra 24 saat ila 48 saat arasında inkübasyona tabi tutuldu. Bu panel sisteminin API 20E'den farkı panele sonradan ayıraç damlatılmamasıdır.

### **2.3.8. İzolatların Bazı Genetiksel Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **2.3.8.1. İzolatların Genomik DNA'larının İzolasyonu**

Genomik DNA'nın izolasyonu, Sambrook (1989) ve arkadaşlarına göre gerçekleştirildi. Elde edilen DNA pelleti, 50-100µl steril TE tamponunda çözülerek +4°C'de kullanılmak üzere saklandı.

#### **2.3.8.2. 16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Çoğaltılması**

16S rRNA genleri, her bir izolattan saflaştırılan genomik DNA'dan UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') ileri ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3') geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonlarının şartları Beffa (1996)'ya göre oluşturuldu. 12 ng kalıp DNA, 5 ul 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM d ATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril saf su ile 50µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200µl'lik tüplerde, "Biometra Personal Cycler"da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denatürasyon basamağı 95°C'de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü 94°C'de 1 dakika (denatürasyon için), 56°C'de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72°C'de 2 dakika (polimerizasyon için) şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5µl'si % 1,1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5µg/ml) ile boyandıktan sonra "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntüledi.

#### **2.3.8.3. 16S rRNA Geninin Baz Dizisinin Belirlenmesi ve Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması**

Yukarıda açıklanan primerler kullanılarak genomik DNA'dan çoğaltılan 16S rRNA genleri klonlama vektörü olan pGEM-T easy vektörüne klondandı ve doğruluğu teyit edilen klonların baz dizin analizi MacroGen firması (Korea) tarafından gerçekleştirildi.

Elde edilen yaklaşık 1500 bp uzunluğundaki 16S rRNA dizileri Gen Bankasında var olan dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı.

## **2.4. İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi**

### **2.4.1. İzolatların Biyoassay İçin Hazırlanması**

Elde edilen izolatlardan 24 saatlik gece kültürleri hazırlandı. Bu gece kültürlerinin yoğunlukları OD<sub>600</sub>'de ölçülerek kaydedildi. 3.000×g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra izolatların pelletleri alındı. Her bir çökelti ml'sinde 1,8x10<sup>9</sup> ya da 3,6x10<sup>9</sup> bakteri /ml olacak şekilde PBS (Phosphate Buffered Saline) ile sulandırıldı. PBS çözeltisi 100 ml saf suya bir tablet PBS konularak hazırlandı (Ben-Dov vd., 1995).

### **2.4.2. İzolatlardan Hazırlanan Numunelerin *G. gryllotalpa* Nimflerine Uygulanması**

*G. gryllotalpa*'dan izole edilen izolatların uygulanması, ependorf tüpler kullanılarak gerçekleştirildi. PBS ile uygulama amacıyla hazır hale getirilen solüsyonlar eşit boyutlarda küp şeklinde hazırlanan patates ve havuçlara 6 dk. boyunca emdirilmesi sağlandı. Uygulama yapılırken 10'ar adet larva kullanılarak iki tekrar gerçekleştirildi. Normal sağlıklı bireylerden elde edilen izolatlar içinse sadece 3'er larva ile uygulama yapıldı.

### **2.4.3. İzolatlardan Hazırlanan Numunelerin *Malacosoma neustria* Larvalarına Uygulanması**

*G. gryllotalpa*'dan nifmlerinden elde edilen bakteriyal izolatların insektisidal etkilerin daha ayrıntılı olarak test edebilmek adına farklı ve önemli bir zararlı olan *Malacosoma neustria* 3. instar larvaları üzerinde insektisidal aktivitelerinin olup olmadığı araştırıldı. Her bir çökelti ml'sinde 1,8x10<sup>9</sup> bakteri/ml bakteri olacak şekilde PBS (Phosphate Buffered Saline) ile sulandırıldı. PBS çözeltisi 100 ml saf suya bir tablet PBS konularak hazırlandı (Ben-Dov vd., 1995).

### **3. BULGULAR**

Bu çalışmada, *Gryllotalpa gryllotalpa* (Avrupa danaburnu)'nun bakteriyal florası belirlenmeye çalışıldı. Çalışmalar sonucunda 15 bakteri izole edildi bunlardan 12 si tür 3 tanesi cins seviyesinde belirlendi. Elde edilen izolatların tür tayinlerinin yapılabilmesi için morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler yapıldı. Elde edilen izolatların bu zararlı üzerindeki insektisidal etkileri araştırıldı.

#### **3.1. *G. gryllotalpa* Ergin ve Nimflerinden Bakteri İzolasyonu**

Bakteri izolasyonu yapılacak olan ergin ve nimflerin yüzey sterilizasyonu yapılarak, PBS içersinde ekstraktları hazırlandı. Elde edilen ekstraktlar seyreltilerek nutrient agar besiyeri üzerine yayma ekim yapıldı ve 30 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonucu petriyer üzerinde oluşan koloniler dikkatlice seçilerek çizgi ekim yöntemiyle saflaştırıldı. Saflaştırılıp numaralandırılan toplam 35 izolattan koloni, renk ve morfolojilerine göre farklı olduğuna karar verilen 15 tanesi, diğer testlere tabi tutulmak üzere ayrıldılar. Bu izolatların izole edildikleri kaynak (ergin veya nimf, ölü veya canlı *G. gryllotalpa* bireyleri) Tablo 7'de verilmiştir.

#### **3.2. İzolatların Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Tür Tayinlerinin Yapılması**

##### **3.2.1. İzolatların Morfolojik Özellikleri**

İzolatların morfolojik özellikleri Tablo 7'de verilmiştir. Binoküler mikroskop incelemeleri sonucunda Gg1 nolu izolatan kolonileri krem, filamentli, Gg2 nolu izolatan kolonileri krem, düz kenarlı, Gg3 nolu izolatan kolonileri krem, dalgalı, Gg4 nolu izolatan kolonileri hafif sarı, Gg5 nolu izolatan kolonileri sarımtırak, düz kenarlı, Gg6 nolu izolatan kolonileri krem, merkezlerinde kabarcık gibi yığıntı oluşturmuş filamentli, Gg7 nolu izolatan kolonileri hafif sarımtırak geniş dalgalı, Gg8 nolu izolatan kolonileri krem düz kenarlı, Gg9 nolu izolatan kolonileri beyaz, tam dalgalı, Gg10 nolu izolatan kolonileri krem yayılcı, Gg11 nolu izolatan kolonileri krem çok hafif dalgalı geniş, Gg12 nolu izolatan

kolonileri krem geniş dalgalı, Gg13 nolu izolatın kolonileri krem sarı düz kenarlı, Gg14 nolu izolatın kolonileri krem düz kenarlı, Gg15 nolu izolatın ise kolonileri krem çok sık hafif dalgalı koloni morfolojisine sahip olduğu belirlendi.

Yapılan basit boyama sonucunda 15 izolatın tekli, zincir veya küme halinde basil formda olduğu görüldü.

İzolatların Gram boyamaları sonucunda Gg1, Gg3, Gg4, Gg7 ve Gg15 nolu izolatların mor renge boyandıkları için Gram pozitif, diğer izolatların pembe renge boyandıkları için Gram negatif oldukları belirlendi.

İzolatların spor boyaması sonucunda sadece Gg1, Gg3, Gg6 ve Gg7 nolu izolatın 72-96 saat içinde endospor oluşturduğu görüldü.

Yapılan hareket testleri sonucunda Gg6, Gg7, Gg15 nolu izolatların hareketsiz, diğer izolatların hareketli olduğu görüldü.

Tablo 7. İzolatların morfolojik özellikleri

İzolat adı	Koloni rengi	Koloni şekli	Gram boyama	Spor boyama	Spor şekli	Hareket testi	İzole edilen kaynak
Gg1	Krem	Flamentli	+	+	Terminal	+	ÖE
Gg2	Krem	Düz-yuv	-	-	ND	+	ÖE
Gg3	Krem	Dal-yuv	+	+	Merkezi	+	ÖE
Gg4	Krem-sarı	Kıv-yuv	+	-	ND	+	ÖE
Gg5	Sarı	Dal-yuv	-	-	ND	+	ÖE
Gg6	Krem	Filamentli-yuv	+	+	Subterminal	-	CE
Gg7	Hafif sarı	Dal-yuv	+	+	Merkezi	-	CE
Gg8	Krem	Düz-yuv	-	-	ND	+	CE
Gg9	Beyaz	Dal-yuv	-	-	ND	+	CE
Gg10	Krem	Yayılcı-yuv	-	-	ND	+	CE
Gg11	Krem	Dal-yuv	-	-	ND	+	CE
Gg12	Krem	Dal-yuv	-	-	ND	+	CE
Gg13	Krem	Düz-yuv	-	-	ND	+	CE
Gg14	Krem	Düz-yuv	-	-	ND	+	CE
Gg15	Krem	Dal-yuv	+	-	ND	-	CE

ND: Veri yok; Düz.: Düzgün; Yuv.: Yuvarlak; Dal.: Dalgalı; CL: Canlı larva; CE: Canlı ergin; ÖL: Ölü larva; ÖE: Ölü ergin

### 3.2.2. İzolatların Fizyolojik Özellikleri

İzolatların fizyolojik özellikleri Tablo 8’de verilmiştir. İzolatların büyümeleri üzerine etkili olan sıcaklık, pH ve NaCl’e karşı fiziksel özelliklerinin amacıyla testler yapıldı.

