

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FINDIK VE TAHIL AMBARLARINDAN *BACILLUS* İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE İZOLATLARIN İNSEKTİSİDAL ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Meriç DEMELİ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 24.07.2012
Tezin Savunma Tarihi : 27.08.2012**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Kazım SEZEN

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
Meriç DEMELİ tarafından hazırlanan

**FINDIK VE TAHIL AMBARLARINDAN *BACILLUS* İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE İZOLATLARIN İNSEKTİSİDAL ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 31/07/2012 gün ve 1468 sayılı kararıyla
oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Üye : Doç. Dr. Kazım SEZEN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

"Fındık ve Tahıl Ambarlarından *Bacillus* İzolasyonu, Karakterizasyonu ve İzolatların İnsektisidal Özelliklerinin Araştırılması" isimli 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, tezin değerlendirilmesi ve geliştirilmesinde yardımcı olan değerli jüri üyeleri hocalarıma, laboratuvarında maddi ve manevi imkanlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları ilgiden ötürü Doç. Dr. Remziye Nalçacıoğlu, Doç. Dr. İsmail DEMİR, Duygu BEKİRCAN, İslam YILDIZ ve Ardahan ESKİ'ye teşekkür ederim. Bu tezin hazırlanması sırasında her türlü desteği sağlayan aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca, tez çalışmam süresince laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Asım KADIOĞLU'na ve çalışmamı destekleyen KTU-BAP (Proje no: 8642) birimine de teşekkür ederim.

Meriç DEMELİ
Trabzon 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Fındık ve tahıl ambarlarından *Bacillus* izolasyonu, karakterizasyonu ve izolatların insektisidal özelliklerinin araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Kazım SEZEN’in sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 24/07/2012

Meriç DEMELİ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Zararlı Böceklerle Mücadele Yöntemleri	4
1.3. <i>Bacillus</i> Türlerinin Genel Özellikleri.....	7
1.4. <i>Bacillus</i> Türlerinde Endospor Oluşumu.....	8
1.5. <i>Bacillus</i> Türlerinde Kromozomal ve Plazmit DNA.....	9
1.6. <i>Bacillus</i> Türlerinin Sınıflandırılması	11
1.6.1. Geleneksel Yaklaşımlar	11
1.6.2. Sayısal Fenetikler ve Kemotaksonomi.....	12
1.6.3. Filogenetik Analizler ve Gelişim	12
1.6.4. <i>Bacillus</i> Türlerinin Tanımlanması	12
1.7. Biyolojik Mücadelede Kullanılan <i>Bacillus</i> Türleri.....	13
1.7.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Genel Özellikleri	14
1.7.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Tarihçesi	14
1.7.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Habitatları	15
1.7.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Plazmitleri.....	15
1.7.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Alttürlerinin Sınıflandırılması	15
1.7.6. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in İnsektisidal Proteinleri	17
1.7.7. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Hedef Böceklerdeki Etki Mekanizması	21
1.7.8. <i>Bacillus thuringiensis</i> Toksinlerine Karşı Böcek Direnci	22

1.7.9.	<i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Biyoteknolojik Kullanımı.....	23
1.8.	Tezin Amacı.....	26
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	28
2.1.	Örneklerin Toplanması	28
2.2.	Örneklerden <i>Bacillus</i> Cinsine Ait Bakterilerin İzolasyonu	28
2.3.	Bakteriyal İzolatların Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ..	29
2.3.1.	Gram Boyama	29
2.3.2.	Endospor Boyama	29
2.4.	Bakteriyal İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	30
2.4.1	Optimum pH'ın Belirlenmesi	30
2.4.2.	Optimum NaCl İhtiyaçlarının Belirlenmesi.....	30
2.4.3.	Nişasta Hidroliz Testi	30
2.4.4.	Katalaz Testi	30
2.4.5.	Oksidaz Testi	31
2.4.6.	API Test Kitleri ile Bakteriyal İzolatların Tanımlanması.....	31
2.4.6.1.	API 50CHB Test Kiti.....	31
2.4.6.2.	API 20E Test Kiti.....	33
2.4.6.2.1.	Bakteriyal İzolatların MacConkey Agar (MCA)'da Büyütülmesi	35
2.4.6.2.2.	API of Medium Testi	35
2.4.6.2.3.	API M Medium Testi	36
2.5.	Bakteriyal İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi	36
2.5.1.	Genomik DNA İzolasyonu	36
2.5.2.	16S rDNA Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması	37
2.5.3.	16S rDNA Gen Bölgesinin pGEM-T Vektörüne Klonlanması	37
2.5.4.	Kompotent Hücre Hazırlanması	38
2.5.5.	16S rDNA Gen Bölgesinin Kompotent <i>E. coli</i> JM101'e Aktarımı	38
2.5.6.	Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz (<i>EcoRI</i>) ile Muamelesi	38
2.5.7.	Klonların İçerdiği DNA Parçalarının Baz Dizilerinin Belirlenmesi	39
2.5.8.	Elde Edilen Baz Dizilimlerinin İncelenmesi	40
2.5.9.	Bakteriyal İzolatların <i>cry</i> Gen İçeriklerinin Belirlenmesi	40
2.6.	Bakteriyal İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	40
2.6.1.	Bakteriyal Süspansiyonların Hazırlanması	41

2.6.2.	Bakteriyal İzolatların Böcekler Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	41
3.	BULGULAR.....	42
3.1.	<i>Bacillus</i> Cinsine Ait Bakterilerin İzolasyonu	42
3.2.	Bakteriyal İzolatların Boyama ve Morfolojik Özellikleri.....	43
3.3.	Bakteriyal İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	45
3.4.	Bakteriyal İzolatların Moleküler Özellikleri.....	50
3.4.1	16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları.....	50
3.4.2	Bakteriyal İzolatların <i>cry</i> Gen İçerikleri	57
3.5.	Bakteriyal İzolatların İnsektisidal Etkileri	57
4.	TARTIŞMA	60
5.	SONUÇLAR	67
6.	ÖNERİLER.....	68
7.	KAYNAKLAR	69
8.	EKLER.....	81

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

FINDIK VE TAHIL AMBARLARINDAN *BACILLUS* İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE İZOLATLARIN İNSEKTİSİDAL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Meriç DEMELİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Kazım SEZEN

2012, 80 (Tez Sayfa), 18 (Ek Sayfalar)

Bacillus cinsi bakteriler spor oluşturan ve biyolojik mücadele de en çok kullanılan toprak grubu Gram + bakteriler olup mikrobiyolojik insektisitlerin temelini oluşturmaktadırlar. Ambarlardan toplanan öğüntü örneklerinden yeni toksin kombinasyonlu *Bacillus* türlerini belirlemek amacıyla *Bacillus* cinsine ait 26 bakteriyal izolat elde edildi. Bu izolatların koloniyal ve hücresel özellikleri ışık mikroskopuyla, fizyolojik özellikleri genel testler ile biyokimyasal özellikleri ise API kitleri kullanılarak tespit edildi. Moleküler karakterizasyonları için ise 16S rDNA baz dizileri ve *cry* gen içerikleri belirlendi. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda izole edilen bakterilerin *Bacillus thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. atrophaeus*, *B. megaterium* ve *Lysinibacillus sphaericus* türlerine ait oldukları belirlendi. Ayrıca Bg5 numaralı izolatta *cry1*, B2, B3 ve N6 numaralı izolatlarda *cry3* geni belirlendi. İzolatların *Plodia interpunctella*, *Ephestia kuehniella* larvaları ve *Sitophilus granarius* erginleri üzerinde biyoassay çalışmaları yapıldı. Biyoassay sonuçlarına göre en yüksek insektisidal etkiler Bg5 (*Bacillus thuringiensis*) numaralı izolat tarafından %100 oranıyla *P. interpunctella* larvaları üzerinde, B4 (*B. subtilis*) numaralı izolat tarafından ise %63.3 oranıyla *S. granarius* erginleri üzerinde gerçekleşti. Özellikle yüksek insektisidal etki gösteren Bg5 numaralı izolata lepidopteran depo zararlıları ile mücadelede etkili bir kontrol ajanı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik mücadele, *Bacillus thuringiensis*, 16S rDNA, *cry* geni

Master Thesis

SUMMARY

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF INSECTICIDAL
PROPERTIES OF *BACILLUS* FROM WAREHOUSES

Meriç DEMELİ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Kazım SEZEN
2012, 80 Pages, 18 Appendix

The genus of *Bacillus* is a spore-forming and Gram + bacteria that used mostly in biological control. In addition, they originate the basis of microbiological insecticide. In order to develop *Bacillus* strains with new toxin combinations, 26 bacterial isolate belonging to *Bacillus* sp. isolated from warehouses. Firstly, colonial and cellular characteristics, then, physiological features and finally, the biochemical properties of these isolates were analyzed by the light microscopy, manual tests and API kit, respectively. For the molecular characterization, 16S rDNA sequence and *cry* gene contents were detected. As a consequence of characterization, the isolates were identified as *Bacillus thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. atropheus*, *B. megaterium* and *Lysinibacillus sphaericus*. It was also recorded that the isolates Bg5 have a *cry1* gene, B2, B3 and N6 have a *cry3* genes. The toxic effects of the isolates were determined by the bioassay using larvae of *Plodia interpunctella* (Indianmeal moth), *Ephestia kuehniella* (Mediterranean flour moth) and adults of *Sitophilus granarius* (Wheat weevil). According to the results of bioassay, the highest insecticidal effects were 100% with Bg5 (*Bacillus thuringiensis*) against the larvae of *P. interpunctella* and 63.3% with B4 (*B. subtilis*) against the adult of *S. granaries*. Especially, Bg5 has the highest insecticidal effect may be valuable as a microbial control agent for lepidopteran warehouse pests.

Key Words: Biological control, *Bacillus thuringiensis*, 16S rDNA, *cry* gene

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. <i>Bacillus</i> türlerinde endospor oluşumu.....	9
Şekil 2. Spor ve kristal proteinlerin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	18
Şekil 3. Cry proteinlerinin 3 boyutlu yapısı	20
Şekil 4. Kristal proteinlerin etki mekanizması	22
Şekil 5. Farklı izolatlara ait mikroskop görüntüleri.....	43
Şekil 6. Ekim yapılmış API küpülleri.....	48
Şekil 7. 16S rRNA bölgesinin maksimum parsimoni analizi.....	56
Şekil 8. Tespit edilen <i>cry</i> genlerinin agaroz jel görüntüsü	57
Şekil 9. İzolatların <i>Sitophilus granarius</i> erginleri üzerindeki insektisidal etkisi	58
Şekil 10. İzolatların <i>Plodia interpunctella</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi	59
Şekil 11. İzolatların <i>Ephestia kuehniella</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi.....	59

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. <i>B. thuringiensis</i> 'lerin flagella H-serovarlarına göre sınıflandırılması	16
Tablo 2. <i>B. thuringiensis</i> 'in cry genleri ve Cry proteinlerinin etkili olduğu böcek takımları.....	20
Tablo 3. Lepidopteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan <i>B. thuringiensis</i> 'ler.....	24
Tablo 4. Dipteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan <i>B. thuringiensis</i> 'ler.....	25
Tablo 5. Coleopteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan <i>B. thuringiensis</i> 'ler	26
Tablo 6. API 50CHB test kitinin içerdiği testler	32
Tablo 7. API 20E test kitinin içerdiği testler	34
Tablo 8. PCR reaksiyonu ve programı	37
Tablo 9. Bakteriyal izolatların boyama ve morfolojik özellikleri	44
Tablo 10. Bakteriyal izolatların fizyolojik özellikleri	45
Tablo 11. Bakteriyal izolatların biyokimyasal özellikleri	47
Tablo 12. Bakteriyal izolatların API sonuçları.....	49
Tablo 13. İzolatların 16S rDNA dizin analizi sonuçları.....	50
Tablo 14. <i>B. pumilus</i> izolatlarının API50CHB sonuçlarının karşılaştırılması	62
Tablo 15. <i>B. subtilis</i> izolatlarının API50CHB sonuçlarının karşılaştırılması.....	63

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADH	: Arginin dehidrolaz
AMY	: Amigdalın
ARA	: Arabinoz
bp	: Baz çifti
CIT	: Sitrat
CFU	: Koloni oluşturabilen birim
DDT	: Dikloro-difenil-trikloroetan
DNA	: Deoksiribonukleik asit
GEL	: Jelatin
GLU	: Glikoz
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
ICP	: İnsektisidal kristal proteini
IND	: İndol
INO	: İnositol
LDC	: Lisin dekarboksilaz
MAN	: Mannitol
MEL	: Melibiose
MK	: Metil kırmızısı
NPV	: Nukleopolihedrovirüs
ODC	: Ornitin dekarboksilaz
PBS	: Fosfat buffer salin
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
VP	: Voges proskauer

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüzün önde gelen sorunlarından biri hızla artan dünya nüfusu için besin kaynaklarının sağlanmasıdır. Ayrıca, kullanılabilir tarım alanları da gün geçtikçe azalmaktadır. Dolayısıyla, birim alandan elde edilen ürün miktarının artırılması ve üretimden tüketime kadar ürünün uygun bir şekilde korunması büyük önem taşımaktadır. Tarımsal ürünlerin hasattan tüketimlerine kadar en az düzeyde kayıpla korunmaları gerekir [1]. Genellikle depolanmış ürünlerde hayvansal kökenli organizmaların neden olduğu kayıplar yıllık ortalama %10 olarak kabul edilmektedir [2]. Bu zarar oranı bulaşma düzeyine göre daha da artabilmektedir. Ülkemiz hem iklim özellikleri hem de üretim çeşitliliği nedeniyle çok sayıda depolanmış ürün zararlısının gelişmesine olanak sağlamaktadır [1].

Depolanmış ürünlerde görülen zararlılar beslendikleri ürüne doğrudan ve dolaylı olarak zarar verebilmektedirler. Bu zararlılar bulaşmış oldukları üründe, tohumluk özelliğinin düşmesine, ağırlık kayıplarına, kalite ve besin değerlerinde olumsuz değişikliklere yol açarak ürünün ticari değerinin düşmesine neden olmaktadır [3]. Bunlara ek olarak; zararlıların vücut kalıntıları, pislikleri ve salgılamış oldukları ağ ve benzeri maddeler nedeniyle ürünün kalitesinde de önemli ölçüde düşümlere neden olmaktadır. Depolanmış ürünlerde zararlı bulaşıklılığı yoğun ise küflenme, kızılaşma ve kokuşmanın daha kolay ve yoğun olarak ortaya çıkmasına neden olurlar.