İzolatların NaCl’ye olan toleranslarının belirlenmesi amacıyla yapılan testler sonucunda %2 oranında NaCl içeren besiyerinde Gg7 ve Gg8 nolu izolatların büyümediği, diğer izolatların ise büyüebildiği, %4 oranında NaCl içeren besiyerinde Gg1 ve Gg4 nolu izolatların ise büyüemediği, Gg7 nolu izolatın ise çok az büyüebildiği, %6 oranında NaCl içeren besiyerinde Gg1, Gg4 ve Gg9 nolu izolatın büyümediği, %7 oranında NaCl içeren besiyerinde Gg1, Gg2, Gg3 ve Gg4 nolu izolatın büyüemediği, Gg5 ve Gg12 nolu izolatın çok az büyüebildiği, %8,5 oranında NaCl içeren besiyerinde Gg10 nolu izolatın çok az büyüebildiği, Gg11 ve Gg13 nolu izolatın büyüebildiği diğerlerinin ise büyüemediği tespit edildi.

Sıcaklığın izolatların büyümesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde 27°C’ de Gg1 ve Gg6 nolu izolatların çok az büyüebildiği, diğer izolatların büyüebildiği tespit edildi. 37°C’ de Gg7 ve Gg9 nolu izolatın çok az büyüebildiği, Gg1 ve Gg15 nolu izolatların büyümediği tespit edildi. 40°C’ de Gg1, Gg4, Gg7, Gg9 ve Gg15 nolu izolatların büyüemediği, Gg6 nolu izolatların çok az büyüebildiği, diğerlerinin büyüebildiği tespit edildi. 50°C’ de Gg6 nolu izolatın büyüebildiği diğer izolatların büyüemediği tespit edildi.



Tablo 8. İzolatların fizyolojik özellikleri

İzolat adı	Ph Testi							Sıcaklık Testi (°C)					NaCl Testi (%)			
	3	4	5	6	7	8	9	27	30	37	40	50	2	4	6	7
Gg1	-	-	-	-	-	+	+	W	+	-	-	-	+	+	+	-
Gg2	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Gg3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Gg4	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Gg5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Gg6	-	-	+	+	+	+	+	W	+	+	W	+	+	+	+	W
Gg7	-	-	-	-	-	-	W	+	+	W	-	-	-	W	+	+
Gg8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Gg9	-	-	-	-	-	W	+	+	+	W	-	-	W	+	-	-
Gg10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Gg11	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Gg12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	W
Gg13	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Gg14	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Gg15	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+

W: Zayıf

### 3.2.3. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri

İzolatların biyokimyasal özellikleri Tablo 9'da verilmiştir. Bazı enzimlerin varlığı veya yokluğu izolatların bazı organik maddeleri fermente edip edemediklerini belirlediği için bakteri sistematigi açısından büyük önem taşımaktadır. İzolatların bu enzimleri üretilip üretmediklerinin belirlenmesi amacıyla bir dizi test yapıldı.

İndol oluşum testi sonucu Gg5, Gg11, Gg13 ve Gg14 nolu izolatın indol oluşturduğu diğerlerinin ise oluşturamadığı gözlemlendi.

Katalaz testi sonucunda tüm izolatların katalaz enzimini üretebildiği tespit edildi.

Yapılan oksidaz testi sonucunda Gg6 nolu izolatın oksidaz aktivitesine sahip oldukları diğer izolatların ise oksidaz aktivitesi gösteremedikleri belirlendi.

Jelatin hidroliz testi sonucunda Gg2, Gg5, Gg6 ve Gg12 nolu izolatların jelatini hidroliz ettiği, diğer izolatların ise jelatini hidroliz etmediği görüldü. Sitrat hidroliz testleri sonucunda izolatların hepsinin sitratı hidroliz ettiği tespit edildi.

İzolatların sitratı kullanım ve nitratı indirgeme kabiliyetleri bakteri sistematigi açısından önemlidir. Bu amaçla yapılan testlerde tüm izolatların sitratı kullanabildikleri tespit edildi. Nitrat indirgeme testleri sonucunda Gg1, Gg2, Gg3, Gg5, Gg6, Gg8, Gg10, Gg11, Gg12 ve Gg14 numaralı izolatların nitratı indirgediği, Gg4, Gg7, Gg9, Gg13 ve Gg15 nolu izolatların ise indirgeyemediği görüldü. Ayrıca Gg14 numaralı izolatın nitratı nitritten sonra amonyum ve moleküler azota kadar indirgeyebildiği tespit edildi.

İzolatların sülfür metabolizması sonucu H<sub>2</sub>S gazı üretilip üretmediklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testler sonucunda hiçbir izolatın H<sub>2</sub>S gazı üretmediği belirlendi

Tablo 9. İzolatların biyokimyasal özellikleri

İzolatlar	Katalaz Testi	Oksidaz Testi	İndol Testi	Mac Conkey Agar	VP Testi	Sitrat Testi	Jelatin Testi	Üre Testi	Nitrat Testi	H <sub>2</sub> S Üretimi
Gg1	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Gg2	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
Gg3	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Gg4	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Gg5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Gg6	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Gg7	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Gg8	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Gg9	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Gg10	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Gg11	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
Gg12	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Gg13	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
Gg14	+	-	+	-	+	+	-	-	++	-
Gg15	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-

++: Nitratın amonyum ve moleküler azota indirgeme

### 3.2.4. API 20E Panel Test Sistemi ile Tespit Edilen Özellikler

API 20E panel testlerine yapılan ekimler 1 gece 30°C’de inkübe edildikten sonra bazı test kuyucukları direkt incelenerek bazıları ise ayıraç ilave edilerek izolatların bazı metabolik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. Büyümesi yavaş olan izolatlar Mc Farland standardına göre yoğunluğu 2 olacak şekilde 2 gece inkübe edilerek sonuçlar kaydedildi (Tablo 10).

Tablo 10. API 20E panel test sonuçları

Testler	Gg2	Gg7	Gg8	Gg9	Gg10	Gg11	Gg12	Gg13	Gg14
<b>Onpg</b>	+	-	+	+	+	-	-	-	+
<b>Adh</b>	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>Lcd</b>	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>Odc</b>	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>Cit</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>H2s</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Üre</b>	+	+	-	-	-	+	+	+	-
<b>Tda</b>	-	+	-	-	-	+	-	+	+
<b>Ind</b>	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<b>Vp</b>	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<b>Gel</b>	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<b>Glu</b>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<b>Man</b>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<b>Ino</b>	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<b>Sor</b>	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<b>Rha</b>	-	+	+	-	+	+	-	+	+
<b>Sac</b>	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<b>Mel</b>	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Amy</b>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<b>Ara</b>	+	-	+	-	+	-	-	-	+

### 3.2.5. API 50CH Panel Test Sistemi ile Tespit Edilen Özellikler

API 50CH panel testlerine yapılan ekimler 1 gece 30°C’de inkübe edildikten sonra bazı test kuyucukları direk incelenerek bazıları ise ayrıca ilave edilerek izolatların bazı metabolik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. Büyümesi yavaş olan izolatlar Mc Farland standardına göre yoğunluğu 0,5 olacak şekilde 2 gece inkübe edilerek sonuçlar kaydedildi (Tablo 11).

Tablo 11. İzolatların API 50CH panel test sonuçları

Test Adı	Substrat	Gg1	Gg3	Gg4	Gg6	Gg7	Gg15
<b>K</b>		-	-	-	-	-	-
<b>Gly</b>	Gliserol	+	+	-	+	-	-
<b>Ery</b>	Erytritrol	-	+	-	-	-	-
<b>Dara</b>	D-Arabinoz	-	-	-	-	-	-
<b>Lara</b>	L-Arabinoz	-	+	-	+	-	-
<b>Rib</b>	D-Riboz	+	+	-	+	-	-
<b>Dxyl</b>	D-Ksiloz	-	+	-	+	-	-
<b>Lxyl</b>	L-Ksiloz	-	-	-	-	-	-
<b>Ado</b>	D-Adonitol	-	-	-	-	-	-
<b>Mdx</b>	Methyl-βD-xylopyranoside)	-	-	-	-	-	-
<b>Gal</b>	D-Galaktoz	-	-	-	-	-	-
<b>Glu</b>	D-Glukoz	+	+	+	+	+	+
<b>Fru</b>	D-Fruktoz	+	+	-	+	+	-
<b>Mne</b>	D-Mannoz	-	-	+	+	+	-
<b>Sbe</b>	L-Sorboz	-	-	-	-	-	-
<b>Rha</b>	L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-
<b>Dul</b>	Dulkitol	-	-	-	-	-	-
<b>Ino</b>	İnositol	-	-	-	+	-	-
<b>Man</b>	D-Mannitol	-	-	+	+	+	-
<b>Sor</b>	D-Sorbitol	-	-	-	+	+	+
<b>Mdm</b>	Metyl-αD-Mannopyranoside	-	-	-	-	-	-
<b>Mdg</b>	Metyl-αD-Glukopyranoside	-	-	-	+	-	-
<b>Nag</b>	N-acetylglukosamin	+	+	-	-	-	-
<b>Amy</b>	Amygdaline	-	+	-	+	-	-
<b>Arb</b>	Arbutin	+	+	-	+	+	-
<b>Esc</b>	Eskulin	+	+	+	+	+	+
<b>Sal</b>	Salisin	+	+	-	+	+	-
<b>Cel</b>	D-celiobioz	+	+	-	+	-	-
<b>Mal</b>	D-maltoz	+	+	+	+	-	+
<b>Lac</b>	D-lactoza	-	-	-	-	-	-

“Tablo 11’in devamı”

Test adı	Substrat	Gg1	Gg3	Gg4	Gg6	Gg7	Gg15
Mel	D-Melibioz	-	+	-	-	-	-
Sac	D-Sakkaroz	-	+	-	+	-	-
Tre	D-Trehaloz	+	+	-	+	+	-
Inu	İnulin	-	-	-	-	-	-
Mlz	D-melezitoz	-	-	-	-	-	-
Raf	D-raffinoz	-	-	-	-	-	-
Amd	Amidon	+	-	+	+	-	-
Glyg	Glikojen	+	-	+	+	-	-
Xlt	Ksitol	-	-	-	-	-	-
Gen	Gentiobioz	-	-	-	-	-	-
Tur	D-Turanoz	-	-	-	+	-	-
Lyx	D-Lyxoz	-	-	-	+	-	-
Tag	D-Tagatoz	-	-	-	+	-	-
Dfuc	D-Fukoz	-	-	-	-	-	-
Lfuc	L-Fukoz	-	-	-	-	-	-
Darl	D-Arabitol	-	-	-	-	-	-
Larl	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-
Gnt	Potassium glukonate	-	+	-	+	-	-
2kg	Potassium 2-ketoglukonate	+	+	-	-	+	+
5kg	Potassium 5-ketoglukonate	-	-	-	-	-	-

### 3.3. İzolatların Bazı Genetiksel Özellikleri

#### 3.3.1. 16S rRNA Genlerinin Baz Dizileri

Bakteri sistematigi çalışmalarında 16S rRNA genlerinin baz dizilerinin ortaya çıkarılması önemli genetiksel özelliklerin başında gelir. Bu amaçla ilk olarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda birbirleriyle aynı tür olabilecek olan izolatlar dışındaki tüm bakteri izolatlarından elde edilen genomik DNA'dan PCR yardımı ile 16S rRNA geni (yaklaşık olarak 1500 bp) çoğaltıldı. Çoğaltılan 16S rRNA genleri pGEM-T easy vektörüne klonlandı ve doğru klonların agaroz jelde incelenerek teyit edilmesinden sonra baz dizisini belirleyen bir şirket (Macrogen, Korea) aracılığıyla baz dizileri otomatik dizi analizörleri ile belirlendi.

Elde edilen izolatların 16S rRNA gen dizileri, Gen Bankasında var olan diğer bakteriyal 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılarak bu gen dizilerine en fazla benzer olan diğer bakteriyal 16S rRNA genleri arasındaki benzerlik oranları belirlendi (Tablo 12). Morfolojik, boyama, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine bakıldığında birbirlerine çok benzeyen ama koloni büyüklükleri veya başka sebeplerden dolayı farklı bir alttür olabileceği tahmin edilen izolatlardan bazıları da yine 16S rRNA gen dizini karşılaştırmasına tabi tutuldular.

Tablo 12. Belirlenen 16S rRNA dizilerinin Gen bankasındaki genler ile karşılaştırılması

İzolatlar	Gen bankasının 16S rRNA dizin analizine göre önerdiği tür ve cinsler	Benzerlik Oranı (%)
Gg1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
	<i>serovar kurstaki</i>	
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
Gg2	<i>Bacillus cereus</i>	99
	<i>Serratia sp.</i>	99
	<i>Serratia odorifera</i>	97
Gg3	<i>Serratia marcescens</i>	97
	<i>Bacillus gibsonii</i>	99
	<i>Bacillus sp.</i>	99
Gg4	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
	<i>Bacillus plakortidis</i>	99
	<i>Bacillus murimartini</i>	98
	<i>Bacillus sp.</i>	99
Gg5	<i>Bacillus marinus</i>	99
	<i>Bacillus subtilis</i>	98
	<i>Bacillus antharicus</i>	98
	<i>Providencia retgeri</i>	99
Gg6	<i>Providencia vermicola</i>	99
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	98
	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
Gg7	<i>Bacillus sp.</i>	99
	<i>Bacillus cereus</i>	98
	<i>Bacillus gibsoni</i>	99
Gg8	<i>Bacillus clasui</i>	99
	<i>Enterobacter hormechii</i>	99
	<i>Enterobacter aeogenes</i>	99
	<i>Pantoea sp.</i>	98

“Tablo 12’nin devamı”

İzolatlar	Gen bankasının 16S rRNA dizin analizine göre önerdiği tür ve cinsler	Benzerlik Oranı (%)
Gg9	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	98
Gg10	<i>Enterobacter</i> sp.	100
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	100
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	100
Gg11	<i>Providencia rettgeri</i>	100
	<i>Providencia</i> sp.	100
	<i>Providencia stuartii</i>	99
Gg12	<i>Serratia ficaria</i>	99
	<i>Serratia nematodiphila</i>	99
	<i>Serratia rubidaea</i>	99
	<i>Serratia odorifera</i>	98
Gg13	<i>Providencia stuartii</i>	99
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	99
Gg14	<i>Enterobacter hormechei</i>	99
Gg15	<i>Bacillus arsenicus</i>	99
	<i>Bacillus barbaricus</i>	99
	<i>Bacillus</i> sp.	99

### 3.4 *Gryllotalpa gryllotalpa*’nın İnsektisidal Aktivitesinin Belirlenmesi

Gg1 ve Gg15 nolu izolatlar *Gryllotalpa gryllotalpa* nimfleri üzerinde %100 etki göstermiştir. Bu izolatlardan Gg1 *Bacillus thuringiensis* ve Gg15 nolu izolat ise *Bacillus arsenicus*’ tur. Diğer izolatlar ise Gg5, Gg9, Gg10, Gg11, Gg12 ve Gg14 %25, Gg2, Gg8 ve Gg13 %50, ve Gg3, Gg4, Gg6 ve Gg7 nolu izolatlar ise %75 etki göstermiştir. Bu oranlar Tablo 13’de gösterilmektedir.



Tablo 13. *G. gryllotalpa* elde edilen izolatların *G.gryllotalpa* üzerindeki insektisidal etkileri

İzolatlar	Ölüm Oranı (%)
Gg1	100
Gg2	50
Gg3	75
Gg4	75
Gg5	25
Gg6	75
Gg7	75
Gg8	50
Gg9	25
Gg10	25
Gg11	25
Gg12	25
Gg13	50
Gg14	25
Gg15	100
-kontrol <sup>b</sup>	0

<sup>b</sup>steril ddH<sub>2</sub>O

### 3.5. İzolatların *Malacosoma neustria* Üzerinde İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Gg1 ve Gg15 nolu izolatlar *Malacosoma neustria*'nın 3. instarları üzerinde %75 ve %70 etki göstererek en yüksek etki göstermişlerdir. Gg3, Gg4, Gg5 ve Gg6 nolu izolatları %55 etki göstermişlerdir. Gg13 nolu izolat %35, Gg7 ve Gg10 nolu izolatlar %45 etki göstermişlerdir. Gg2 nolu izolat %40, Gg8 ve G12 nolu izolatlar %30, Gg14 nolu izolat %25, Gg9 nolu izolat %20 ve Gg11 nolu izolat ise *Malacosoma neustria*'nın 3. instarları üzerinde %15 lik etki göstererek en düşük etki göstermişlerdir. Bu oranlar Tablo 14'de gösterilmektedir.

Tablo 14. *G.gryllotalpa*'dan izole edilen izolatların *M. neustria* üzerindeki insektisidal etkileri

<b>İzolatlar</b>	<b>Ölüm Oranı (%)</b>
Gg1	75 ±5
Gg2	40±20
Gg3	55±5
Gg4	55±5
Gg5	55±5
Gg6	55±5
Gg7	45±5
Gg8	30±10
Gg9	20±0
Gg10	45±5
Gg11	15±5
Gg12	30±0
Gg13	35±5
Gg14	25±5
Gg15	70±30
-kontrol <sup>b</sup>	0

<sup>b</sup>steril ddH<sub>2</sub>O

#### 4. TARTIŞMA

Ekonomisi tarıma dayalı olan Türkiye son yıllarda sanayi toplumu olma yolunda hızla ilerlemektedir. Bu amacına ulaşırken en büyük problem, toplumun ihtiyaç duyduğu tarımsal ürünleri karşılayamamaktadır. Geçmiş yıllarda tarım alanında kendi ihtiyaçlarını karşılayan ülkemiz, şu anda önemli bir tarım ithalatçısı olmuştur. Bunun temel sebeplerinden biri, sanayi toplumuna geçişte azalan tarım alanlarında, birim alana düşen tarım miktarını artıramamaktır. Birim alandaki ürün miktarını artırma şartlarının başında bitkilerin zararlı böceklerden korunması gelmektedir (Demirbağ ve Beldüz, 1997).

Tarım alanlarında büyük zarara neden olan böceklerden bir tanesi de Avrupa danaburnudur. Bu zararlı toprak altında geçen biyolojisi sayesinde birçok sebze ve meyvenin toprak altı organlarına çok büyük zararlar vermektedir (Aydemir, 2008).

Bu zararıya karşı bir biyolojik mücadele ajanının geliştirilmesi ve *Gryllotalpa gryllotalpa*'nın bakteriyal florasının belirlenmesinin amaçlandığı bu çalışma kapsamında bakteriyal floranın belirlenmesi için fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testler uygulanmıştır.