İnsanlık tarihinden bu yana tarım alanlarında oluşturdukları zararlar ve bazı hastalıkları yaymaları nedeniyle böceklerle mücadele edilmektedir. Bu mücadele sırasında esas olan doğal habitatların korunmasıdır. Çünkü ekolojik özellikler dikkate alınmadan yapılan mücadele yöntemleri, başka zararlıların ortaya çıkmasına, biyolojik çeşitliliğin azalmasına ve uzun vadede verim düşüşüne neden olmaktadır. Dünya genelindeki hızlı nüfus artışı ve besin sıkıntısı düşünüldüğünde bu durum daha da önemli hale gelecektir [4, 5].

Böceklerle mücadele yöntemleri doğal yöntemlerden başlayıp sentetik kimyasalların kullanımına kaymıştır. Fakat kimyasalların çevreye ve hedef olmayan canlılara verdiği zararlar nedeniyle biyolojik yöntemlerin kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Günümüzde

kullanılan kimyasallar, geçmişte kullanılanlarla kıyaslandığında (DDT gibi) daha güvenli ve yarı ömrü az olmasına rağmen yine de birçok sorunlar doğurmaktadır [6]. Örneğin sentetik insektisitlere uzun süre maruz kalındığında kanser, karaciğer hastalıkları, immunotoksisite, doğum anormallikleri, insan ve diğer hayvanlarda görülen kısırlık problemleri gibi birçok sorun ortaya çıkmaktadır [7]. Ayrıca dünyanın vazgeçilmez parçaları olan hava, su ve toprak kullanılan kimyasal insektisitler yüzünden ölçülebilir düzeyde kirlenmektedir [8]. Tarım ilacı kalıntılarının suda eser miktarda bulunması bile sucul ekosistemlerdeki besin zincirlerinin bozulmasına ve buradaki canlı türlerinin hızla yok olmasına neden olmaktadır [9].

Ticari olarak satılan kimyasal insektisitlerin birçoğu özgülük göstermediği için birçok türe ait canlıların ortadan kalkmasına neden olmaktadır. Bu maddelerin en belirgin yan etkileri şu şekilde sıralanabilir [10];

- Arılar, kuşlar balıklar, mikroorganizmalar ve omurgasızlar gibi hedef olmayan organizmalarda ölümler,
- Kuş, balık ve diğer organizmalarda üreme potansiyelinin azalması,
- Hedef olmayan organizmalarda dayanıklılık oluşması sonucu insanlara hastalık taşıyan böcek ve parazitlerin kontrolden çıkması,
- Ekosistemin yapısı ve tür sayısının değişmesi.

Kullanılan kimyasalların etkisiyle doğal düşmanlar öldükten sonra zararlılar tekrar çoğalarak ekosistemdeki yerini alır ve zarar vermeye devam eder. Bununla birlikte eğer doğal düşman ortamdaki başka zararlıları kontrol ediyorsa, yeni bir zararlı popülasyonu ortaya çıkarılmış olur. Kimyasallarla zararlının biri ortadan kaldırılırken diğeri istemeden de olsa çoğalmaya başlar ve yeni bir problem ortaya çıkar [10].

Kimyasal insektisitlerin kullanımının olumsuz etkileri nedeniyle bu konuya kamuoyunun ilgisi artmış ve kimyasal insektisitlere karşı alternatif mücadele yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerin başında da biyolojik kontrol olarak bilinen mücadele yöntemi gelmektedir [11].

Biyolojik kontrol, “böceklerin verdiği zararları en aza indirmek için bu böceklerin tabii düşmanlarını kullanma” olarak tanımlanabilir. Tabii düşman terimi, parazitler ve predatörlerle birlikte hastalık oluşturan mikroorganizmaları da kapsar [11].

Bakteriler, virüsler, mantarlar, nematodlar, protozoa grubuna ait organizmalar ve rekombinant teknikler ile geliştirilen ajanlar biyolojik kontrolde kullanılan elemanları

oluşturmaktadır. Bunlar arasında, toprak grubu bakteriler en çok gelecek vaat eden biyolojik kontrol ajanlarıdır [12].

Günümüzde böceklerle biyolojik mücadelede birçok mikroorganizma kullanılmaktadır. Şimdiye kadar 100'den daha fazla bakteri türü böcek patojeni olarak tanımlanmasına rağmen, yalnızca *Bacillus* türleri kontrol ajanı olarak ticari bakımdan tercih edilmektedir [12].

Bacillus cinsi bakteriler hem antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları hem de kolay üretilibilmeleri sebebiyle dikkat çeken mikroorganizmalardır [13, 14]. Ayrıca, sporlanabilme yetenekleri ve çeşitli metabolizma faaliyetleri geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır [14]. Birçok çalışmada kullanılan *Bacillus* türleri ürettikleri proteinler nedeniyle ticari öneme sahiptir. Bazı *Bacillus* türleri ise proteolitik, sakkarolitik ve lipolitik enzimleri sayesinde besin endüstrisinde önemli bir yere sahiptir. *Bacillus* türleri basitrasin (*B. licheniformis*), polimiksin (*B. polymyxa*), gramisidin (*B. brevis*), tirosidin (*B. brevis*), subtilin (*B. subtilis*) ve basilisin (*B. subtilis*) gibi ilaç endüstrisinde kullanılan peptid antibiyotikler üretmektedir. *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* ve *B. popilliae* türleri çeşitli böcek larvalarına patojenik etki gösterir ve biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılırlar [13].

Türkiye'de kimyasal insektisitlerin zararlılarla mücadelede yaygın olarak kullanıldığı göz önüne alındığında, uzun süreli ürün veriminde azalma, ekosistemde dengenin bozulması, sağlık problemlerinin artması ve tüm bunlara bağlı olarak ciddi ekonomik kayıpların ortaya çıkması kaçınılmazdır. Bu nedenle *Bacillus* türlerinin özellikle de *Bacillus thuringiensis* (Bt) ürünlerinin zararlılarla mücadelede kullanılması, yaygınlaştırılması, farklı zararlılara karşı yeni Bt izolatlarının taranması, laboratuvar ortamında toksik etkilerinin belirlenmesi, farklı formülasyonlar ve uygulama yöntemleri geliştirilerek ticari kullanımının sağlanması faydalı olacaktır [6].

B. thuringiensis doğal çevrede her yerde bulunur; topraktan, koniferlerden, ambarlardan, çimenlerden, geniş yapraklı ağaçların yapraklarından ve böcek habitatlarından kolayca izole edilebilir. Bu çevrelerin arasında ambarlar, yeni toksin kombinasyonlu ve uzun süre hayatta kalabilen suşlar için ideal bir ortamdır. Buralar *B. thuringiensis*'in farklı alt türlerini barındırır ve özellikle *B. thuringiensis* için iyi bir kaynaktır. Ek olarak, böceklerin istilasıyla ambar koşullarında *B. thuringiensis* suşları içerisinde insektisidal kristal protein (ICP) genlerini kodlayan plazmitlerin konjugasyon benzeri yöntemle transferiyle *B. thuringiensis*'in çeşitliliğinin meydana gelmesi

muhtemeldir. Bu yüzden ambar ekosistemi *B. thuringiensis*'in zenginleşmesi ve yayılmasını sağlayan ideal bir çevre olabilir [15].

Bu bilgiler ışığı altında, Trabzon'da bulunan çeşitli ambarlardan alınan tahıl ögüntüleri, depolanmış ürünler, böcek kadavraları ve böcek ağlarından oluşan örneklerden yeni toksin kombinasyonlu *Bacillus* suşlarının farklı alt türlerini belirlemek ve bunların depo zararlıları üzerindeki toksisitesini tespit edebilmek amaçlanmıştır. Bu bakımdan elde ettiğimiz izolatlara ait toksinlerin etkisini belirlemek için özellikle depo zararlıları olan Coleoptera takımından *Sitophilus granarius* (buğday biti) ve Lepidoptera takımından *Ephestia kuehniella* (un güvesi), *Plodia interpunctella* (kuru meyve güvesi) larvaları seçilmiştir.

1.2. Zararlı Böceklerle Mücadele Yöntemleri

Ülkemiz tahıllar ve kurutulmuş meyve gibi ürünlerde dünya üretim ve ihracatında önemli bir yere sahiptir. İç tüketim ve dış satımda büyük öneme sahip olan bu ürünler depolanabilmektedir. Hasat öncesi veya hasattan sonra depolanmış ürünlerde görülen zararlıların önemli düzeylerde kayıplara yol açtığı gözlenmektedir [1].

Böceklerin ürün tanelerini yiyerek beslenmeleri sonucu sebep oldukları zararın yanında, faaliyetleri ile tanenin sıcaklığı ve nem oranının yükselmesine de neden olduklarından depolamaya dolaylı yönden olumsuz etkileri bulunmaktadır [16].

Depolanmış ürünlerde görülen zararlılar bulaştıkları üründe beslenerek doğrudan ve dolaylı şekilde zarar verebilmektedir. Bunlar zarar derecesine bağlı olarak birincil ve ikincil zararlılar olmak üzere iki ana grupta toplanırlar.

Birincil zararlılar gelişmiş ağız yapıları nedeniyle sağlam taneleri tahrip edebilmekte ve önlem alınmadığı takdirde zararları önemli boyutlara ulaşmaktadır. Ülkemizdeki bu zararlılar buğday biti (*Sitophilus granarius* L), pirinç biti (*Sitophilus oryzae* L.), kapra böceği (*Trigoderma granarium* Everts.), arpa güvesi (*Sitotroga cerealella* liv.), ekin kambur biti (*Rhizopertha dominica* F.), mısır biti (*Sitophilus zeameis* Metsch.), baklagil tohum böcekleri (*Bruchus* spp.), patates güvesi (*Phthorimaea operculella* Zeller.) ve tütün güvesi (*Ephestia elutella* Hbn.)'dir [17].

İkincil zararlılar ise sağlam tanelerde zarar yapamamakta ancak primer zararlıların tahrip ettiği tanelerdeki tahribatı artırmaktadırlar. Ayrıca un, irmik, makarna, bulgur vb. mamul maddelerde doğrudan zarar vermektedirler. Bu gruba giren önemli zararlılar ise:

kırma bitleri (*Tribolium confusum* Duv.), un kurdu (*Tenebrio molitor* L.), testereli böcek (*Oryzaephilus surinamensis* L.), küçük kırma biti (*Leomophoeus ferugineus* Steph.), ekin kara böceği (*Tenebriodes mauritanicus* L.), pirinç kırma biti (*Latheticus oryzae* Waterh.), un güvesi (*Pyralis farinalis* L.), değirmen güvesi (*Ephestia kuehniella* Zell.) ve tatlı kurt (*Lasioderma serricorne* F.) dir [17].

Ambar zararlıları ürüne değişik yollardan bulaşmaktadır: Kimi zararlılar ambarda vardır ve ürün ambara konulduktan sonra bulaşır. Kimi zaman ürüne ambar öncesi devrelerde bulaşır ve ambarda zararını sürdürür. Bazen ne ambar ne de ürün bulaşıktır ve zararlı ya uçarak ya da değişik etkenlerin taşıyıcılığı ile ambara ve ürüne bulaşır. Bu nedenlerden dolayı söz konusu ürünlerin depolanmasında temel ilke, temiz ambara temiz ürün konulması ve ürünün depolama süresince bulaşmalardan korunması gerekir. Bu nedenle ürün daha ambara girmeden önce mücadele önlemleri uygulamaya konulmalıdır [17].

Uluslararası ürün ticareti ile ülkeden ülkeye yayılan depo zararlıları ile yasal mücadele kapsamında karantina, ambargo, muayene veya sertifika gibi uygulamalar yapılmaktadır.

Kültürel önlemler zararlıların depolara girişini ve gelişimini engelleyecek şekilde ürün depolara girmeden önce, girerken ve girdikten sonra aşamalı olarak yapılmaktadır. Depoların temiz tutulması, eski ve yeni ürünlerin ayrı depolanması, serin, havadar ve gerekli oranda nemin sağlanması gibi işleri kapsamaktadır.

Tarımsal ürünün ve gıdanın depolanmış ürün zararlılarından korunması üretici, işletme ve ihracatçılar için yaşamsal öneme sahiptir. Ülkemizde depolarda ve işletmelerde ürünlerin zararlılardan korunmasında en yaygın yöntem pestisit kullanımınıdır. Depolanmış ürün zararlıları ile mücadele amacı ile dünyada ve ülkemizde yaygın olarak insektisitler kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan insektisitler zararlıları kısa sürede öldürmesinin yanı sıra çevreye ve insan sağlığına son derece zarar verebilmektedir [18]. Depolarda kullanılan birçok pestisite zararlıların direnç geliştirdiği bilinmektedir [19].

Depolanmış ürün zararlılarıyla kimyasal mücadelede dünyada ve ülkemizde en sık kullanılan yöntemlerin başında fumigasyon gelmektedir. Fumigasyon bir teknoloji olarak depolanmış ürünlerde zararlılarla mücadelede hızlı, düşük maliyetli ve etkili çözümler sağlamaktadır.

Kimyasal mücadelenin tarihinden bu yana pek çok kimyasal (DDT, Malathion, Metil Bromit vb.) kullanılmıştır. Fakat bu kimyasalların oluşturdukları zararlar nedeniyle çoğu

ülkede kullanımları yasaklanmıştır. Bugün ülkemizde ruhsatlı fumigant olarak alüminyum veya magnezyum fosfit içerikli metalik fosfin formülasyonu kullanılmaktadır.

DDT'nin keşfinden önce 1940'lı yılların başına kadar zararlılar tarafından üründe meydana gelen kaybın dünya ortalaması %7 iken, 1980'lerin sonuna doğru bu kaybın %13'e yükselmesi dikkat çekicidir [20]. Bu artış, zararlılarda ilaçlara karşı dayanıklılığın artması, potansiyel zararlıların ekonomik zararlı durumuna geçmesi ve doğal düşmanların öldürülmesi nedeniyle doğal dengenin bozulmasından kaynaklanmıştır. Bunlara insan ve hayvan sağlığının tehdit edilmesi, gıda maddelerindeki ilaç kalıntıları, çevre kirlenmesi ve yüksek ilaç fiyatları da eklenince bu konuya kamuoyunun ilgisi artmış ve kimyasal insektisitlere karşı alternatif mücadele yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerin başında da biyolojik mücadele yöntemi gelmektedir [21, 22].

Biyolojik mücadele çalışmalarına ağırlık verilmesinin nedeni, sadece kimyasal mücadelenin olumsuz etkilerinden kurtulmak değil, aynı zamanda belki daha da önemlisi, doğada zararlıları %99 oranında baskı altında tutan yararlı mikro ve makro organizmalardan yararlanılmak istenmesidir [21].

İnsanoğlu tarih boyunca öncelikle insan ve hayvan sağlığını tehdit edenleri, yetiştirdiği kültür bitkilerinde ürün kaybına neden olanları, orman ve süs bitkilerine zarar verenleri ve kentsel yaşamda sorun yaratanları dikkate almış olup, en az zararlı türler kadar doğada yararlı türlerin de olduğunu ve bunların gerçek anlamda zararlıları baskı altına aldığını çok sonradan keşfetmiştir [21].

En basit tanımıyla biyolojik mücadele, zararlı böcek popülasyonlarını dolayısıyla böceklerin zararlarını azaltmak için canlı organizmalardan (mikroorganizmalar, predatörler, parazitoid böcekler, omurgasızlar, omurgalılar) yararlanılarak yapılan ekonomik, güvenilir ve başarılı bir yöntemdir.

Biyolojik mücadele ajanları olarak virüsler, bakteriler, funguslar, nematodlar ve protozoa grubuna ait organizmalar kullanılmaktadır. Bu ajanlar böceklere saldırır, hastalandırır ve öldürürler. Bunlar arasında, en çok toprak grubu bakterilerden Bacillaceae ailesine ait *Bacillus* türleri gelecek vaat eden biyolojik mücadele ajanlarıdır ve Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera takımına ait böcekleri hedef alırlar [23].

Günümüzde bu ajanların kitle üretimi yapılarak biyoinsektisit olarak piyasaya sürülmüş ve çoğu ülkelerde kimyasal ilaçların yerini almıştır. Biyoinsektisitler üretimlerinin kolay ve sürekli olması, zararlıların kontrolünde güvenilir olmaları, sadece

hedef canlıya etki etmeleri, çevre kirliliği ile ilgili problemler yaratmamaları ve endosporlarının doğada uzun süre kalmaları nedeniyle tercih edilmektedir [24].

Biyolojik mücadelede biyoinsektisit olarak kullanılan mikroorganizmaların çoğunu *B. thuringiensis* oluşturmaktadır ve birçok böcek türüne karşı başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Kullanılan Bt preparatları genellikle standart ilaçlama aletleriyle veya sulama suyuna karıştırılarak kullanılmaktadır. Ne yazık ki bu preparatlar dünya ilaç piyasasının ancak %2-5'ini oluşturmaktadırlar [25].

1.3. *Bacillus* Türlerinin Genel Özellikleri

İki ana alt gruptan oluşan Bacillaceae familyası içerisinde *Bacillus* ve *Clostridium* türleri yer almaktadır [26]. Başlangıçta *Bacillus* türleri arasında yer alan bazı bakteriler, daha sonra DNA yapılarındaki G+C oranlarına göre ayrı cinsler olarak tanımlanmıştır. Bunlar; *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus* ve *Halobacillus* cinsleridir. Burada en iyi bilinen türler ise *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. sphaericus* ve *B. thuringiensis*'tir. Bunların rDNA dizilişlerine bakılarak üç ana *Bacillus* grubu belirlenmiştir. Bunlar; “*B. subtilis*” grubu, “*B. cereus*” grubu ve “*B. circulans*” grubudur [27].

Bacillus cinsi, Gram pozitif, çubuk şekilli, endospor oluşturan, zorunlu aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşur. Tek ya da çok sayıda hücreden oluşan uzun zincirler meydana getirebilirler. Yuvarlak veya köşeli olan hücrelerin büyüklükleri 0,5-1,2 µm ile 2,5-10 µm arasında değişmektedir [13, 28].

Bacillus'ların koloni özellikleri besiyeri çeşidi, koloninin yaşı gibi çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Koloniler yarı şeffaf, opak, düzgün ya da pürüzlü; koloni renkleri kremden sarıya doğru olabilir. Çoğu *Bacillus* türü pigment oluşturmaz, ancak bazı türler farklı ortamlarda sarı, yeşil, mavi-siyah vb. pigmentler üretebilirler [13, 28].

Optimum büyüme sıcaklıkları 25°C ile 37°C arasında değişmesine rağmen termofilik ve psikrofilik türleri 75°C'den daha yüksek ve 3°C'den daha düşük sıcaklıklarda büyüebilmektedir. Ayrıca bazı türleri 2-10 arasında değişen asidik ve alkali ortamlarda gelişebilirler [28].

Çoğu *Bacillus* türü peritirik flagella taşırlar ve hareketi bununla sağlarlar. Flagella antijenleri *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* ve *B. cereus* gibi türlerin tanımlanmasında kullanılmakla birlikte, flagella oluşumu sistematikte kullanılan temel bir ölçüt değildir [13, 28].

Bazı *Bacillus* türleri dış yüzeyinde polisakkarit veya polipeptid yapılı kapsül oluştururlar. Örneğin, *B. anthracis* 'de poli D-glutamik asitten oluşan kapsül bulunmakta ve virülans faktör taşımaktadır [13, 28].

Bacillus'ların asıl habitatları toprak olmasına rağmen sporları nedeniyle biyosferde birçok farklı çevreden izole edilebilirler. Toprak mikroflorasında yer alan *Bacillus* türleri besin maddeleri açısından zengin topraklarda bulunabildikleri gibi, besince fakir topraklardan da izole edilebilirler. Örneğin; *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. cereus* karmaşık besin maddelerine ihtiyaç duymazken, *B. polymyxa* ve *B. azotofixans* gelişmek için bitki rizosferine ihtiyaç duyarlar [28, 29].

Bacillus cinsine ait türler endüstriyel olarak kullanılan hemen hemen bütün enzim tiplerini üretebildiklerinden oldukça önemlidirler. Ayrıca, geniş sıcaklık spektrumunda büyüebilmeleri nedeniyle biyoteknolojide uygulama olanağı bulacağı düşüncesi özellikle termofilik enzimlere olan ilgiyi arttırmıştır.

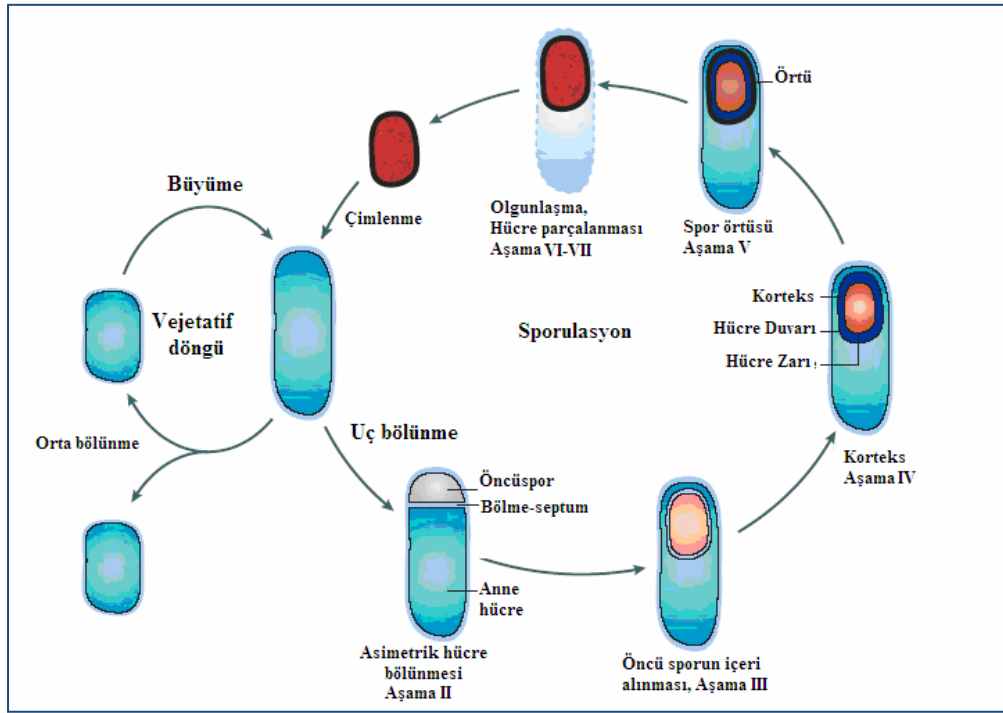
1.4. *Bacillus* Türlerinde Endospor Oluşumu

Endosporlar, genellikle besin maddelerinin azaldığı durumlarda büyüme evresinin durgun fazında bakteriler tarafından oluşturulur. Endosporlar sıcaklık, kuraklık, basınç ve birçok kimyasal dezenfektana karşı oldukça dayanıklı yapılar olup, 15-20 dakika 120°C sıcaklığa maruz bırakıldıklarında ölürler. Sporların dayanıklı olmalarındaki en önemli nedenlerden biri içlerindeki sıvı miktarının az olmasıdır. Endosporların hücredeki yeri ve şekli türler arasında farklılık gösterir. Bunlar genellikle silindirik, elipsoidal, oval veya yuvarlak olup hücre içinde merkeze yakın veya uç kısımlarda bulunabilirler [30, 31]. *Bacillus*'ların tanımlanması ve türler arası farklılıkların belirlenmesinde spor şekli ve konumları temel alınabilmektedir.

Çevresel stres koşullarında çekirdek ikiye bölünerek birbirinden zarsı bir bölme ile ayrılır. Bölmenin büyümesiyle öncü spor içeri alınarak çift tabakalı zar içerisinde kalır. İki zar arasında peptidoglukan yapıda korteks tabakası oluşur. Korteks tabakası kalınlaşır ve

dipikolinik asit şelatlama özelliği ile Ca^{+2} iyonlarını tutar. Böylece spordaki su molekülleri dışarı atılarak içerindeki sıvı miktarı azaltılmış olur [30].

Endosporlar karbonhidrat, aminoasit ve su gibi uyarıcıların olduğu ortamlarda çimlenmeye başlar. Enzimlerin aktifleşmesiyle korteks tabakası sindirilir, Ca^{+2} iyonları ve dipikolinik asit serbest bırakılır. Ardından RNA sentezinin başlamasıyla yeni vejetatif hücre oluşur (Şekil 1) [30].



Şekil 1. *Bacillus* türlerinde endospor oluşumu [32].

1.5. *Bacillus* Türlerinde Kromozomal ve Plazmit DNA

Prokaryotların esas genomunu oluşturan kromozomal DNA çoğu kaynakta çekirdek genomu olarak da ifade edilmektedir ve genellikle çift iplikli tek bir halkasal DNA molekülünden oluşmaktadır.

Bacillus genetiği çalışmalarında en çok *B. subtilis* türü kullanıldığı, bu türün genom büyüklüğünün 4,2 Mbp olduğu ve 4100 protein kodlayan gene sahip olduğu bildirilmiştir. *B. subtilis*'in yanı sıra *B. cereus*, *B. brevis* gibi türler de moleküler genetik çalışmalarında kullanılmaktadır [15, 28].

Biyolojik mücadelede en çok kullanılan *B. thuringiensis*'in kromozom büyüklüğünün yaklaşık olarak 5,2-5,8 Mbp ve G+C oranının yaklaşık %32-35 arasında olduğu belirlenmiştir [33].

Plazmitler bütün bakteri hücrelerinde kromozomdan bağımsız olarak taşınan, bakterinin ortama uyumunda ve evrimde önemli bir yere sahip olan esas kalıtsal materyalin dışındaki DNA molekülleridir. Plazmitlerin sayısı ve büyüklükleri türlere göre değişiklik gösterse de, hücre içindeki kopya sayıları düzenlenme mekanizmaları ile sıkı bir biçimde kontrol altında tutulmaktadır.

Plazmitler taşıdıkları genlere ve bakterinin fenotipine yaptıkları katkıya göre isimlendirilirler (eşey plazmiti, direnç plazmiti). Plazmit DNA'ları üzerinde bakterinin yaşamsal işlevlerini yürütmesinden sorumlu genler taşınmaz. Bazı koşullar altında konakçıya gerekli ya da yararlı olan proteinleri kodlayan genleri taşırlar ve içinde buldukları hücreye ortamda üstün hale gelebileceği özellikleri kazandırır. Örnek olarak antibiyotik direnci, virulans özellik, organik bileşiklerin parçalanması gibi aktiviteler verilebilir [34].

Hemen hemen bilinen bütün plazmitler çift zincir DNA taşırlar. Plazmitlerin çoğu halkasal olmakla birlikte, çok sayıda doğrusal plazmit olduğu da bilinmektedir. Doğal plazmitlerin büyüklükleri yaklaşık olarak 1 kilobaz ile 1 megabaz arasında değişiklik gösterir [35]. Plazmitler, replikasyon orjinine sahiptir ve bağımsız olarak replike olabilirler.

Bacillus türlerinden *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. larvae* gibi birçok türe ait plazmit çalışmaları yapılmıştır [36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43].

Bazı *Bacillus* türlerinin antibiyotiklere karşı direnç özelliği taşıyan plazmitleri taşıması, rekombinant DNA çalışmalarında vektör olarak kullanılabilmelerine ve birçok çalışma için aranan organizmalar olmalarını sağlamıştır [36, 44, 45, 46].

B. anthracis'e ait *pagA*, *lef* ve *cya* toksin genleri pXO1 olarak isimlendirilmiş büyük bir plazmitin içinde yer alırlar. Bu plazmitin dizin analizi ilk kez 1999 yılında Okinaka ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. 181 kb uzunluğundaki bu plazmitin 44,8 kb uzunluğundaki bir bölgesi "patojen adası" olarak isimlendirilir [47].

B. thuringiensis'lerde bulunan *cry* genleri de genellikle taşınabilir büyük plazmitlerde bulunur. *B. cereus* grubuna ait bakterilerde plazmitler çok yaygındır ve tek bir suş birden fazla plazmit içerir.

Genelde *B. cereus* grubu üyeleriyle ilişkili hastalıkların ve konakların farklılığı plazmitlerinde bulunan genetik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Böylece plazmit ve kromozomal genler arasındaki genetiksel etkileşim bu bakteri grubunun plazmitlerini daha iyi anlamaya yardımcı olmaktadır [47].