Yapılan literatür araştırması sonucunda daha önce *G. gryllotalpa*'nın biyolojik florası veya biyolojik kontrol ajanının geliştirilmesi ile ilgili herhangi bir çalışma tespit edilememiştir. Bu çalışma bugüne kadar *G. gryllotalpa*'nın bakteriyal florası üzerine yapılan ilk çalışmadır.

Tür tayinlerinde büyüme özellikleri ve morfolojik özelliklerine bakılarak elde edilen izolat sayısı tam olarak 15'tir. Bu 15 izolatın 12'si tür seviyesinde 3 tanesi ise cins seviyesinde belirlenmiştir.

Bu tanı çalışmalarında bakterilerin tür tayininde rutin olarak kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin dışında, son yıllarda bakterilerin tür tayinlerinin doğru bir şekilde yapılabilmesi için geliştirilmiş üç yeni metod olan 16S rRNA dizin analizi, API 20E ve API 50CH sistemleri kullanılmıştır. Bakterilerin tür tayinleri için Bergey's Manual of Systematic Bacteriology kaynak kitabı kullanılmış ve yapılan tanımlar API 20E ve API 50CH analiz sonuçlarıyla desteklenmiştir (Halda-Alija, 2004; Lian vd., 2004).

Bu sistemlerin rutin olarak gerçekleştirilen klasik testlere karşı bazı avantajları vardır. Bu avantajlardan en önemlileri izolatların aynı ortam şartları altında

değerlendirilmeleri ve bu tür test panellerinin içerdiği testlerin hepsinin klasik yöntemlerle yapılması için gereken masraf ve zamanın çok büyük ölçüde geri kazanılmış olmasıdır.

Bu sistemler sayesinde bakteriyal izolatların sahip olduğu metabolik aktiviteler ve biyokimyasal özellikleri hakkında çok geniş miktarda bilgi edinildi. Rutin çalışmalarla elde edilen veriler tür tayini için yetmediği durumlarda bu test sistemlerinden elde edilen veriler sayesinde tür tayini yapılabildi.

16S rRNA genleri oldukça iyi korunmuş özel sıralara sahiptir (Woese, 1990). Bu genler bakteriler arasındaki akrabalıkları belirlemede ve bakterilerin tür veya cins seviyesinde tanımlanmalarının yapılmasında son günlerde oldukça önemli bir araç haline gelmiştir (Sacchi vd., 2002).

16S rRNA alt ünitelerinin genlerine göre gerçekleştirilen moleküler tanımlama tekniklerinin gelişimi ile karmaşık yapıya sahip mikrobiyal birlikleri anlamak daha da kolay olmuştur. 16S rRNA genlerinin analizi bütün bakterileri tanımlamada kullanılabilecek bir yöntemdir. Bu yöntem klasik mikrobiyal metotların aksine çok önemli iki avantaj sağlar. Bu avantajlardan ilki oldukça hızlı bir metot olması ikincisi ise tanımlama doğruluğunun oldukça gelişmiş olmasıdır (Springer vd., 1996).

Yapılan çalışmalarda Gg1 nolu izolatu Gram (+), spor oluşturan, katalaz enzimi üreten, basil şeklinde bir bakteri olduğu için Bacillaceae ailesine dahil edildi. Glukoz üretebildiği ve arabinozu fermente edemediği için Bacillaceae ailesi içindeki diğer türlerden ayrılarak *Bacillus thuringiensis* olduğuna karar verildi. Yapılan rutin çalışmaların sonunda 16S rRNA dizin analizi ve API50 CH sistemlerinin analiz sonuçları da bu izolatın *Bacillus thuringiensis* olduğunu desteklemektedir.

*Bacillus thuringiensis* bilinen en yaygın böcek patojenidir ve biyolojik mücadelede büyük önem taşımaktadır (Lacey vd., 2001). Dünyadaki biyopestisit satışlarının %95'ini *B. thuringiensis* kökenli ürünler oluşturmaktadır (Gaugler, 1997). Şimdiye kadar yapılan birçok çalışmada bu bakteri böceklerden izole edilmiş ve izole edildikleri böcek üzerine olan insektisidal etkileri çalışılmıştır. Özellikle Lepidoptera ordusuna ait türlerin larvalarında yüksek insektisidal etkiye sahiptir. *B. thuringiensis* dışında *Bacillus* cinsi içinde yer alan *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. sphaericus*, *B. popilliae*, *B. circulans*, *B. polymyxa*, *B. lentimorbus*, *B. megaterium* ve *B. fribourgesis* gibi türlerde daha önce böceklerde birçok kez izole edilmiş ve izole edildikleri konak üzerinde insektisidal etkilere sahip oldukları belirlenmiştir. (Heimpel, 1962; Steinhaus ve Marsh, 1962; Kuzina vd., 2001; Reeves ve Nayduch, 2002; Demir vd., 2002; Osborn vd., 2002).

Gg2 nolu izolatin Gram (-), spor oluşturmeyan, hareketli, basil formda, bakteriler olduğu için *Serratia* cinsine dahil edildi. *Serratia* cinsi VP (+) olması ve glukozun fermantasyonu ile diğer *Enterobacter*'lerden ayrılır. Arabitol (+) olmasıyla *Serratia fonticola* dan, indol üretmediğinden *Serratia odarifera* dan ayrıldı. Tüm bu sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde bu izolatin tür seviyesinin belirlenmesinde 16S rRNA dizin analizi ve API 20E test sistemlerinin de yetersiz kaldığı bunların da sadece cins seviyesinde güvenilir sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu nedenle bu izolatin cins seviyesinde bırakılması yani *Serratia* sp. olduğuna karar verildi. *Serratia* cinsi içerisinde yer alan türler böceklerde oldukça yaygındır. Bu cinste yer alan *S. marcescens*, *S. entomophila*, *S. proteamaculans*, *S. liquefaciens*, *S. rubidea* ve *S. fonticola* daha önce yapılan bir çok çalışmada böceklerden izole edilmiştir (Lepesme, 1937; Steinhaus ve Marsh, 1962; McLaughlin ve Keller, 1964; Bell, 1969; Sikorowski, 1985; O'Callaghan ve Jackson, 1993; Klein ve Kaya, 1995; Sikorowski vd., 1995; O'Callaghan vd., 1996; Sezen ve Demirbağ, 1999; Jackson vd., 2001; Kuzina vd., 2001; Osborn vd., 2002; Jeyaprakash vd., 2003).

Gg3 nolu izolatin Gram (+), spor oluşturan ve katalaz ürettiği için Bacillaceae ailesine dahil edildi. Yapılan rutin çalışmalar sonucunda ksilozda büyüme olmadığından *Bacillus thuringiensis* olmadığı, koloni morfolojisinin ve renginin uymadığından *Bacillus licheniformis* olmadığı tespit edildi. Yapılan rutin çalışmalar 16S rRNA ve API 50CH test sonuçlarına göre *Bacillus gibsonii* olabileceğine karar verildi.

Gg4 nolu izolatin Gram (+), spor oluşturmeyan, katalaz (+) olduğundan Bacillaceae ailesine dahil edildi. 40°C'de büyüme olmadığından ve morfolojik özellikleri benzemediğinden *Bacillus subtilis* türünden, sıcaklık testlerinin uymamasından *Bacillus anthracis* türünden ayrıldı. Tür seviyesinde ise karar verilemediği için cins seviyesinde bırakılmasına yani *Bacillus* sp. olduğuna karar verildi

Gg5 nolu izolatin Gram (-), spor oluşturmeyan, fakültatif anaerobik olmasıyla Enterobacteriaceae ailesine dahil edildi. Mannitol üretebilmesiyle ve nutrient agar besiyerisinde kahverengi koloni oluşturmasıyla *Providencia* cinsine ait olduğuna karar verildi İnositol üretmemesiyle *Providencia rettgeri* olmadığı arabitol üretmemesiyle de *Providencia vermicola* olabileceğine karar verildi. Yapılan biyokimyasal ve 16S rRNA sonuçlarına da bu izolatin *Providencia vermicola* olabileceğini desteklemektedir.

Gg6 nolu izolatin Gram (+), spor oluşturan, katalaz enzimi üretmesiyle Bacillaceae ailesine dahil edildi. Ksiloz ve arabinozda büyüme olmadığından *Bacillus cereus*

olmadığına, sıcaklık testinde ve koloni morfolojisine göre *Bacillus licheniformis* olabileceğine karar verildi. Yapılan biyokimyasal testler ve 16S rRNA sonuçlarına da bu izolatın *Bacillus licheniformis* olabileceğini desteklemektedir.

Gg7 nolu izolatın Gram (+), spor oluşturan ve katalaz enzimi ürettiğinden Bacillaceae ailesine dahil edildi. Arabinoz üretememesiyle *Bacillus subtilis* ve *Bacillus lentus* türlerinden, mannitol üretmesiyle de *Bacillus marinus*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus brevis* türlerinden ayrılarak, *Bacillus clasuii* olabileceğine karar verildi.

Gg8 nolu izolatın Gram (-), spor oluşturmeyen, hareketli, oksidaz üretmeyen basil formda bakteriler olduğu için Enterobacteriaceae familyasına ait olduğu tespit edildi. Bu cinsin içerdiği üyeler arasında bir karşılaştırma yapıldığında ise; lisin dekarboksilaz üretebildikleri için *E. agglomerans* olmadığı, sorbitolu fermente edebildiği için *E. gergoviae* olmadığı, üreaz üretmediği içinde *E. aerogenes* olduğuna karar verildi. *Klebsiella pneumonia* ve *Enterobacter aerogenes* birbirleriyle çok sık karıştırılan iki türdür (Sneath, 1986). Bu iki türü sahip oldukları hareket özelliklerine bakarak ayırt edebilmek mümkündür. Bunun sonucunda da *Enterobacter aerogenes* olduğuna karar verildi.