1.6. *Bacillus* Türlerinin Sınıflandırılması

1.6.1. Geleneksel Yaklaşımlar

Aerobik koşullar altında ısıya dayanıklı endosporları oluşturan Gram pozitif çubuk şekilli bakteriler *Bacillus* cinsinde yer alır. Diğer spor oluşturan bakterilerden katı anaeroblar *Clostridium*, kokuslar *Sporosarcina* ve filamentli formlar *Thermoactinomyces* gruplarını oluşturur [48]. Bu yüzden mikroskopik olarak basilleri tanımlamak oldukça basittir ve bu şekilde pek çok yeni türün tanımlanması sağlanmıştır. Yeni bir izolata yeni bir isim vermek onu tanımlamaktan çok daha kolaydır. 1940'lara kadar çoğu sinonim ve zayıf tanımlamalarla yaklaşık 150 tür belirlendi. *Bacillus* sınıflandırmasının temeli Edinburg'da çalışan Tom GIBSON ve Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illionis'den Ruth GORDON ve Nathan SMITH tarafından kurulmuştur. Smith ve arkadaşları 150'den fazla türü temsil eden 1134 suş belirledi ve bunları sadece 19 tür altında topladı. Daha sonra ortak monograf suş ve türlerin tanımlanması bütün metodolojilerin tamamlanmasıyla sağlandı ve bu çalışma, basillerin tanımlanması ve izolasyonu için öncül referans olmuştur [49].

Gibson ve Gordon aynı zamanda basillerin morfolojik gruplandırmasında endosporun şeklini ve ana hücrenin pozisyonunu kullanmışlardır ve bu şekilde basiller 3 grupta toplanmıştır. *B. subtilis* ve yaygın basilleri içeren I. gruptaki türler ana hücreyle aynı çaptaki oval sporlara farklılaşır, II. grup türler (*B. polymyxa* vs.) ana hücreden tomurcuklanan oval sporlara sahiptir ve III. grup türler (özellikle *B. sphaericus*) yuvarlak sporları üretir [50]. Cinslerin bu ayrımı tanımlama için çok yararlı olup kontrol edilecek tür sayısını takson seviyesinde oldukça azaltır. Ancak bazen farklı sınıfları ayırt etmek zordur ve bu da yanlış tanımlamalara yol açabilir [51].

1.6.2. Sayısal Fenetikler ve Kemotaksonomi

Sayısal fenetikler, DNA baz kompozisyonu ve tahmin edilen suşlar arasındaki DNA dizi homolojisini sağlayan DNA bağlanma deneyleri gibi modern taksonomik tekniklerin tanımlanmasıyla basillerin şimdiye kadar daha heterojen olduğu görülmüştür. Suşlar arasındaki DNA baz kompozisyonunun çeşitliliği genetik farklılığın iyi bir göstergesidir, aslında bir cinsteki türlerin G+C oranının %10-12 mol den fazla çeşitli olmaması gerekir. *Bacillus*'a bakıldığında çeşitlilik yaklaşık %30 ile 65 arasındadır. Bu da türler arasındaki genetik çeşitliliğin önemini gösterir ve cinslerin birkaç gruba yani daha homojen taksonlara ayrılmasını sağlar [50].

Basiller aynı zamanda fizyolojik olarak da farklıdır ve birçok fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik karaktere göre belirlenen suşların sayısal sınıflandırılmasıyla değerlendirilir. Fenotipik olarak benzer suşların bir araya gelmesi bu yollarla meydana gelir ve genellikle türlerle eşleştirilir [52].

1.6.3. Filogenetik Analizler ve Gelişim

Organizmaların sınıflandırılmasında temel alınan genellikle 2 tip ilişki vardır. Fenetik ilişkiler bütün organizmaları kapsar ve genotipleri veya fenotipleri tanımlar. Filogenetik ilişkiler ise bakterilerin gelişim modellerini göstermeyi amaçlar. Filogenetik ilişkilere dayanan sınıflandırmalar "cladistic" olarak isimlendirilir. Bazı sınıflandırmalar gen dizilerinin karşılaştırılmasıyla yapılır [50]. Özellikle de rDNA sekansları bu tip analizlere daha uygundur [53]. Bu tip çalışmalar basiller arasında mümkün olan gelişim modellerini ortaya çıkarır ve *Bacillus* türlerinin gruplandırılmasında kullanılır.

1.6.4. *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması

Taksonomistlerin en önemli amaçlarından biri sınıflandırmada hızlı ve basit bir tanımlama sistemi üretmektir. Bazı programlar çok amaçlı olup, kesin bir şekilde suşların tanımlanmalarını sağlar [50].

Bacillus'ların tanımlanmasında geleneksel yaklaşımlar 1.6.1. bölümde bahsedildiği gibi 3 morfolojik gruba dayanmaktadır. İlk olarak bir izolat bu gruplardan birine ayrıldığında ikinci olarak fizyolojik ve biyokimyasal test panelleri kullanılarak tür

seviyesinde tanımlaması yapılır. Bu sistem kullanışlı olmasına rağmen spor morfolojilerini göz ardı eder [54]. Bu da tanımlamayı artıran testlerin sayısını artırmayı gerektirir.

Bir cins içerisindeki tür sayısının artması bilgisayarlı tanımlama sistemlerinin gelişmesini sağlamıştır. Berkeley ve arkadaşları 1984'te API50CH testini fazla sayıdaki suşları karakterize etmek için kullanmıştır. Bu test paneli nişasta ve kazein hidrolizi, şekerlerden asit üretimi gibi bilinen fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirler. Bu sistemle *Bacillus* izolatlarının yaklaşık %50'si rutin olarak tanımlanabilir.

Bacillus suşlarının tanımlanmasında mevcut çeşitli kemotaksonomik yaklaşımlar arasında piroliz kütle spektrometrisi yer alır [55]. Piroliz, bir örneğin yüksek sıcaklıkta havasız bir ortamda moleküllerine ayrılarak buharlaşmasını sağlayan bir işlemdir. Daha sonra oluşan fragmentler kütlelerine göre ayrılır. Bu fragmentler kütle spektrumlarında veya kütüphanelerde çok değişkenli istatistikler kullanılarak tanımlamaları yapılır. Bu işlem çoğaltabilme eksikliğinden yoksundur ve uzun bir hazırlanma periyoduna sahiptir. Ancak bir petriden alınan koloniler için örnek başına sadece birkaç dakika süren çok hızlı bir işlemdir, bu yüzden standartlar hızlı bir şekilde tanımlama yapar ve kütüphanelerin hazırlanma süreci göz ardı edilir. Bu yaklaşım özel *Bacillus* türlerinin hızlı bir şekilde tanımlamasına katkıda bulunur [50].

Bacillus'ların tanımlanmasında ikinci kemotaksonomik yaklaşım yağ asidi kompozisyonlarına dayanır. Hücresel yağ asitlerinin metil esterlerinin gaz kromatografi analizi kullanılarak yapılan mikrobiyal tanımlama sistemi Hewlett-Packard tarafından bulunmuştur. Bir profilin oluşturulması yaklaşık 60-90 dakika sürer ve oluşturulan bu profil *Bacillus* türlerine ait kütüphanedeki profillerle karşılaştırılır. Bu yaklaşım son zamanlarda sivrisinekler için patojen olan *B. sphaericus* suşlarının tanımlanmasında başarıyla kullanılmaktadır [56].

1.7. Biyolojik Mücadelede Kullanılan *Bacillus* Türleri

Günümüzde böceklerle biyolojik mücadelede birçok mikroorganizma kullanılmaktadır. Şimdiye kadar 100'den daha fazla bakteri türü böcek patojeni olarak tanımlanmasına rağmen, yalnızca *Bacillus* türleri kontrol ajanı olarak ticari bakımdan tercih edilmektedir [12].

Biyolojik mücadelede biyoinsektisit olarak kullanılan mikroorganizmaların çoğunu *B. thuringiensis* oluşturmaktadır ve birçok böcek türüne karşı başarılı bir şekilde

kullanılmaktadır. *B. thuringiensis*'in çok sayıda varyetesi vardır. *B. thuringiensis*'den hazırlanan karışımların uygulandığı böcekler, bu karışımların içerdiği toksinler sayesinde ölürlür.

1.7.1. *Bacillus thuringiensis*'in Genel Özellikleri

B. thuringiensis, Gram pozitif, çubuk şekilli, aerobik, hareketli ve spor formu oluşturabilen bir bakteridir. Vejetatif hücreleri yaklaşık 1 µm genişliğinde ve 5 µm uzunluğundadır [57]. *B. thuringiensis* Bacillaceae familyasına ait *B. cereus* grubunda yer almaktadır.

B. thuringiensis'in spesifik biyoaktivitesi Cry proteinleri olarak bilinen polipeptidlerden oluşmuş kristallerin üretilmesiyle gerçekleşir. Farklı suşları Diptera, Lepidoptera ve Coleoptera takımındaki böcekler üzerinde toksik etki gösterir [58]. Ayrıca bazı suşlarının da nematod, protozoa ve Hymenoptera takımındaki böceklere, akar ve yassı solucan gibi canlılara karşı etkili olduğu belirlenmiştir [59, 60, 61].

1.7.2. *Bacillus thuringiensis*'in Tarihçesi

B. thuringiensis ilk kez 1901 yılında Japon bakteriyolog S. Ishiwata tarafından hastalıklı ipek böceği larvalarından izole edilmiştir. 1911'de ise E. Berliner tarafından tanımlaması yapılmıştır. 1916 yılında Aoki ve Chigasaki tarafından spor kültürlerindeki proteinin toksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur [62]. 1953 yılında Hannay *B. thuringiensis*'in spor morfolojisini ve parasporal yapı olarak adlandırılan inklüzyon yapılarını açıklamıştır. Ayrıca parasporal yapının böcek toksitesi ile ilgili olduğunu göstermiştir.

B. thuringiensis 1920 yılında çiftçiler tarafından pestisit olarak kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra 1938 yılında Fransa Sporin adı verilen ticari spor formülasyonlarını yapmaya başlamıştır [63].

1.7.3. *Bacillus thuringiensis*'in Habitatları

B. thuringiensis suşları genellikle topraktan, böceklerden, depolanmış ürünlerden ve kozalaklı ağaçların yapraklarından izole edilebilir [64]. Birçok *B. thuringiensis* suşu ölü böceklerden izole edilmiş ve çoğu durumda aynı böceğe karşı toksik aktivite göstermiştir. Enfekte olan böcek larvası öldüğünde, ölü böcek vücutları kristal ve spor içerirler [65, 66, 67, 68].

1.7.4. *Bacillus thuringiensis*'in Plazmitleri

B. thuringiensis suşlarının genomu yaklaşık 2,4-5,7 milyon baz çifti uzunluğundadır [69]. *B. thuringiensis* 2-11 tane plazmit içermektedir [70]. Bu plazmitlerin büyüklükleri 2 ile 272 kb arasında değişmektedir [71]. İnsektisidal proteinleri kodlayan genler plazmitler üzerinde yer almaktadır [72]. Büyük ve küçük plazmitler üzerinde bulunan *cry* genlerinin etrafında çok sayıda hareketli bölgeler bulunmaktadır [73]. Bu plazmitler konjugasyon benzeri mekanizmalar ile taşınabilirler.

İncelenen bütün *B. thuringiensis* türlerinde plazmit bulunmaktadır. Ancak 1981 yılında Lecadet ve arkadaşları *B. thuringiensis* subsp. *finitimus*'da plazmit tespit edememişlerdir. Ancak bu araştırmacılar plazmiti tespit edememelerinin sebebini kullanılan yöntemler yüzünden olduğunu rapor etmişlerdir. *B. thuringiensis* subsp. *finitimus*'un diğer suşlarında plazmitlerin varlığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [74].

B. thuringiensis suşlarından moleküler ağırlığı büyük olan plazmitleri izole etmedeki başarısızlığın kullanılan yöntemlerin yetersizliği yüzünden olduğu düşünülmektedir. Büyük moleküler ağırlıklı plazmit DNA'sı izole etmek için tasarlanan çoğu yöntem *B. thuringiensis*'de çalışmamaktadır [70].

1.7.5. *Bacillus thuringiensis*'in Alt Türlerinin Sınıflandırılması

B. thuringiensis'in ayırt edilmesinde konak seçiciliği, alt türleri belirleyen H-serovarları ve *cry* genleri kullanılmaktadır. Son yıllarda alt türleri karakterize etmek için DNA parmak izi yöntemi de kullanılmaktadır [75].

Kullanılan fenotipik yöntemlerden birisi olan H-serotiplenme, *B. thuringiensis* izolatlarının sınıflandırılmasında önemli bir yöntemdir. Bu yöntem de Barjac ve Bonnefoi (1962) tarafından geliştirilmiş ve o zamandan beri kullanılmaktadır [76].

Serotip ile sınıflandırma morfolojik ve biyokimyasal kriterler ile desteklenmektedir [77]. 1977 yılına kadar, sadece 13 *B. thuringiensis* alttürü tanımlanmıştır ve bunların da Lepidoptera larvalarına karşı toksik olduğu bulunmuştur. Daha sonra Dipteralara [78], Coleopteralara [79] ve nematodlara [80] karşı toksik olan diğer alttürlerin keşfi *B. thuringiensis* alttürlerinin sayısını artırmıştır. 1998 verilerine göre flagella H-serovarlarına bakılarak yapılan sınıflandırmada 67'den fazla *B. thuringiensis* alttürü tanımlanmıştır (Tablo 1). Serovarların mevcut listesi Paris'deki Pasteur Enstitüsü'nden elde edilebilmektedir (Unite des Bacteries Entomopathogenes, Institut Pasteur, Paris, France).

Tablo 1. *B. thuringiensis*'lerin flagella H-serovarlarına göre sınıflandırılması

Flagella antijenleri	<i>B. thuringiensis</i> subsp.	Flagella antijenleri	<i>B. thuringiensis</i> subsp.
1	<i>thuringiensis</i>	28a, 28c	<i>jegathesan</i>
2	<i>finitimus</i>	29	<i>amagiensis</i>
3a, 3c	<i>aletsi</i>	30	<i>medellin</i>
3a, 3b, 3c	<i>kurstaki</i>	31	<i>toguchini</i>
3a, 3d	<i>sumiyoshiensis</i>	32	<i>cameroun</i>
3a, 3d, 3e	<i>fukuokaensis</i>	33	<i>leesis</i>
4a, 4b	<i>sotto</i>	34	<i>konkuian</i>
4a, 4c	<i>kenyae</i>	35	<i>seoulensis</i>
5a, 5c	<i>galleriae</i>	36	<i>malaysiensis</i>
5a, 5c	<i>canadensis</i>	37	<i>anadalousiensis</i>
6	<i>entomocidus</i>	38	<i>oswaldocruzi</i>
7	<i>aizawai</i>	39	<i>brasiliensis</i>
8a, 8b	<i>morrisoni</i>	40	<i>huazhongensis</i>
8a, 8c	<i>ostriniae</i>	41	<i>sooncheon</i>
8b, 8d	<i>nigeriensis</i>	42	<i>jinghongiensis</i>
9	<i>tolworthi</i>	43	<i>guiyanguesbus</i>
10a, 10b	<i>darmstadiensis</i>	44	<i>higo</i>
10a, 10c	<i>londrina</i>	45	<i>roskildiensis</i>
11a, 11b	<i>toumanoffi</i>	46	<i>chanpasis</i>

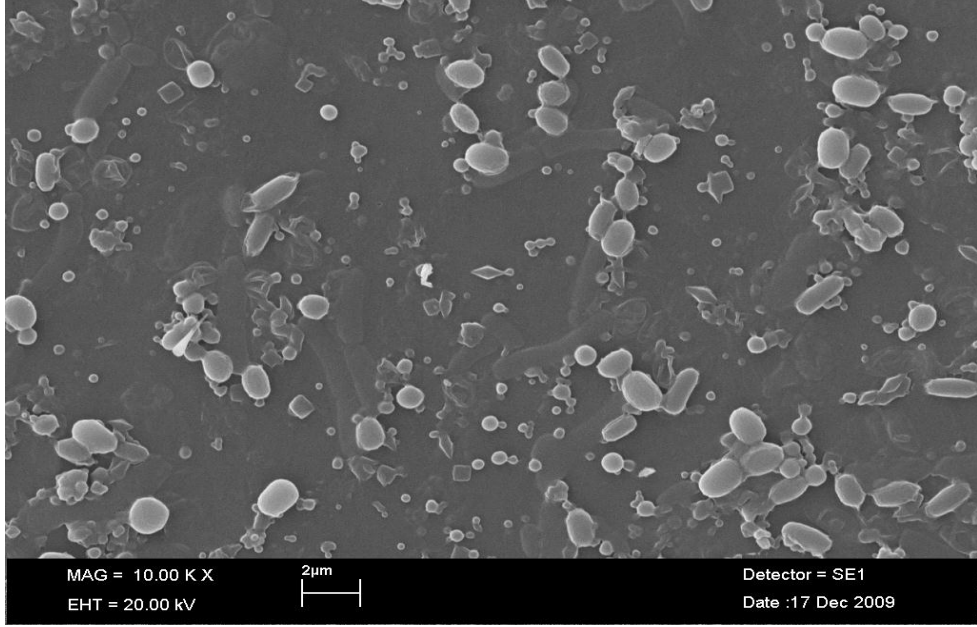
Tablo 1'in devamı

11a, 11c	<i>kyushuensis</i>	47	<i>wratislaviensis</i>
12	<i>thompsoni</i>	48	<i>balearica</i>
13	<i>pakistani</i>	49	<i>muju</i>
14	<i>israelensis</i>	50	<i>navarrensis</i>
15	<i>dakota</i>	51	<i>xiaguangiensis</i>
16	<i>indiana</i>	52	<i>kim</i>
17	<i>tohokuensis</i>	53	<i>asturiensis</i>
18a, 18b	<i>kumamotoensis</i>	54	<i>poloniensis</i>
18, 18c	<i>yosoo</i>	55	<i>palmanyolensis</i>
19	<i>tochigiensis</i>	56	<i>rongseni</i>
20a, 20b	<i>yunnanensis</i>	57	<i>pirenaica</i>
20a, 20c	<i>pondicheriensis</i>	58	<i>argentinensis</i>
21	<i>colmeri</i>	59	<i>iberica</i>
22	<i>shandongiensis</i>	60	<i>pingluensis</i>
23	<i>japonensis</i>	61	<i>sylvestriensis</i>
24a, 24b	<i>neoleonensis</i>	62	<i>zhaodongensis</i>
24a, 24c	<i>novosibirsk</i>	63	<i>bolivia</i>
25	<i>coreanensis</i>	64	<i>azorensis</i>
26	<i>silo</i>	65	<i>pulsiensis</i>
27	<i>mexicanensis</i>	66	<i>gracioensis</i>
28a, 28b	<i>monterrey</i>	67	<i>vazensis</i>

1.7.6. *Bacillus thuringiensis*'in İnsektisidal Proteinleri

B. thuringiensis'in gelişiminde durgun faz boyunca insektisidal kristal protein (ICP) içeren kristal yapıda parasporal inklüzyonlar üretilir. δ -Endotoksin olarak da adlandırılan bu proteinler birçok böcek türüne karşı seçici toksik etki gösteren inaktif protoksinlerdir [81, 82]. Bu toksinler çoğunlukla *B. thuringiensis*'e özgüdür, ancak bu proteinlerin *B. popillae*, *B. sphaericus* ve *Clostridium bifermantas* gibi diğer bakterilerde de üretilebildiği belirlenmiştir [82]. Bir alttür birden fazla ICP sentezleyebilir. ICP'lerin bipiramidal (baklava dilimi), kübik, düz, iki veya daha fazla kristalin bir arada bulunduğu karışık tipte şekilleri bulunabilir (Şekil 2). Baklava dilimli kristaller daha çok Lepidoptera larvalarına

karşı aktif iken, kübik ve yuvarlak yapılı kristaller hem Lepidoptera hem de Diptera larvalarına karşı toksik etki göstermektedirler [83].



Şekil 2. Spor ve kristal proteinlerin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü [6].

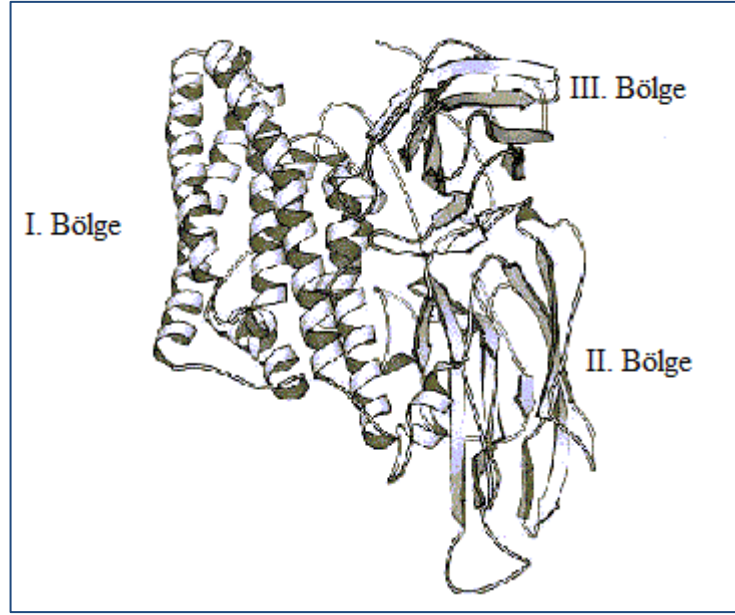
Farklı toksinlerin birlikte uygulanması sinerjistik ölüm etkisi gösterebilir. Ayrıca Cry toksinlerinin *B. thuringiensis* sporları ile birlikte uygulanması bazı böcek türleri üzerinde sinerjistik etki gösterebilir. Bu toksinler normal bir sindirim sisteminde çözünmezler. Bu nedenle insanlara, diğer memelilere ve birçok böcek türüne karşı toksik etki göstermez. ICP'ler yüksek pH (>9,5) değerlerinde kolayca çözünür. Duyarlı böceklerin orta bağırsağındaki yüksek pH ortamı ve taşıdıkları enzimler protoksini aktif toksine dönüştürür. Bu nedenle *B. thuringiensis* oldukça spesifik bir entomopatojen ajandır. Konukçu duyarlılığı ve toksisite ICP'nin farklı bölgelerince belirlenir. Bu toksinler güneş ışınlarına duyarlıdır ve etkileri kısa sürede kaybolur. *B. thuringiensis* sporları UV ışığına maruz kaldığında inaktif hale geçer. ICP'lerin doğal ortamdaki yarı ömrü yaklaşık 10 gündür. Vejetatif hücreler ve sporlar doğal ortamda yıllarca kalabilir [81].

Ticari olarak kullanılan *B. thuringiensis* ürünleri çevreye ve insanlara zararlı olan bileşikler içermezler. *B. thuringiensis* suşları Cry ve Cyt proteinlerinin dışında vejetatif büyüme süresince β -ekzotoksin, fosfolipazlar, proteazlar, kitinazlar, vejetatif insektisidal proteinler (Vip) ve antifungal bileşikler oluştururlar [84].

Cry proteinlerini kodlayan *cry* genleri genellikle büyük taşınabilir plazmitlerde veya nadiren kromozomda bulunur. Cry proteinlerinin sentezi ve spor oluşumu kendiliğinden olur ama bu genlerin ekspresyonu sporulasyona bağlıdır [85]. *cry* genlerinin farklı kombinasyonları farklı *B. thuringiensis* suşlarında bulunur [71]. Suşlar arasında bu genlerin dağılımı *cry* genleriyle bağlantılı değişebilen elementlerin sayesinde gerçekleşebilir. Bu yüzden aynı toksinin neden *B. thuringiensis*'in farklı serotiplerinde bulunduğunu açıklamak mümkün olabilir. Birkaç çalışma bu genlerin konjugasyonla transferinin böceklerde çok yaygın [86, 87, 88], steril toprak örneklerinde daha az yaygın [89] ve steril topraklarda ise yaygın olmadığını göstermiştir [90].

Cry gen dizileri, bilinen *B. thuringiensis* suşlarının hibridizasyonla görüntülenebilmesi için spesifik problemlerin oluşturabilmesini sağlar. Aynı zamanda yine bu diziler bilinen nükleotit dizilerinin varlığını belirlemek ve yeni *B. thuringiensis* izolatlarında Cry proteinlerinin karakterize edilmesi için PCR'a dayalı metodolojilerin uygulanmasını sağlar [91, 92]. *cry* genlerinin bu hızlı tanımlanması, bilinen *cry* genlerinin sayısında bir artışa neden olur.

Cry proteinlerinin büyüklüğü 40-140 kDa arasındadır ve 3 bölgeyle karakterize edilen 3 boyutlu bir yapıdan oluşur. Cry proteinlerinin 3 boyutlu tersiyer yapısı X-ışınları kristallografisi ile belirlenmiştir (Şekil 3). I. bölge, 7 α -heliksin bir araya gelmesiyle oluşmuştur ve hedef böceğin bağırsak epitelinde litik porların oluşmasından sorumludur. II. bölge, β tabakalarından (sheets) ve düğümlerden oluşmuştur ve proteinin reseptöre bağlanmasında görevlidir. III. bölge, β -sandviç (sandwich) yapısındadır ve toksin molekülünün biyokimyasında birkaç anahtar role sahiptir [82].



Şekil 3. Cry proteinlerinin 3 boyutlu yapısı [93].

Kristal (*cry*) genleri tarafından kodlanan insektisidal kristal protein (ICP)'lerinin etkili olduğu takımlar Tablo 2'de gösterilmiştir. Ayrı bir sınıflandırma, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ICP'de ve bazı diğer *B. thuringiensis* alttürlerinde bulunan özgün olmayan sitolitik bir faktörü kodlayan sitolitik (*cyt*) genler için kullanılmaktadır.

Tablo 2. *B. thuringiensis cry* genleri ve Cry proteinlerinin etkili olduğu böcek takımları [45].

Gen	Protein	Alttür	Etkili Olduğu Takım
<i>cryI</i>	CryI	<i>kurstaki</i> (HD-1), <i>aizawai</i> , <i>sotto</i>	Lepidoptera
<i>cryII</i>	CryII	<i>kurstaki</i> (HD-1), <i>kurstaki</i> (HD-263)	Lepidoptera, Diptera
<i>cryIII A</i>	CryIII A	<i>tenebrionis</i> , <i>morrisoni</i>	Coleoptera
<i>cryIII B</i>	CryIII B	<i>japonensis</i>	Coleoptera
<i>cryIV</i>	CryIV	<i>israelensis</i>	Diptera
<i>cryV</i>	CryV	<i>kurstaki</i> (DSIR732)	Coleoptera, Lepidoptera

27-29 kDa boyutundaki Cyt toksinleri birçok böcek ve memeli hücresinde *in vitro* sitolitik aktivite göstermesine rağmen Diptera larvalarına karşı sadece *in vivo* olarak aktivite göstermektedir [45]. Bu proteinlerin yapısal özellikleri Cry toksinlerine göre oldukça farklıdır [94, 95].

Cry proteinlerine ek olarak bazı *B. thuringiensis* suşları diğer insektisidal proteinleri üretir. β -Ekzotoksinler bazı *B. thuringiensis* alttürleri (*darmstadiensis*, *galleria*, *tenebrionis* ve *thuringiensis*) tarafından üretilir. Ekzotoksin adenin, glikoz ve allerik asitten oluşan sabit ısılı bir nükleotit kompozisyonudur. ATP ile rekabet ederek RNA polimerazları inhibe eder [96]. RNA sentezi yaşam için önemli bir aşama olduğundan, β -ekzotoksin test edilen hemen hemen bütün organizmalarda toksiktir. Böylece β -ekzotoksin içeren *B. thuringiensis* ürünleri bazı ülkelerde karasineklerin (*Musca domestica*) kontrolünde kullanılır ama günümüzde β -ekzotoksinin diğer amaçlar için kullanımı yasaklanmıştır [97].

Vejetatif insektisidal protein (Vip) bazı *B. thuringiensis* suşlarının kültür ortamlarında tanımlanmıştır [98]. Toksin ailesi olarak Vip proteinleri Cry proteinlerine benzerlik göstermez. İlk vip genleri vip3Aa1 ve vip3Aa2 olarak tanımlanmıştır. Vip proteinleri duyarlı böceklere karşı Cry proteinleri ile aynı toksisiteye sahiptir. Vip proteinlerinin insektisidal spektrumu coleopteran (Vip1 ve Vip2) ve lepidopteranları (Vip3) içerir [98, 99, 100].