Gg9 nolu izolatın kolonilerinin beyaz, Gram (-), spor oluşturmeyen, katalaz enzimi üreten, oksidaz ve inositol üretmediği belirlendi. API 20E ve 16S rRNA sonuçlarına göre *Paenibacillus xylanilyticus* olduğuna karar verildi.

Gg10 nolu izolatın Gram (-), spor oluşturmeyen, hareketli, oksidaz üretmeyen basil formda bakteriler olduğu için Enterobacteriaceae ailesine ait olduğu tespit edildi. Sorbitolu fermente edebildiği için *E. hormaechei* olmadığı, üreaz üretmediği içinde *E. aerogenes* olabileceği fakat arabinoz üretmediği için olmadığına karar verildi. Sonuçta bu izolatın tür seviyesinde ayrımı yapılamadı. Cins seviyesinde yani *Enterobacter* sp. olarak bırakıldı.

Gg11 nolu izolatın Gram (-), spor oluşturmeyen, oksidaz üretmeyen ve üre ürettiği tespit edildi. Bu testler sonucunda Enterobacteriaceae ailesinden Providencia cinsine ait olduğu belirlendi. Vp testinin (-) olmasıyla *Providencia stuartii* olmadığı, indol ve arabitol üretmesiyle *Providencia rettgeri* olduğuna karar verildi.

Gg12 nolu izolatın Gram (-), spor oluşturmeyen, basil formda, hareketli, güçlü bir katalaz aktivitesine sahip olduğu için *Serratia* cinsine ait olduğu tespit edildi. Bu cinsin içerdiği üyeler arasında bir karşılaştırma yapıldığında ise; arabitol üretememesiyle *Serratia ficaria* olmadığı, sorbitolu fermente edemediği için *Serratia rubidae* olmadığı, indol

üretmediği için *Serratia odorifera* olmadığına, *Serratia nematodophila* olduğuna karar verildi.

Gg13 nolu izolatin Gram (-), spor oluşturmayan, basil formda Enterobacteriaceae ailesine ait olduğu belirlendi. Arabitol üretmediği ve indol üretebildiğinden *Providencia stuartii* olmadığına, üreyi hidroliz ettiği için *Providencia alcalifaciens* olduğuna karar verildi.

Gg14 nolu izolat Gram (-), katalaz üreten, basil şeklinde olduğu tespit edildi. Glukoz üretmesi, hareketli olması ile Enterobacteriaceae ailesine ait belirlendi. Arabitolu fermente edebilmesi, jelatin ve inositolu üretememesiyle *Enterobacter hormecheii* olduğuna karar verildi.

Gg15 nolu izolatin Gram (+), spor oluşturmayan, basil şeklinde olduğu tespit edildi. Glukoz üretmesi, ksiloz ve mannitol üretememesiyle *Bacillus anthracis* olduğunu düşündürdü. Fakat pH 3’de büyümemesinden *Bacillus arsenicus* olabileceğine karar verildi.

*G. gryllotalpa* ülkemiz tarım alanlarında çok ciddi zararlara yol açmaktadır. Bu böceğin kontrolü için kimyasal ve mekanik mücadele uygulanmasına rağmen zararlıyla mücadelede kesin bir sonuç elde edilememiştir (Baykal ve Kovancı, 1995).

İzole edilen bu bakterilerden Gg1 ve Gg15 nolu izolatin *G. gryllotalpa* üzerinde %100 etkisi olmuştur. Bu bakterilerden Gg1 nolu izolat *Bacillus thuringiensis*‘tir. *Bacillus thuringiensis* bilinen en yaygın böcek patojenidir ve biyolojik mücadelede büyük önem taşımaktadır. Böylece *G. gryllotalpa* karşı biyolojik kontrol ajanı olabilecek bir bakteriyal izolat tespit edilmiştir.

Böceklerin bakteriyal mikrofloraları bağırsaklarında bulunmaktadır. Bu flora zengin ve çeşitli olup, genellikle Gram (-) ve Gram (+) bakterilerden oluşmaktadır (Boucias ve Pendland, 1998). Zararlı böceklerin patojenleri çalışılırken bakteriler arasındaki zorunlu simbiyotik ilişkilerde büyük önem taşımaktadır (Baerwald ve Boush, 1968; Helmuth, 1956; Rubio ve McFadden, 1966; Klein ve Kaya, 1995; Hagen, 1996; Jeyaprakash vd., 2003). Bazı bakteriler ise böcekler için patojeniktir. Patojenite daha çok böceğin bağırsağında meydana gelmektedir. Patojenik bakteri konakta bulunduğu süre içinde çoğalır ve hastalık oluşturur. Simbiyotik bakteriler zararlının bağırsağında patojeniteyi oluşturacak olan proteinleri üretmesi sağlanabilir.

Simbiyotik bakterilerin bu kadar önemli olmalarından dolayı bütün bakteriyal floranın tespit edilmesi oldukça önemlidir.

Bu nedenle bu zararlıya karşı bir mikrobiyal ajan geliştirmek maksadıyla yapılan bu çalışma sayesinde zararlı böceklere karşı kullanılabilir inektisidal aktivitesi yüksek, güvenilir ve ÷lkemize ait biyolojik kontrol ajanlarının oluşturulması yolunda adım atılmış olacaktır.



## 5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda ülkemiz meyve ve sebze tarlalarında ciddi zararlara yol açan *Gryllotalpa gryllotalpa*'nın bakteriyal florası ve biyolojik kontrolü hakkında önemli bilgiler elde edildi.

- 1) Ölü ve sağlıklı nimflerden 15 farklı bakteri izole edildi. İzole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve bazı moleküler özellikleri tespit edildi.
- 2) Yapılan testler sonucu, izole edilen 15 bakteriden, 12'si tür seviyesinde, 3'ü ise cins seviyesinde tanımlandı. Tanımlanan bakterilerin *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Serratia* sp., *Bacillus gibsoni*, *Bacillus* sp., *Providencia vermicola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*, *Enterobacter aerogenes*, *Paenibacillus xylanilyticus*, *Enterobacter* sp., *Providencia rettgeri*, *Serratia nematodophila*, *Providencia alfalifacien*, *Enterobacter hormehechi* ve *Bacillus arsenicus* oldukları belirlendi.
- 3) İzole edilen bu bakterilerin *G. gryllotalpa* nimfleri üzerine olan insektisidal etkilerinin belirlenmesi için farklı zamanlarda bioassaylar gerçekleştirildi. Bu sonuçlara göre en yüksek etkiler Gg1 ve Gg15 nolu izolatta %100 ve Gg3, Gg4, Gg6 ve Gg7 nolu izolatlarda %75 etki gösterdi.
- 4) Ayrıca izole edilen bu bakterilerin Lepidoptera takımına ait olan önemli bir zararlı olan *Malacosoma neustria* türü üzerinde de insektisidal etkileri araştırıldı. Bu zararlı üzerinde en yüksek insektisidal etki Gg1 nolu izolatta %75, Gg15 nolu izolatta ise %70 olarak belirlendi.

## 6. ÖNERİLER

Bu çalışmada *Gryllotalpa gryllotalpa*'dan 15 farklı bakteri izole edilmiş ve *G. gryllotalpa* üzerinde insektisidal etkileri araştırılmıştır. Ayrıca Lepidoptera grubundan olan *Malacosoma neustria* üzerinde de insektisidal etkileri araştırılmıştır.

- 1) Elde edilen izolatların başka tarım zararlıları üzerinde de insektisidal etkilerinin araştırılması gerekmektedir.
- 2) Cins seviyesinde belirlenen izolatlara DNA-DNA hibridizasyon yöntemi uygulanarak tür seviyesinde belirlemek mümkün olabilir.
- 3) İzolatların hücresel yağ asidi analizleri yapılarak tanısı daha da güçlendirilebilir.
- 4) En yüksek insektisidal aktivite gösteren Gg1 ve Gg15 izolatlarının birer mikrobiyal mücadele ajanı olarak geliştirilebilmesi için gerekli patojenite testlerinin yapılması, preparatın hazırlanması laboratuvar ve arazi şartlarında denenmesi gerekmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Abbott, W. S., 1925. A Method of Computing of Effectiveness of on Insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265–267.
- Ananda, K. P., Sharma, R. P. ve Malik, V. S., 1996. The Insecticidal Proteins of *Bacillus thuringiensis*, Adv. Appl. Microbiol., 42, 1-43.
- Arif, B. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, Kurstak, E. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., 179, New York, USA.
- Aydemir, M., 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Cilt 2, 3, Ankara.
- Baerwald, R. J. ve Boush, G. M., 1968. Demonstration of the Bacterial Symbiote *Pseudomonas melophthora* in the Apple Maggot, *Rhagoletis pomonella* , by Fluorescent-Antibody Techniques, J. Invertebr. Pathol., 11, 251-259.
- Baumgartner, W. J., 1905. Observations on Some Peculiar Habits of The Mole Crickets. Science, 21: 855.
- Baumgartner, W.J., 1910. Observations on The Gryllidae: III. Notes on The Classification and on Some Habits of Certain Crickets. Kansas University Science Bulletin, 5: 309-319.
- Baykal, N., 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Cilt 3, Ankara, 266-267.
- Baykal, N. ve Kovancı, B., 1995. Bitki Koruma, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Yayın No: 902, 331-333.
- Bell, J. V., 1969. *Serratia marcescens* Found in Eggs of *Heliothis zea*: Tests Against *Trichoplusia ni*., J. Invertebr. Pathol., 13, 151-152.
- Ben-Dov, E., Boussiba, S. ve Zaritsky, A., 1995. Mosquito Larvicidal Activity of *Escherichia coli* with Combinations of Genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, J. Bacteriol., 2581-2587.
- Bennet-Clark, II.C., 1970. The Mechanism and Efficiency of Sound Production in Mole Crickets. J. Exp. Biol., 52: 619-652.
- Bennet-Clark, II.C., 1987. The Tuned Singing Burrow of Mole Crickets. Journal of Experimental Biology, 128: 117-123.
- Benson, H. J., 1985. Microbiological Applications, a Laboratory Manuel in General Microbiology, Brock, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.