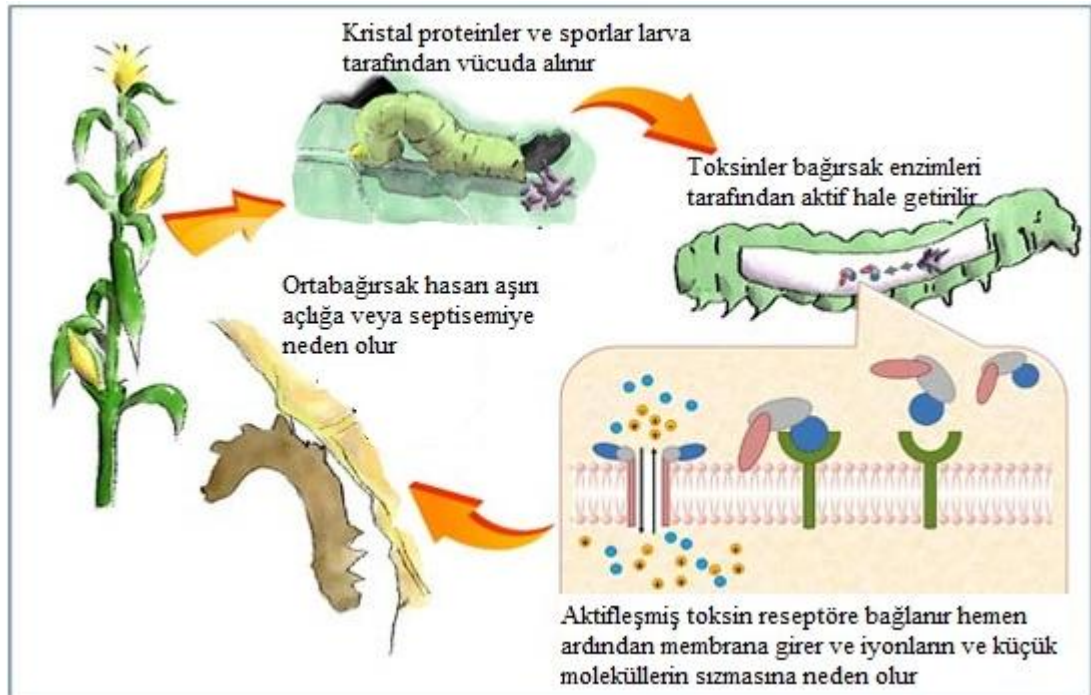
1.7.7. *Bacillus thuringiensis*'in Hedef Böceklerdeki Etki Mekanizması

B. thuringiensis'in biyolojik aktivitesi Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera gruplarındaki hassas böceklere karşı cry genlerinin oluşturduğu aktif ICP'ler sayesinde. ICP'nin etkili olabilmesi için sindirilmesi gerekmektedir [101]. Diğer böcek gruplarına (Hymenoptera, Homoptera, Dictyoptera, Mallophaga), nematodlara (Strongylida, Tylenchida), kenelere (Acari), yassı kurtlara (Digenea) ve protozoalara (Diplomonadida) karşı aktivitede buldukları tespit edilmiştir [102, 103].

B. thuringiensis'in larvalar üzerinde sebep olduğu belirtiler; yavaş hareket etme, beslenmeyi bırakma, sıvı halde dışkı çıkarma, kusma ve vücut içeriklerinin kahverengiden siyaha dönüşmesi olarak sayılabilir [104].

Cry proteinlerinin etki mekanizması şu şekilde özetlenebilir: İlk önce böcek bağırsağında inaktif protoksin halinde olan kristal çözünür ve Cry protein

monomerlerindeki sülfid bağlarının yıkılması başlar. Daha sonra bağırsak proteazları tarafından protoksinin proteolitik sindirimi gerçekleşir ve aktif Cry toksini açığa çıkar. Aktif toksin duyarlı böceklerin bağırsak mikrovilluslarının fırça kenarlı apikal bölgelerindeki spesifik reseptörlere bağlanır. Bir sonraki adım, toksinin apikal membrana girmesini ve iyon kanalları veya porları oluşturmasını içerir. Bu kanalların veya porların oluşması hücre bileşiklerinin dışa çıkmasıyla sonuçlanır ve bu durumu takiben böceğin ölümü gerçekleşir [82].



Şekil 4. Kristal proteinlerin etki mekanizması [105].

Cyt toksinler ise protein reseptörlerine bağlanmazlar ve doğrudan zar lipitleri ile etkileşime girerek zardan içeri girer ve por oluştururlar [106] ya da deterjan benzeri maddelerle etkileşime girerek zar yapısını bozarlar [107].

1.7.8. *Bacillus thuringiensis* Toksinlerine Karşı Böcek Direnci

Hedef böcek zararlılarının kimyasal insektisitlere karşı direnç geliştirmesi önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Zararlıların *B. thuringiensis* toksinlerine karşı direnç geliştirmelerinin oldukça zor olduğu düşünülmüş, fakat 1980'li yıllarda hem laboratuvar hem de doğal ortamdan elde edilen birçok böcek türünün *B. thuringiensis* toksinlerine karşı

farklı seviyede direnç geliştirdiği görülmüştür [108, 109]. Kuru meyve güvesi *Plodia interpunctella* bu toksinlere karşı direnç geliştiren zararlılardan biridir [110]. *B. thuringiensis* δ -endotoksinlerinin larva orta bağırsak hücrelerindeki özel reseptörlere bağlanmasıyla oluşan değişikliklerin bir tür direnç mekanizması olduğu belirtilmiştir [111]. Van Rie ve ark. hedef böcek reseptörlerinin Cry1Ab proteinlerine bağlanmada 50 kat azalma göstermesiyle direnç geliştirdiklerini belirtmişlerdir [112]. Gould ve ark. *H. virescens* ile yaptıkları çalışmada popülasyonun Cry1Ac'ye karşı 50 kat, Cry1Ab'ye karşı 13 kat, Cry2Aa'ya karşı ise 53 kat direnç sağladığını göstermişlerdir [113]. Bu durum, toksin reseptör etkileşiminde görülen değişikliğin direnç mekanizması olduğunu göstermektedir. Bu özelliğin aynı zamanda bağırsak epitel hücrelerindeki özel glikoproteinlerin farklı glikozilasyonu ile de bağlantılı olduğu belirtilmiştir [114].

1.7.9. *Bacillus thuringiensis*'in Biyoteknolojik Kullanımı

B. thuringiensis biyopestisit olarak kullanılmadan önce kullanımının insan ve çevre sağlığını tehlikeye sokacak risklerin değerlendirilmesi gerekir. İngiltere'de Çevre Koruma Ajansı (USEPA) ve devlet kurumları, ticari kullanımlar için pestisitleri kayıt altına alır. Memelilerdeki etkilerini değerlendirmek için gerekli testler yapılır. Bu testler aynı zamanda kuşlara, suda yaşayan omurgalılara, omurgasızlara, bal arılarına, parazitoidlere de uygulanmaktadır. Bu toksisite testleri çevreye ve test edilen hayvanlara olumsuz etkiler göstermemiştir ve bu yüzden *B. thuringiensis* ürünlerinin biyogüvenliğinden emin olunmaktadır [47].

Kullanılabilir *B. thuringiensis* ürünleri dünyada mikrobiyal pest kontrol ajan pazarının %90'ını oluşturmaktadır. Bu ürünler özellikle lepidopteran ve coleopteran pestlerine karşı hazırlanmıştır ve pamuk, mısır, soya fasulyesi, patates, domates ve depolanmış tahıllar üzerinde kullanılır [47].

B. thuringiensis ürünlerinin ziraatta kullanımının artmasına ek olarak, 1977'de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'in keşfi sivrisineklerin (*Culex* sp.) ve karasineklerin (*Anopheles* sp.) büyük ölçekli kontrolüyle sonuçlanmıştır. Mesela, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ürünleri Almanya'da sivrisineklerin, Çin'de malaria vektörünün kontrolünde kullanılmaktadır. Ayrıca WHO karasineklerin (*Simulium damnosum*) kontrolünde 1982'den 1997'ye kadar 5 milyon litreden fazla *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ürünlerini kullanmıştır [97].

B. thuringiensis suşları, toprak örnekleri [115], böcekler ve habitatları [116], depolanmış tahıllar [117] gibi çoğu ekolojik nişlerde bulunabilir. Bu yüzden *B. thuringiensis* ürünleri böcek kontrolü için birçok ekosisteme uygulanabilir. Bir ekosisteme *B. thuringiensis* uygulamasından sonra organizma doğal mikrofloranın bir bileşeni gibi yaşamını sürdürür.

Tarım zararlılarına karşı kullanılan *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ve diğer suşlarından elde edilen ticari ürünler Tablo 3, 4 ve 5’de görülmektedir [118, 119, 120, 121].

Tablo 3. Lepidopteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan *B. thuringiensis*’ler

Ticari Adı	Firmanın Adı	<i>B. thuringiensis</i> suşları
Bactospeine	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
Biobit	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
Dipel	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
Florbac	Abbott	aizawai
Foray	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
XenTari	Abbott	aizawai
Cordalene	Agrichem	<i>kurstaki</i> HD-1
BMP 123	Becker	<i>kurstaki</i> HD263
Biobest-Bt	Biobest	<i>kurstaki</i> HD-1
Bacticide	Cequisa	<i>kurstaki</i> HD-1
Worm Wipper	Cape Fear Chemicals	<i>kurstaki</i> HD-1
Collapse	Calliope	<i>kurstaki</i> HD-1
Baturad	Cequisa	<i>kurstaki</i> HD-1
Condor	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG2348
Crymax	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG7841
Cutlass	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG2371
Lepinox	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG7826
Raven	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG2424
Ecotech Bio	Ecogen/ AgrEvo	<i>kurstaki</i> EG2371
Ecotech Pro	Ecogen/ AgrEvo	<i>kurstaki</i> EG2348
Jackpot	Ecogen/ Intrachem	<i>kurstaki</i> EG2424
Rapax	Ecogen/ Intrachem	<i>kurstaki</i> EG2348
Forwarbit	Forward International	<i>kurstaki</i> HD-1
Bio-Worm Killer	Green Light Co	<i>kurstaki</i> HD-1
Bactospeine Koppert	Koppert	<i>kurstaki</i> HD-1
Guardjet	Mycogen/ Kubota	<i>kurstaki</i> Cry1Ac
Maatch	Mycogen	<i>Kurstaki</i> Cry1Ac ve aizawai Cry1C
M/C	Mycogen	aizawai Cry1C
M-Peril	Mycogen	<i>kurstaki</i> Cry1Ac
MVP	Mycogen	<i>kurstaki</i> Cry1Ac

Tablo 3'ün devamı

Bactec BT 16	Plato Industries	<i>kurstaki</i> EG2348
Bactec BT 32	Plato Industries	<i>kurstaki</i> HD-1
Insectobiol	Samabiol	<i>kurstaki</i> HD-1
Bactosid K	Sanex	<i>kurstaki</i> HD-1
Soilserv BT	Soil Serv Inc	<i>kurstaki</i> HD-1
Agrobac	Tecomag	<i>kurstaki</i> HD-1
Able	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> M-200
Agree	Thermo Trilogy	<i>aizawai</i> GC-91
Costar	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> SA-12
Delfin	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> SA-11
Desing	Thermo Trilogy	<i>aizawai</i> GC-91
Javelin	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> SA-11
Thuricide	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> HD-1
Turex	Thermo Trilogy	<i>aizawai</i> GC-91
Vault	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> SA-11
Larvo-Bt	Troy Biosciences	<i>kurstaki</i> HD-1
Troy-Bt	Troy Biosciences	<i>kurstaki</i> HD-1
Ringer BT	Verdant Inc	<i>kurstaki</i> HD-1
Safer BT	Verdant Inc	<i>kurstaki</i> HD-1
BT 320	Wilbur Ellis Inc	<i>kurstaki</i> HD-1

Tablo 4. Dipteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan *B. thuringiensis*'ler

Ticari Adı	Firmanın Adı	<i>B. thuringiensis</i> suşu
Bactimos	Abbott	<i>B.t. israelensis</i>
Gnatrol	Abbott	<i>B.t. israelensis</i>
Skeetal	Abbott	<i>B.t. israelensis</i>
VectoBac	Abbott	<i>B.t. israelensis</i>
Acrobe	American Cyanamide	<i>B.t. israelensis</i>
Aquabac	Becker Microbiol	<i>B.t. israelensis</i>
BMP	Becker Microbiol	<i>B.t. israelensis</i>
Bactis	Caffaro	<i>B.t. israelensis</i>
BTI Granules	Clarke Mos. Cont.	<i>B.t. israelensis</i>
Prehatch SG	Meridian	<i>B.t. israelensis</i>
Vectocide	Sanex	<i>B.t. israelensis</i>
Summit Bactimus	Summit Kimyasalları	<i>B.t. israelensis</i>
Summit Mosquito Bits	Summit Kimyasalları	<i>B.t. israelensis</i>
Tekar	Thermo Trilogy	<i>B.t. israelensis</i>

Tablo 5. Coleopteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan *B. thuringiensis*'ler

Ticari Adı	Firmanın Adı	<i>B. thuringiensis</i> suşları
Ditera	Abbott	<i>B.t. tenebrionis</i>
Novodor	Abbott	<i>B.t. tenebrionis</i>
Raven	Ecogen	<i>B.t. kurstaki</i> (EG2424)
M-Trak	Mycogen	<i>B.t. tenebrionis</i> /Cry 3A
Trident	Thermo Trilogy	<i>B.t. tenebrionis</i>

B. thuringiensis toksinli ürünlerin kullanımına bir alternatif olarak *Escherichia coli*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* ve *Pseudomonas fluorescens* gibi diğer bakterilerde ve siyanobakter *Anabaena* PCC7120 gibi organizmalarda da *cry* genlerinin heterolog ekspresyonu mümkündür [122]. Bu modifiye edilmiş organizmalar konak spektrumunun artmasını veya toksinlerin hedef organizmaya ulaşmasını geliştirir.

Mikroorganizmalarda üretilenlere ilaveten birkaç *cry* geni bitkilerde de üretilmektedir. Bu çalışmalar tütünle başlayıp günümüzde yonca, pamuk, pirinç, elma, armut, mısır, brokoli, soya fasulyesi ve şeker kamışı gibi çeşitli kültür bitkilerinde de uygulanmaktadır [123].

Bitkilerde Cry proteinlerinin üretiminin birkaç avantajı vardır ve bu avantajlar dünyada tarımı kökten değiştirmektedir. Bazı bitkilerde Cry toksinleri sürekli olarak üretilir ve bitki dokularında kalır. Bu sayede diğer insektisitlerin uygulamalarının çok daha küçük miktarları kullanılır ve uygulama maliyeti azalır. Bazı bitkilerde de Cry proteinleri sadece ihtiyaç duyulduğunda ifade edilir [124]. Böylece Bt-bitkileri olarak adlandırılan bitkiler kimyasal insektisitlerden daha avantajlıdır. Bt-bitkilerinin en önemli dezavantajı Cry toksinlerine böceklerin direnç göstermeleridir. Ancak direnç gelişimini engelleyecek birkaç strateji tasarlanmaktadır [123, 125, 126].