- Bernard, R. G. ve Jack J. P., 2003. Molecular Biotechnology - Principles and Applications of Recombinant DNA, Baskı: 3, Amer Society for Microbiology, New York
- Black, R. ve Sweetmore, A., 1994. Appropriate Bacterial Identification Systems for Small Plant Pathology Laboratories Overseas Incorporating the Biolog Method, Plant Pathol., 43, 438-441.
- Boucias, D.G. ve Pendland, J.C., 1998. Principles of Insect Pathology. Kluvar Academic Publisher, London.
- Braxton, S. M., Onstad, D. W., Dockter, D. E., Giordano, R., Larsson, R. ve Humber, R. A., 2003. Description and Analysis of two Internet-Based Databases of Insect Pathogens: EWDIP and VIDIL, J. Invertebr. Pathol., 83, 185-195.
- Brooks, W. M., 1988. Entomogenous Protozoa, In "Handbook of Natural Pesticides", Vol. V: "Microbial Insecticides, Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi" (Ignoffo, C. M. ve Mandava, E. D., Eds.), 1-149, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bucher, G. E. ve Stephens, J. M., 1957. A Disease of Grasshoppers Caused by the Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, Can. J. Microbiol., 7, 641-655.
- Burges, H. D. (Ed.), 1981. Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980, Academic Press, London.
- Bülbüloğlu, Ö., Çeşitli Toprak Örneklerinden İzole Edilen *Bacillus thuringiensis*'lerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 1-11 (2000).
- Cappuccino, J. G. ve Sherman, N., 1992. Microbiology a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Fewitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. ve Dean, D. H., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 807-813.
- Çanakçıoğlu, H. 1989. Orman Entomolojisi (Genel Bölüm), İst. Üniv. Orman Fakültesi Yayın No: 382, İstanbul.
- David, A. ve Castner, L., 1984. Introduced Species of Mole Crickets in The United States Puerto Rico, and The Virgin Islands (Orthoptera: Gryllotalpidae), Ann. Entomol. Soc., 77:450-465.
- Daws. A., Bennet-Clark, H. C., Fletcher, N.K., 1996. The Mechanism of Tuning of The Mole Cricket Singind Burrow. Bioacoustics 7: 81-117 s.
- Debach, P. 1974. Biological Control by Natural Enemies. Cambridge University Prass. Cambridge, UK.

- Demir, İ., Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2002. The First Study on Bacterial Flora and Biological Control Agent of *Anoplus roboris* (Coleoptera: Curculionidae), J. Microbiol., 40, 104-108.
- Demirbağ, Z. ve Beldüz, A. O., 1997. Baculovirüs'ün Biyolojik Mücadeledeki Önemi, Kükem Dergisi, 20, 1, 49-58.
- Demirbağ, Z., Nalçacıoğlu, R., Katı, H., Demir, İ., Sezen, K., Ertürk, Ö., 2008. Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele, Ofset Basım., Trabzon.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, No:27, Samsun.
- Evans, H. F., 1986. Ecology ve Epizootiology of Baculoviruses, In "The Biology of Baculoviruses, Vol 2, Practical Application for Insect Control" (Granados, R. R. ve Federici, B. A., Eds.), 89-132, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ferre, J., Real, M. D., Van Rie, J. Jansens, S. ve Peferoen, M., 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 5119-5123.
- Gamo, M. ve Shoji, T., 1999. A Method of Profiling Microbial Communities Based on a Most-Probable-Number Assay that Uses Biolog Plates and Multiple Sole Carbon Sources, Appl. Environ. Microbiol., 65, 4419-4424.
- Gaugler, R., 1997. Alternative Paradigms for Commercializing Biopesticides, Phytoparasitica, 25, 179-182.
- Gelernter, W., ve Schwab, G. E., 1993. *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. (Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., ve Higgs, S., (ed.), John Wiley & Sons.), 89-104, Chichester, United Kingdom.
- Georgis, R., 1997. Commercial Prospects of Microbial Insecticides in Agriculture, In "Microbial Insecticides: Novelty or Necessity?" (Evans, H. F., Chair), Proc. Br. Crop. Prot. Council Symp., 68, 243-252.
- Goodfellow, M ve O'Donnell, A. G., 1993. Root of Bacterial Systematics. Handbook of New Bacterial Systematics, Goodfellow, M., O'Donnell, A. G., Eds., Academic Pres Ltd., London.
- Granados, R. R. ve Federici, B. A., 1986. The Biology of Baculoviruses, Vol. 2, Practical Applications for Insect Control, Boca Raton, FL.
- Gray, M. W., Sankoff, D., Cedergren, R. J., 1984. On the Evolutionary Descent of Organisms and Organelles: A global Phlogeny Based on a Highly Conserved Structural Core in Small Subunit Ribosomal RNA, Nuc. Acids Res., 12, 5837-5852.

- Gröner, A., 1986. Specificity and Safety of Baculoviruses, In “The Biology of Baculoviruses, Vol. 2, Practical Applications for Insect Control” (Granados, R. R. ve Federici, B. A., Eds.), 177-202. Boca Raton, FL.
- Hagen, K. S., 1996. Dependence of the Olive Fruit Fly, *Dacus oleae*, larvae on symbiosis with *Pseudomonas savastanoi* for the utilization of olive. *Nature*, 209, 423–425.
- Hajek, A. E. ve Leper, R. J., 1994. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts, *Ann. Rev. Entomol.*, 39, 293-322.
- Hajek, A. E., 1997. Ecology of Terrestrial Fungal Entomopathogens, In “Advanced in Microbial Ecology” (Jones, J. H., Ed.), 15, 193-249, Plenum Press, New York.
- Halda-Alija, L., 2004. Incidence of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* and Enterobacter species in freshwater wetlands, *Letters in Applied Microbiology*, 39, 445-450.
- Heimpel, A. M., 1962. General Aspects of Bacteriological Control, Coll. *Int. Pathol. Insects*, Paris.
- Helmuth, H., 1956. Untersuchungen zur Bakteriensymbiose der Trypetiden (Diptera), *Z Morphol Oekol Tiere.*, 44, 483–517.
- Hoffart, C., Jones, K. ve Hill, P. S. M., 2002. Comparative morphology of The Stridulatory Apparatus of The Gryllotalpidae (Orthoptera) of The Continental United States, *Journal of The Kansas Entomological Society*, 75: 123-131.
- Hoffman, M. P. ve Frodsham, A. C., 1993. Naturel Enemies of Vegetable Insect Pests, Cooperative Extension, 63, Cornell University, Ithaca.
- Houston, T., 2006. Mole Cricket, Western Australian Museum. Russian
- Jackson, T. A., Boucias, D. G. ve Thaler, J. O., 2001. Pathobiology of Amber Disease, Caused by *Serratia* spp., in the New Zeland Grass Grub, *Costelytra zealandica*, *J. Invertebr. Pathol.*, 78, 232-243.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A. ve Allsopp, M. H., 2003. Bacterial Diversity in Worker Adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) Assessed Using 16S rRNA Sequences, *J. Invert. Pathol.*, 84, 96-103.
- Kaya, H. K. ve Stock, S. P., 1997. Techniques in Insect Nematology, In “Manuel of Techniques in Insect Pathology” (Lacey, L. A., Ed.), 281-324, Academic Press, London.
- Kaya, H. K., 1976. Insect Pathogens in Natural and Microbial Control of Forest Defoliators, In “Perspectives in Forest Entomology” (Anderson, J. F. ve Kaya, H. K., Eds.), 251-263, Academic Press, New York.