1.8. Tezin Amacı

Günümüzde artık böceklerle mücadele de kimyasallar yerine biyolojik ajanlar tercih edilmeye başlanmıştır. Bu böceklere karşı kullanılan bakterilerden en fazla tercih edileni *Bacillus* türleridir. Etkili ve güvenilir biyolojik kontrol için bu bakterilerin özelliklerinin belirlenmesi gerekir. Bu çalışmada çok değerli *Bacillus* izolatlarının fındık ve tahıl depolarından izolasyonu ve izole edilen bakteriyal ajanların karakterizasyonlarının

yapılması amaçlanmıştır. Bu sayede depolarda zararlı böceklere karşı kullanılacak insektisidal aktivitesi yüksek mikrobiyal kontrol materyallerinin bulunması hedeflenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada Mayıs, Ekim ve Kasım 2011 tarihlerinde, Trabzon ve yöresinde bulunan Toprak Mahsulleri Ofisi'ne ve özel sektöre ait ambarlardan temin edilen ögüntü örnekleri kullanılmıştır. Çuval kenarlarından yapılan örneklemelemlerle elde edilen ögüntü örnekleri (yaklaşık 5 gr) steril kaplara konularak laboratuvara getirildi ve +4 °C'de saklandı. Örneklerin alımında fındık ve farklı tahılların (bezelye, nohut, mercimek, pirinç, buğday) bulunduğu depolar tercih edilmiştir. Elde edilen örneklerin tahıl tozları, depolanmış ürünler, böcek kadavraları ve böcek ağları gibi çeşitli artık materyalleri içerdiği tespit edilmiştir.

2.2. Örneklerden *Bacillus* Cinsine Ait Bakterilerin İzolasyonu

Her örnek 1 gr/10 ml olacak şekilde nütrient sıvı besiyeriyle süspansiyon haline getirildi. Hazırlanan süspansiyonlar iyice vortekslendikten sonra steril tülbent yardımıyla steril falkon tüplere süzöldü. Bu süzöntülerden 1,5 ml steril ependorflara alındı ve Traver ve arkadaşlarının tanımladığı gibi 80 °C'de 10 dakika pastörizasyon yapıldı [127]. Pastörizasyon işleminden sonra bakteri miktarının zenginleşmesi için 30 ml nütrient sıvı besiyeri ilave edilerek 30 °C'de 4-5 saat 200 g'de inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda örnekler 10⁻⁶'ya kadar seyreltildi ve her seyreltikten 25 µl, 50 µl ve 100 µl nütrient agar besiyeri içeren petrilere yayma ekim yapıldı. Ekimler 30 °C'de 48 saat süreyle inkübe edildi.

İnkübasyon sonucunda büyüyen koloniler binoküler mikroskop altında koloni morfolojilerine göre seçilip saf kültürleri elde edildi. Elde edilen bu kültürler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de stoklandı.

2.3. Bakteriyal İzolatların Boyama ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.3.1. Gram Boyama

Gram boyama, bakterileri hücre duvarlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre Gram pozitif ve Gram negatif olmak üzere iki büyük gruba ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglukan tabakasının kalınlığı esas alınarak uygulanır. Peptidoglukan tabaka, Gram negatif olarak boyanan bakterilerde ince, Gram pozitif olarak boyanan bakterilerde ise daha kalındır.

Gram boyama için 16-24 saatlik taze kültürler kullanıldı. Temiz lamlar üzerine bir damla serum fizyolojik su damlatıldı. Steril öze yardımıyla bir koloniden alınan örnek, suyla homojen bir şekilde dağıtılarak smear hazırlandı ve fikse edildi. Hazırlanan smear üzerine kristal viyole boyası damlatılıp 1 dakika bekletildi. İyot-lugol çözeltisi ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırıldı. Smeara tekrar iyot-lugol çözeltisi damlatılarak 1 dakika bekletilip, saf su ile yıkanarak iyot-lugol çözeltisi uzaklaştırıldı. Smearın üzerine aseton-alkol çözeltisi damlatılarak 15 - 30 saniye beklenip, saf su ile yıkandı. Son olarak karşıt boya olan safranin damlatıldı ve 40 - 50 saniye bekletildi. Smear saf su ile yıkanarak kendi halinde kurumaya bırakıldı. Kuruyan smearlar mikroskop yardımıyla incelendi. Mor renkli bakteriler Gram pozitif, pembe-kırmızı renkli bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirildi [128].

2.3.2. Endospor Boyama

Endosporlar, bazı bakterilerin uygun olmayan şartlarda oluşturdukları yapılardır. İzolatlar spor zorlayıcı besiyerine ekim yapılarak yaklaşık 48-72 saat 30 °C etüvde bekletildi. Lam üzerine yayılan kültürler açık havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smearın üzeri filtre kağıdı ile kapatılarak su buharı altında malaşit yeşili ile 5-10 dakika boyandı ve saf su ile yıkandı. Daha sonra 30-60 saniye safranin ile boyanıp tekrar saf su ile yıkandı. Açık havada kurutulduktan sonra mikroskop altında incelendi. Kırmızı-pembe renkli hücreler içerisinde yeşil renkli sporların varlığı araştırıldı [128].

2.4. Bakteriyal İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.4.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi

İzolatların büyüebildiği minimum ve maksimum pH değerlerini belirleyebilmek için izolatlar farklı pH değerlerine (5-12) sahip 3 ml nütrient sıvı besiyerine inoküle edildi ve 30 °C'de 48 saat 200 g'de inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon sonucunda üreme olup olmadığı spektrofotometrede OD₆₀₀'de ölçümler yapılarak belirlendi.

2.4.2. Optimum NaCl İhtiyaçlarının Belirlenmesi

İzolatlar, NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla % 5, 9, 11, 13 ve 15 oranlarında NaCl içeren 4 ml nütrient sıvı besiyerine inoküle edildi. 30 °C'de 48 saat 200 g'de inkübasyondan sonra hangi oranda tuz ihtiva eden besiyerinde üreme olmuş ise o orandaki tuzda izolatların üreyebildiği sonucuna varıldı [129].

2.4.3. Nişasta Hidroliz Testi

İzolatların nişastayı hidroliz edip etmediklerini belirlemek amacıyla nişasta agara çizgi ekim yapılarak 30 °C etüvde 48 saat bekletildi. İnkübasyondan sonra petrideki bakterilerin üzerine lügol ilave edilerek renk değişimi gözlemlendi. Koyu kahverenginin oluşumu nişastanın hidroliz olduğunu, mavi rengin oluşumu ise nişastanın hidroliz olmadığını gösterdi [130].

2.4.4. Katalaz Testi

Mikroorganizmalar aerobik solunum sırasında hidrojen peroksit (H₂O₂) ve bazen de toksik olan süperoksitleri üretmektedirler. Böylece bu ürünlerin zararlı etkisinden kurtulmak için bu maddeleri yıkan katalaz ve peroksidaz enzimlerini üretirler. İzolatların Katalaz enzimini üretilip üretilmediğini belirlemek için triptik soy agar besiyeri hazırlanarak bu besiyerine ekim yapıldı. 30 °C etüvde 48 saat inkübasyondan sonra petrideki

bakterilerin üzerine % 3'lük H₂O₂ çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz kabarcıkları pozitif sonuç olarak değerlendirildi [128].

2.4.5. Oksidaz Testi

Mikroorganizmalarda sitokrom oksidazın varlığının belirlenmesi için kullanılır. Oksidaz testi için Microbiology Bactident Oxidase (Merck) stripleri kullanıldı. İzolatlar triptik soy agar besiyerinde çizgi ekim yapıldı ve 30 °C etüvde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra steril kürdan yardımıyla alınan tek koloni strip üzerinde uygulama bölgesine emdirildi. 20-60 saniye renk değişimi gözlemlendi. Oluşan mavi-mor renk pozitif sonuç olarak kaydedildi.

2.4.6. API Test Kitleri ile Bakteriyal İzolatların Tanımlanması

API Test Kitleri, minyatür hale getirilmiş biyokimyasal testlerden oluşan ve veri tabanı kullanılarak değerlendirilen bir sistemdir. Gram pozitif çubuk şekilli olan bakterilerin tür seviyesinde tanımlanmaları için API20E ve API50CHB (bioMérieux, France) test kitleri kullanıldı.

2.4.6.1. API50CHB Test Kiti

API50CH, mikroorganizmaların karbonhidrat metabolizmasının çalışmasını sağlayan 49 biyokimyasal testten oluşan bir tanımlama sistemidir. Bu kit, Enterobacteriaceae ve Vibrionaceae ilgili türleri ile *Bacillus* türleri için API50CHB/E Medium ile kullanılır.

Örnekler triptik soy agar besiyerine ekildi ve 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra steril bir spatula yardımıyla alınan koloni "API 50CHB/E Medium" besiyerine aktararak süspansiyon haline getirildi. İnkübasyon kutuları (tepsi ve kapak) hazırlandı. Tepsi kuyucuklarına nemli atmosfer yaratmak için 10 ml steril saf su koyuldu ve tepsi kenarına izolat numarası yazıldı. API50 CHB stripleri steril pens yardımıyla tepsiye alındı ve hazırlanan süspansiyon pipetör yardımıyla hava kabarcığı olmayacak ve taşmayacak şekilde tüplere dağıtıldı. 30 °C etüvde 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. 0. tüp

negatif kontrol olarak alındı ve tüplerde oluşan renk değişimi pozitif sonuç olarak okuma kağıdına kaydedildi. Veriler bilgisayar ortamına aktarılarak izolatların tür seviyesinde tanımlamaları yapıldı.

Tablo 6. API 50 CHB panel test sisteminin içerdiği testler

Test	Adı
GLY	Gliseol
ERY	Eritrol
DARA	D-arabinoz
LARA	L-arabinoz
RIB	D-riboz
DXYL	D-ksiloz
LXYL	L-ksiloz
ADO	D-adonitol
MDX	Metil- β D-ksilopiranozid
GAL	D-galaktoz
GLU	D-glukoz
FRU	D-fruktoz
MNE	D-mannoz
SBE	L-sorboz
RHA	L-ramnoz
DUL	Dulsitol
INO	İnosidol
MAN	D-mannitol
SOR	D-sorbitol
MDM	Metil- α D-mannopiranozid
MDG	Metil- α D-glukopiranozid
NAG	N-asetilglukozamin
AMY	Amigdalın
ARB	Arbutin
ESC	Eskulin-ferrik sitrat
SAL	Salisin
CEL	D-seliobioz

Tablo 6'nın devamı

MAL	D-maltoz
LAC	D-lactoz (serum)
MEL	D-melibioz
SAC	D-sakkaroz (sukroz)
TRE	D-trehaloz
INU	İnulin
MLZ	D-melezitoz
RAF	D-rafinoz
AMD	Amidon (nişasta)
GLYG	Glikojen
XLT	Ksilitol
GEN	Gentiobioz
TUR	D-turanoz
LYX	D-liksoz
TAG	D-tagatoz
DFUG	D-fukoz
LFUC	L-fukoz
DARL	D-arabitol
LARL	L-arabitol
GNT	Potasyum glukonat
2KG	Potasyum 2- ketoglukonat
5KG	Potasyum 5- ketoglukonat

2.4.6.2. API20E Test Kiti

API20E, 21 minyatür hale getirilmiş biyokimyasal test ve veri tabanı kullanan Enteriobacteriaceae ve zor üremeyen Gram negatif çomaklar için standart hale getirilmiş tanımlama sistemidir.

Örnekler bir gün önceden triptik soy agar besiyerine çizgi ekim yapıldı. 16 saat inkübasyondan sonra steril spatula yardımıyla alınan koloni “API Suspension Medium” ya da “API NaCl % 0.85” besiyerinde süspansiyon haline getirildi ve homojen bir karışım olması sağlandı. Hazırlanan tepsi kuyucuklarına nemli atmosfer sağlanması için 5 ml steril

saf su koyulup, tepsi kenarına izolot numarası yazıldı. Steril pens ile API20E stribi tepsiye yerleştirildi. Hazırlanan bakteri süspansiyonu tüplerde hava kabarcığı kalmayacak şekilde dağıtıldı. 30 °C etüvde 18-24 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında, metabolizma sonucu kendiliğinden ya da reaktiflerin eklenmesiyle oluşan renk değişimi okuma tablosuna göre değerlendirildi. Sonuçlar bilgisayar ortamında tanımlama programı kullanılarak elde edildi.

Tablo 7. API 20E test panel sisteminin içerdiği testler

Testler	Substrat	Belirlenen Reaksiyon	Negatif Sonuçlar	Pozitif Sonuçlar
ONPG	ONPG	Beta-galaktosidaz	Renksiz	Sarı
ADH	Arginin	Arginin dihidrolaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
LDC	Lisin	Lisin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
ODC	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	Sarı	Kırmızı / Turuncu
CIT	Sitrat	Sitrat kullanımı	Açık yeşil / Sarı	Mavi-Yeşil / Mavi
H₂S	Na thiosulfate	H ₂ S üretimi	Renksiz / Gri	Siyah tortu
URE	Üre	Üre hidrolizi	Sarı	Kırmızı / Turuncu
TDA	Triptofan	Deaminaz	Sarı	Kahverengi / Kırmızı
IND	Triptofan	İndol üretimi	Sarı	Kırmızı (2 dk)
VP	Na piruvat	Aseton üretimi	Renksiz	Pembe/Kırmızı (10 dk)
GEL	Kömür jelatin	Jelatinaz	Siyah tabaka dağılmamış	Siyah tabaka dağılmış
GLU	Glukoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi-Yeşil	Sarı
MAN	Mannitol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
INO	İnositol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı

Tablo 7'nin devamı

SOR	Sorbitol	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
RHA	Ramnoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
SAC	Sukroz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
MEL	Melibioz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
AMY	Amigdalın	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı
ARA	Arabinoz	Ferm. / oks.	Mavi / Mavi	Sarı

2.4.6.2.1. İzolatların MacConkey Agar (MCA)'da Büyütülmesi

API20E test sonucunun değerlendirilmesi için gereken testlerden biri olan MCA, hem seçici hem de ayırt edici bir besiyeridir. Seçici madde olarak bile tuzu ve kristal violet boyasını ihtiva eder. Bunların ikisi de Gram pozitif bakterilerin büyümelerini engeller. Ayırt edici madde olarak laktozu ve indikatör olarak da nötral kırmızı içermektedir. Eğer organizma laktozu fermentlerse koloniler kırmızı renk alır.