- Kobakhidze, D. N., 1960. Common Mole Cricket in The USSR, AS Georgian SSR, 60.
- Kovancı, B., 1995. Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim, Bitki Koruma Yayın No: 902 321-323.
- Kryzhanovskii, O. L. ve Dansting, E. M., 1972. Insect and Mites Pest of Agricultural Plants, V. 1 Primitive Insect.
- Kuzina, L. V., Miller, E. D., Ge, B. ve Miller, T. A., 2002. Transformation of *Enterobacter gergoviae* Isolated from Pink Bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) Gut with *Bacillus thuringiensis* Toxin, Curr. Microbiol., 44, 1-4.
- Kuzina, L. V., Peloquin, J. J., Vacek, D. C. ve Miller, T. A., 2001. Isolation and Identification of Bacteria Associated with Adult Laboratory Mexican Fruit Flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), Curr. Microbiol., 42, 290-294.
- Lacey L. A., 1997. Bacteria: Laboratory Bioassays of Bacteria Against Aquatic Insects with Emphasis on Larvae of Mosquitoes and Black Flies, In “Manual of Techniques in Insect Pathology (Lacey, L. A., Ed.), 79–88, Academic Press, New York.
- Lacey, L. A. ve Brooks, W. M., 1997. Initial Handling and Diagnosis of Diseased Insects, In “Manual of Techniques in Insect Pathology” (Lacey, L. A., Ed.), 1-15, Academic Press, New York.
- Lacey, L. A. ve Kaya, H. K. (Eds.), 2000. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evolution of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Lacey, L. A., Fransen, J. J. ve Carruthers, R., 1996. Global Distribution of Naturally Occurring Fungi of Bemisia, Their Biologies and Use as Biological Control Agents, In “ Bemisia, 1995: Taxonomy, Biology, Damage and Management” (Gerling, D. ve Mayer, R., Eds.). Intercept, Andover.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K. ve Vail, P., 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?, Biol. Control., 21, 230-248.
- Lampel, J. S., Canter, G. L., Dimock, M. B., Kelly, J. L., Anderson, J. J., Uratani, B. B., Foulke, J. S., ve Turner, J. T., 1994. Integrative cloning, expression, and stability of the cryIA(c) gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *Cynodontis*, Appl. Environ. Microbiol., 60, 501-508.
- Lepesme, P., 1937. Sur la Presence du *Bacillus prodigiosus* chez le Criquet Pelerin (*Schistocerca gregaria* Forsk), Bul. Soc. Hist. Aft. N., 28, 406-411.
- Lian, C., Zhao, J., Zhang, Z., ve Liu, W., 2004. Genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis, Mycoses., 47, 495-502.

- Lipa, J. J., 1975. An Outline of Insect Pathology , Warsaw, Poland.
- Maddox, J. V., 1987. Protozoan Diseases, In “Epizootiology of Insect Diseases” (Fuxa, J. R. ve Tanada, Y., Eds.), 417-452, Wiley, New York.
- Manceau, C. ve Horvais, A., 1997. Assessment of Genetic Diversity Among Strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of rRNA Operons with Special Emphasis on *P. syringae* pv. tomato, Appl. Environ Microbiol., 63, 498-505.
- McLaughlin, R. E. ve Keller, J. C., 1964. Antibiotic Control of an Epizootic Caused by *Serratia marcescens* Bizio in the Boll Weevil, *Anthonomus grandis* Boheman, J. Insect Pathol., 6, 481-185.
- Morse, A.P. 1920. Manual of The Orthoptera of New England, Including The Locusts, Grasshopper, Crickets, and Their Allies. Proc. Boston Soc. Nat.Hist., 35: 197-556
- Nickle, D.A. ve Carlisle T.C., 1975. Morphology and Function of Female Sound Producing Structures in Ensiferan Orthoptera with Special Emphasis on the Phaneropterinae, J. Invertebr. Pathol., 4: 159-168
- O’Callaghan, M. ve Jackson, T. A., 1993. Isolation and Enumeration of *Serratia entomophila*, a Bacterial Pathogen of the New Zealand Grass Grub, *Costelytra zealandica*, J. Appl. Bacteriol., 75, 307-314.
- O’Callaghan, M., Garnham, M. L., Nelson, T. L., Baird, D. ve Jackson, T. A., 1996. The Pathogenicity of *Serratia* Strains to *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), J. Invertebr. Pathol., 68, 22-27.
- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Süleyman Demirel Üniversitesi, Yayın No: 8, Isparta.
- Osborn, F., Berlioz, L., Vitelli-Flores, J., Monsalve, W., Dorta, B. ve Lemoine, V. R., 2002. Pathogenic Effects of Bacteria Isolated from Larvae of *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae), J. Invertebr. Pathol., 80, 7-12.
- Otte, D. ve Alexander, R.D., 1983. The Australian Cricket (Orthoptera: Gryllidae) Monograph 22 of The Academy of Natural Sciences of Philadelphia.
- Palleroni, N.J., 1986. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 1, Krieg, N. R. ve Holt, J. G., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Peter, G., 1984. Plant Pests and Their Control, Fenemore, London, 45-57.
- Petrunkewitsch, A. ve Von Guatia G.,1901. Ueber den Geschlechtlichen Dimorphismus bei den Tonopparaten de Orthopteren, Zoologische Jahrbuch,14: 291-230.



- Poinar, G. O., 1979. Nematodes for Biological Control of Insects, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Reeves, W. K. ve Nayduch, D., 2002. Pathogenic *Bacillus* from a Larva of the *Simulium tuberosum* Species Complex (Diptera: Simuliidae), J. Invertebr. Pathol., 79, 126
- Rubio, R. E. P. ve McFadden, M., 1966. Isolation and identification of bacteria in the digestive tract of the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens*. Ann. Entomol. Soc. Am., 59, 1015–1016.
- Sacchi, C. T., Whitney, A.M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R.S. ve Popovic, T., 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*, Emerg. Infect. Dis., 8, 1117–1123.
- Sambrook, J. Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989 Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory Press New York.
- Schleifer, K. H. ve Stackebrandt, E., 1983. Molecular Systematics of Prokaryotes, Ann. Rev. Microbiol., 37, 143-187.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J., Van Rie, D., Lereclus, J., Baum, J., Feitelson, D. R., Zeiger, ve Dean, D. H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 775-806.
- Serez, M., 2003. Böcekler Bildiğiniz gibi Değil.<http://www.evrensel.net/03/01/28/toplum.htm#2>, 28 Ocak 2003.
- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 1999. Isolation and Insecticidal Activity of Some Bacteria from the Hazelnut Beetle (*Balaninus nucum* L.), Appl. Entomol. Zool., 34, 85-89.
- Sikorowski, P. P., 1985. Pecan Weevil Pathology, In “Pecan Weevil: Research Perspective” (Neel, W. W., Ed.), 87-101, Quail Ridge Press, Brandon, MS.
- Sikorowski, P. P., Nebeker, T. E., Lawrence, A. M. ve Price, T. S., 1995. Virus and Virus-Like Particle Found in Southern Pine Beetle Adults in Mississippi and Georgia, Eastern Forests USDA Miscellaneous, 675, Entomol. Soc., 15, 235-241.
- Sneath, A. P., 1986. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 2, Sneath, A. P., Mair, N. S., Sharge, M. S. ve Holt, J. G., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Springer, B., Stockman, L., Teschner, K., Roberts, G. D. ve Bottger, E. C., 1996. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods, J. Clin. Microbiol., 34, 296–303.
- Stackebrandt, E. ve Goebel, B. M., 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology, Int. J. Sys. Bacteriol., 44, 846-849.

- Stackebrandt, E. ve Goodfellow, M., 1991. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, Chicster, John Wiley and Sons.
- Steinhaus, E. A. ve Marsh, G. A., 1962. Report of Diagnosis of Diseased Insects, 1951-1961, *Hilgardia*, 33, 349.
- Steinhaus, E. A., 1949. Principles of Insect Pathology, McGraw-Hill, New York.
- Steinhaus, E. A., 1956. Microbial Control: The Emergence of an Idea, *J. Agric. Sci.*, 26, 107-160.
- Şahin, F., 2003. Moleküler Tanı Yöntemleri, 2003. Biyoinformatik-I Lisansüstü Yaz Kursu Kitabı, 6. Bölüm (Telefoncu, A., Küfrevioğlu, İ. ve Pazarlıoğlu, N., Eds.), Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Tanada, Y. ve Kaya, H. K., 1993. Insect Pathology, Academic Press, New York.
- Tindale, N.B., 1928. Australian Mole Crickets of The Family: Gryllotalpidae (Orthoptera) South Avustralian Museum Records, 4: 1-42.
- Townsend, B.C., 1983. A Revision of The Afrotropical Mole-Crickets (Orthoptera:Gryllotalpidae), *Nat. Entomol.*, 46: 175-203.
- Ulagaraj, S.M., 1976. Sound Production in Mole Crickets (Orthoptera:Gryllotalpidae Scapteriscus), *Entomol. Soc.*, 69: 299-306.
- Undeen, A. H. ve Vavra, J., 1997. Research Methods for Entomopathogenic Protozoa, In "Manual of Techniques in Insect Pathology" (Lacey, L. A., Ed.), 117-149, Academic Press, New York.
- URL-1 [commons.wikimedia.org/wiki/File:Gryllotalpa\\_g...](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gryllotalpa_g...) Dana burnu (Gryllotalpa gryllotalpa: Orthoptera). 14 Aralık 2008
- URL-2 [www.ziraat.selcuk.edu.tr/ctuncer/mmeyve/gryll](http://www.ziraat.selcuk.edu.tr/ctuncer/mmeyve/gryll) Dana burnu (Gryllotalpa gryllotalpa: Orthoptera). 14 Aralık 2008
- URL-3 <http://www.ordutarim.gov.tr/subeleler/koruma/hastalikvezararlılar> Dana burnu (Gryllotalpa gryllotalpa: Orthoptera). 14 Aralık 2008
- Ünal, G., 1998. Zirai Mücadele İlaçları Toksikolojisi ve Çevre, Ankara Ziri Mücadele Enstitüsü Seminer Notları, Ankara.
- Walker, T.J., 1997. Gryllotalpinae: Mole Crickets, Chapter 30. Walker, T.J., Moore, T.E.(Eds) Handbook of Crickets And Katydid.
- Walker, T.J. ve Figg, D. E., 1990. Song and Acoustic Burrow of The Prairie Mole Cricket, *Gryllotalpa major* (Orthoptera:Gryllidae) J.K., *Entomol. Soc.*, 63: 237-242.

- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Coiwell, R. R., Grimon, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebract, E., Starr, M. P. ve Trüper, H. G., 1987. Report of The ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics, Int. J. Syst. Bacteriol., 37, 463-464.
- Weiser, J., 1969. An Atlas of Insect Diseases, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.
- Weiss, B., 1915. Gryllotalpa Gryllotalpa, The European Mole Cricket in New Jersey, J. Econ. Entomology., Vol VIII, No: 5, 500.
- Weiss, B. ve L, Dickerson, 1918. European Mole Cricket, *Gryllotalpa gryllotalpa* L., An Introduced Insect Pest, Jour. N.Y Entomol. Soc., 3, 512-524
- Weiss, H. B., 1916. Foreign Pest Recently Established in New Jersey, J. Econ. Entomology, 9: 212-216.
- Wilson, M. J. ve Gaugler, R., 2000. Terrestrial Mollusca Pests, In “Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests” (Lacey, L. A. ve Kaya, H. K., Eds.), 787-804, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Wilson, M. J., Glen, D. M. ve George, S. K., 1993. The Rhabditid Nematode *Pharmarhabditis hermaphrodita* as a Biological Control Agent for Slugs, Biocontr. Sci. Technol., 3, 503-511.
- Woese, C., 1990. Prokaryote Systematics: The Evolution of a Science (second ed.), Prokaryotes, 3–18.
- Yılmaz, H., Dendroctonus micans’ın Bakteriyal Florası ve Mikrobiyal Mücadele Ajanlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2004.
- Zhantiev, R.D. ve Korsunovskaya, O.S., 1973. Sound Communication and Somecharacteristic of The Auditory System in Mole Crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae), Zool. Zhurn., 52: 1789-1801.
- Zhantiev, R.D., 1991. Mole Cricket (Orthoptera, Gryllotalpidae) of The European Part of The USSR And The Caucasus, Zool. Zhurn., 69-76.

## 8. EKLER

### Ek 1., Mc FARLAND Standart Solusyonları

Mc Farland Standardları bakterilerin özelliklerini tespit etmek amacıyla panel test sistemlerine yapılacak olan ekimlerde bir birim olarak kullanılır. Mililitredeki koloni oluşturabilecek bakteri sayısını verir. (CFU: Koloni oluşturabilen birim)

**0,5 Mc Farland** Standardı içeriği yaklaşık olarak  $1 \times 10^7$  ile  $1 \times 10^8$  CFU/ml'dir.

Barium Chloride, 0,048M solution 0,5 ml  
Sulfuric Acid, 0,18M solution 99,5 ml  
O.D at 625nm 0,08-0,1

**1,0 Mc Farland** Standardı içeriği

Barium Chloride, 0,048M solution 1,0 ml  
Sulfuric Acid, 0,18M solution 99,0 ml  
O.D. at 625nm 0,16-0,2

**2,0 Mc Farland** Standardı içeriği

Barium Chloride, 0,048M solution 2,0 ml  
Sulfuric Acid, 0,18M solution 98,0 ml  
O.D. at 625 nm 0,32-0,4

**3,0 Mc Farland** Standardı içeriği

Barium Chloride, 0,048M solution 3,0 ml  
Sulfuric Acid, 0,18M solution 97,0 ml  
O.D. at 625 nm 0,48-0,6

**4,0 Mc Farland** Standardı içeriği

Barium Chloride, 0,048M solution 4,0 ml  
Sulfuric Acid, 0,18M solution 96,0 ml  
O.D. at 625 nm 0,64-0,8

**5,0 Mc Farland** Standardı içeriği

Barium Chloride, 0,048M solution 5,0 ml  
Sulfuric Acid, 0,18M solution 95,0 ml  
O.D. at 625 nm 0,8-1,0

## Ek 2. Besiyeri, Ayıraç ve Boyaların Hazırlanışı

### Ek 2. 1. Besiyerlerinin Hazırlanışı

<u>Nitrat Broth</u>	: 5 g pepton, 3 g beef extract, 1 g potasyum nitrat 1000 ml ddH <sub>2</sub> O'da çözüldü; pH'ı 0.7'ye ayarlanarak otoklavda steril edildi.
<u>Nütrient Agar (NA):</u>	5 g pepton, 3 g beef extract, 15 g agar 1000 ml ddH <sub>2</sub> O'da çözüldü; otoklavlanarak steril edildi. Çalışmada ayrıca ticari olarak satılan nütrient agar da kullanıldı.
<u>Nütrient Broth (NB):</u>	5 g pepton, 3 g beef extract, 1 g potasyum nitrat 1000 ml ddH <sub>2</sub> O'da çözüldü; pH'ı 7,0'a ayarlanarak otoklavda steril edildi.
<u>Nütrient Jelatin:</u>	Ticari olarak satılan nütrient jelatinden 120 g 1000 ml ddH <sub>2</sub> O'da çözüldü, pH'ı 7,0'a ayarlanarak kullanıldı. Bunun yanısıra, % 0,4 oranında gelatin ihtiva eden nütrient agar da kullanılabilir.
<u>Sabouraud Dextroz Agar:</u>	10 g pepton, 40 g dextroz, 15 g agar 1000 ml ddH <sub>2</sub> O'da çözüldü; pH'ı 5,6'a ayarlanarak otoklavda steril edildi.
<u>Sabouraud Dextroz Broth:</u>	10 g pepton, 20 g dextroz, 15 g agar 1000 ml ddH <sub>2</sub> O'da çözüldü; pH'ı 5,6'a ayarlanarak otoklavda steril edildi.
<u>Simmon's Sitrat Besiyeri:</u>	23 g hazır besiyeri 1000 ml ddH <sub>2</sub> O'da çözüldü; otoklavlanarak steril edildi.
<u>Tryptic Soy Agar (TSA):</u>	40 g hazır besiyer 1000 ml ddH <sub>2</sub> O'da çözüldü; otoklavlanarak steril edildi.
<u>Tryptofan Broth:</u>	15 g hazır triptofan broth 1000 ml ddH <sub>2</sub> O'da çözüldü; otoklavlanarak steril edildi.
<u>Üre Hidroliz Besiyeri:</u>	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 kırmızısı karışımına 117 ml ddH <sub>2</sub> O ilave edildi; pH'ı 6,8'e ayarlandıktan sonra 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip steril filtrelerden geçirilmek suretiyle steril edildi.

### Ek 2.2. Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı

<u>Aseton Alkol:</u>	250 ml % 95'lik etanol ve 250 ml saf aseton karıştırılarak hazırlandı.
<u>Bakır Sülfat (CuSO<sub>4</sub>) Solüsyonu:</u>	20 g bakır sülfat (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O) 80 ml suda çözülerek hazırlandı.
<u>Dimetil-α-Naftilamin:</u>	5 g α-naftilamin 1000 ml ve 5 N'lik asetik asitte çözülerek hazırlandı.
<u>Gram Iyodu:</u>	1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür (KI) 5 ml ddH <sub>2</sub> O'da çözüldü; üzerine 250 ml ddH <sub>2</sub> O ve 60 ml % 5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ) ilave edildi.
<u>Katalaz Ayıracı:</u>	Ayıraç olarak % 10'luk hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) çözeltisi kullanıldı.

- Kovak Kimyasalı: 5 g p-dimetilaminobenzaldehid 75 ml amilalkolde çözüldü ve 25 ml HCl ilave edildi.
- Kristal Viyole Boyası: Bu boya iki ayrı solüsyon olarak hazırlanıp ardından ikisi birbirine karıştırıldı: 1) 1 g kristal viyole, 10 ml etanol, 90 ml distile su ile karıştırıldı. 2) 4 g amonyum oksala 72 0 ml ddH<sub>2</sub>O karıştırıldı. Bu iki solüsyon daha s 72 rbirine karıştırılarak kullanıldı.
- Malaşit Yeşili: 5 g malaşit yeşili 100 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek kullanıldı.
- Oksidaz Ayıracı: 6% tetrametilfenilendiamin hidroklorit, dimetil sulfoksit çözeltisinde hazırlanır.
- Safranin: 2,5 g safranin O, 100 ml %d95'lik etanol ve 500 ml ddH<sub>2</sub>O karıştırılarak hazırlandı.
- Sülfanilik Asit: 8 g sülfanilik asit 1000 ml ve 5 N'lik asetik asit (1 kısım asetik asit: 2,5 kısım distil su) içinde çözümlenerek hazırlandı.
- Vogus-Proskauer-I Ayıracı: 5 g  $\alpha$ -naftol 100 ml'den az absolute alkolde çözüldü ve 100 ml'ye tamamlanıp 5 °C'de muhafaza edildi.
- Vogus-Proskauer-II Ayıracı: 40 g KOH hızlı bir şekilde 100 ml'den az ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü; soğutuldu ve ddH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı; hazırlandıktan 7-8 saat sonra kullanıldı.

## ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Tokat'ın Zile ilçesinde doğdu. İlkokulu İstiklal Özen İlkokulu'nda, Ortaokulu Fevzi Çakmak Ortaokulu'nda ve liseyi Zile Lisesi'nde tamamladı. 2002–2006 Eğitim–Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Giresun Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2006 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.