Bakteriyal izolatların MCA agara çizgi ekimleri yapıldı ve 16 saat inkübasyondan sonra petrilere oluşan renk değişimleri incelendi. Oluşan kırmızı-pembe renkli koloniler pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

2.4.6.2.2. API of Medium Testi

API of Medium, bakterilerin oksidatif veya fermantatif glikoz metabolizmasının belirlenmesinde kullanılan ampullerden oluşmuş bir testtir. Testin uygulanışı şu şekildedir: Ampullerin kapakları çıkartıldı ve sıcak su banyosunda yaklaşık 2 dakika bekletilerek eritildi. Dik şekilde bekletilerek oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Böylelikle katı olan besiyerinin üst yüzeyinin pürüzsüz olması sağlandı. Soğuyan besiyerine iğne uçlu steril öze kullanılarak alınan bakteri kolonilerinden ekimler yapıldı. Oksidasyon ve fermantasyon testleri olduğundan her bakteri izolatu için 2 ayrı ampule ekim yapıldı ve fermantasyon testi için ekimden sonra besiyerinin üzeri 1 cm mineral yağ ile kaplandı. 30 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı ve sonuçlar kaydedildi. Sarı renk görünümü pozitif asidifikasyon olarak, yeşil ve mavi renkler negatif sonuç olarak kaydedildi.

2.4.6.2.3. API M Medium Testi

API M Medium ampüllerden oluşan bir hareket testidir. Hareket testi, bakterilerin tanımlanmasında sıklıkla kullanılan rutin testlerden biridir. Testin uygulanışı şu şekildedir: Ampullerin kapakları çıkartıldı ve sıcak su banyosunda yaklaşık 2 dakika bekletilerek eritildi. Dik şekilde bekletilerek oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğuyan besiyerine iğne uçlu steril öze kullanılarak alınan bakteri kolonilerinden ekimler yapıldı. 30 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı ve sonuçlar kaydedildi. Hareketli suşlar inoküle edilen bölgenin çevresine göç ederek besiyerini bulanık hale getirir.

API of Medium ve API M Medium testleri API 20E testinin tamamlayıcılarındandır.

2.5. Bakteriyal İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

2.5.1. Genomik DNA İzolasyonu

Bakteriler bir gece önceden 3 ml Leura-Bertani (LB) sıvı besiyerine ekim yapılarak 30 °C’de inkübasyona bırakıldı. İzolasyon için DNA izolasyon kiti (Promega- Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System) kullanıldı. İnkübasyondan sonra ependorf içine alınan kültürler 14.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı uzaklaştırılan tüpler içerisine 480 µl 0.5M EDTA ilave edilip, vortekslendi. Çözünen pelletin üzerine 120 µl 10 mg/ml lizozim ilave edildi. 37 °C’de 1 saat bekletildi. Daha sonra 14.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 600 µl “Nuclei Lysis Solution” eklenip karıştırıldı. 80 °C’de 5 dakika bekletilip soğutuldu. 3 µl “20 mg/ml RNase Solution” ilave edilip tüpler 2-5 kez alt üst edildikten sonra 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Oda sıcaklığına geldiğinde tüplere 200 µl “Protein Precipitation Solution” ilave edildi. 20 saniye vortekslendikten sonra 30 dakika buzda bekletilip 14.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant boş ependorflara alınıp, pellet atıldı. Süpernatantlara 600 µl izopropanol ilave edildi ve pellet oluşuncaya kadar alt üst edildi. 14.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. 600 µl etanol ilave edilip, alt üst edildi. 14.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra etanolün iyice uzaklaşması için pellet açık havada kurumaya bırakıldı. Son olarak pellet 100 µl “DNA Rehidration Solution”da çözüldü ve 65 °C’de 1 saat bekletildi. 4 °C’de muhafaza edildi.

2.5.2. 16S rDNA Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Genomik DNA'ları izole edilen bakteriyal izolatların 16S rDNA dizileri, 5'- ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA-3'(geri) ve 5' - ATG GTA CCG TGT GTG ACG GGC GGT GTG TA-3' (ileri) primer dizileri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı. PCR işleminde i-Taq DNA Polymerase (İntron) enzimi kullanıldı. Enzim koşullarına göre reaksiyon ve program Tablo 8'deki gibi oluşturuldu. Çoğaltma işlemi 200 µl'lik tüplerde "Bio-Rad Thermal Cycler" da gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl'si 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi.

Tablo 8. PCR reaksiyonu ve programı

PCR Döngüsü		Sıcaklık	PCR ürününün büyüklüğü		
			100-500bp	500-1000bp	1Kb-5Kb
Başlangıç Denatürasyonu		94 °C	2 dakika	2 dakika	2 dakika
30-40 Döngü	Denatürasyon	94 °C	20 saniye	20 saniye	20 saniye
	Bağlanma	50-65 °C	10 saniye	10 saniye	20 saniye
	Uzama	65-72 °C	20-30 saniye	40-50 saniye	1 dakika/Kb
Son Uzama		72 °C		2-5 dakika	

2.5.3. 16S rDNA Gen Bölgesinin pGEM-T Vektörüne Klonlanması

PCR yöntemi ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgeleri pGEM-T Easy Vector System (Promega)'i kullanılarak pGEM-T vektörüne klonlandı. Reaksiyon, 10 µl 2X Rapid Ligation Buffer, 8 µl Inset DNA, 1 µl pGEM-T Easy Vector ve 1µl T4 DNA Ligase olacak şekilde oluşturuldu ve 16 °C'de en az 16 saat bekletildi. Daha sonraki işlemlerde kullanmak üzere 4 °C'de saklandı.

2.5.4. Kompetent Hücre Hazırlanması

Bir gün önceden petriye ekilmiş *Escherichia coli* JM101 suşundan 3 ml Leura-Bertani (LB) besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de gece boyunca büyümeye bırakıldı. Hücrelerin yoğunluğu 600 nm dalga boyunda 0,1 olacak şekilde 30 ml LB besiyerine aşılandı. Hücreler, 37 °C'de en az 1 saat, 600 nm dalga boyunda 0,45-0,55 arasında olana kadar inkübasyona bırakıldı. İstenilen yoğunluk elde edildiğinde süspansiyonun tamamı steril falkon tüpe boşaltıldı ve soğutmalı santrifüjde 4 °C'de 4.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 10 ml 100 mM'lık soğuk CaCl₂ ile çözdürüldükten sonra 30 dakika buzda bekletildi. Daha sonra tekrar 4 °C'de 4.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 2 ml 100 mM'lık soğuk CaCl₂ ile çözdürüldü. Hazırlanan kompetent hücre 4 °C'de en az 2 saat bekledikten sonra kullanıldı.

2.5.5. 16S rDNA Gen Bölgesinin Kompetent *E. coli* JM101'e Aktarımı

Steril ependorfa 200 µl kompetent hücre ve 3-4 µl ligasyon ürününden koyulup 30 dakika buzda bekletildi. Daha sonra 46 °C'de 2 dakika ısıyla muamele edildikten sonra 1 ml LB sıvı besiyeri ilave edilip, 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinden sonra 6.000 g'de 3 dakika santrifüj edildi. Yaklaşık 50 µl kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet dikkatlice çözdürüldü. LB^{Amp} agar besiyerine 40 µl X-Gal (40 mg/ml), 40 µl IPTG (24 mg/ml) ve transform olmuş hücre yayma ekim yapıldı. 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra içerisine plazmid alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçildi.

2.5.6. Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz (*EcoRI*) ile Muamelesi

Transformasyon sonucunda petri üzerinde oluşan mavi/beyaz koloni rengine göre seçilen beyaz kolonilerden, içerdikleri plazmid DNA'larını izole etmek için LB^{Amp} sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyu inkübe edildi. Plazmid DNA'larının izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 14.000

rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant geride 50 µl kalacak şekilde uzaklaştırıldı ve pellet çözününceye kadar vortekslendi. Üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1 N NaOH, % 0.5 SDS) ilave edildi. 4-5 kez alt üst edilen tüpe 150 µl 3M Sodyum Asetat pH 5.2 koyuldu. Tekrar alt üst edilen tüp 10-15 dakika buzda bekletildi. Daha sonra 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada süpernatant boş ependorfa alınarak üzerine 900 µl % 96'lık etanol ilave edilip, 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra % 70'lik etanol ilave edildi ve 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Etanolün iyice uçması için açık havada bekletildi. Son olarak pellet 30 µl TE tamponuyla çözüldü ve yürütme işleminde görüntünün daha net görünmesini sağlamak için 3 µl RNaz ilave edildi. Elde edilen plazmidlerin 5 µl'si 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi.

İzole edilen plazmid DNA'larının 16S rRNA gen bölgesini içerip içermediğini tespit etmek için plazmid DNA'ları EcoRI restriksiyon enzimi ile muamele edildi. 10 µl DNA, 0,5 µl *EcoRI* (promega), 2 µl enzime ait 10× reaksiyon tamponu ve 7,5 µl H₂O olacak şekilde 20 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 2-5 µl yürütme boyası ilave edildi ve 65 °C'de 10 dakika enzimin inaktive olması için bekletildi. Ardından %1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

2.5.7. Klonların İçerdiği DNA Parçalarının Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi

Doğrulan klonlar 5 ml LB^{Amp} sıvı besiyerine ekildi ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyu inkübe edildi. 16 saatlik büyüme sonucunda elde edilen kültürler 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra plazmit izolasyon kiti (Fermantas-GeneJET Plasmid MiniPrep Kit) kullanılarak izole edildi. Plazmid DNA konsantrasyonları OD₂₆₀'da belirlendi. Tüm DNA'lardan 20 µl'lik hacim içinde 20 ng/µl konsantrasyonlarında hazırlandı. Tüpler etiketlendikten sonra MacroGen Firmasına (Hollanda) DNA bazlarının otomatik analiz edilmesi için gönderildi.

2.5.8. Elde Edilen Baz Dizilimlerinin İncelenmesi

Sekans sonucunda elde edilen 16S rDNA gen bölgesinin baz dizilimi gen bankasında bulunan diğer dizilerle karşılaştırıldı ve Mega (5.05) programı ile de bu dizilerin birbirleriyle olan benzerlikleri karşılaştırıldı. Bu programda analiz için Maksimum Parsimoni metodu, filogeni testi için 1.000 tekrarlı Bootstrap metodu kullanılarak izolatların filogenetik ağacı çizildi, ağaçta 50'nin üzerindeki benzerlikler gösterildi. Sonuçlar değerlendirildi.

2.5.9. Bakteriyal İzolatların *cry* Gen İçeriklerinin Belirlenmesi

Bakteriyal izolatların *cry* gen içeriklerinin tespit edilebilmesi için PCR yapıldı. Bu çalışmada kullanılan genel primerler: *cry1* (ileri, 5'-CAT GAT TCA TGC GGC AGA TAA AC-3'; geri, 5'- TTG TGA CAC TTC TGC TTC CCA TT-3'), *cry2* (ileri, 5'- GTT ATT CTT AAT GCA GAT GAA TGG G-3'; geri, 5'-CGG ATA AAA TAA TCT GGG AAA TAG T-3'), *cry3* (ileri, 5'-CGT TAT CGC AGA GAG ATG ACA TTA AC-3'; geri, 5'-CAT CTG TTG TTT CTG GAG GCA AT-3') ve *cry 4* (ileri, 5'GCA TAT GAT GTA GCG AAA CAA GCC -3'; geri, 5'- GCG TGA CAT ACC CAT TTC CAG GTC C-3') [197]. Ayrıca PCR ürünlerini doğrulamak için *cry1* ve *cry2* genlerini içeren *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (4D1), *cry3* genini içeren *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (BTS1) ve *cry4* genini içeren *Bacillus thuringiensis* subsp. *israilensis* (5724) suşları kullanıldı. PCR reaksiyonu Tablo 8'de gösterildiği gibi gerçekleştirildi. Kullanılan primerler sayesinde çoğaltılan baz uzunlukları; *cry1* 277 bp, *cry2* 689-701, *cry3* 589-604 bp ve *cry4* 498 bp şeklindedir.

2.6. Bakteriyal İzolatların İsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Bakteriyal izolatların böcekler üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi için *Ephestia kuehniella* ZELLER (un güvesi) (Lepidoptera: Pyralidae), *Plodia interpunctella* HUBNER (kuru meyve güvesi) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın üçüncü dönem larvaları ve *Sitophilus granarius* HUSTACHE (buğday biti) (Coleoptera: Curculionidae)'un erginleri kullanıldı.

Ephestia kuehniella'nın yumurtaları İnan Urmia Üniversitesi Ziraat Fakültesi Entomoloji Bölümü'nden, *Plodia interpunctella*'nın larvaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden ve *Sitophilus granarius* erginleri Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Bölümü'nden temin edilerek laboratuvar kültürleri oluşturuldu.

2.6.1. Bakteriyal Süspansiyonların Hazırlanması

İnsektisidal etki çalışmalarında uygulanacak bakteriyal süspansiyonların hazırlanması için bu çalışma kapsamında izole edilen bakteriyal izolatlar 1 gece önceden 30 °C'de 200 rpm'de 5 ml nütrient sıvı besiyerine ekildi. İnkübasyon sonucunda bakteri yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçülerek 1,89 ($1,8 \times 10^9$ bakteri/ml) olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra 3.000xg'de 10 dakika santrüfuj edildi ve pellet 5 ml fosfat tampon solüsyonu (PBS)'nda çözüldü [131]. Ayrıca bioassay çalışmalarında pozitif kontrol amaçlı KTU Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen *B. thuringiensis tenebrionis*, MmBt ve *B. thuringiensis tenebrionis*, Xd3 ve *B. thuringiensis kurstaki*, BnBt suşları da kullanıldı.

2.6.2. Bakteriyal İzolatların Böcekler Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Ephestia kuehniella larvalarına uygulanmak üzere hazırlanan bakteriyal süspansiyonlar, 6 gözlü deney kaplarına 3 tekrar halinde 1 gr una emdirilerek oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra 10'ar adet larva ilave edilerek 28 °C % 60 nemdeki iklim dolabında 16:8 ışık periyodunda bırakıldı. 10 gün boyunca ölen larva sayısı kaydedildi.

Plodia interpunctella larvaları için aynı şekilde hazırlanan süspansiyonlar plastik kaplara 3 tekrar halinde $\frac{1}{4}$ oranında kuru incire emdirilerek oda sıcaklığında kurutuldu. 10'ar adet larva ilave edilerek iklim dolabına bırakıldı. 10 gün boyunca ölen larva sayısı kaydedildi.

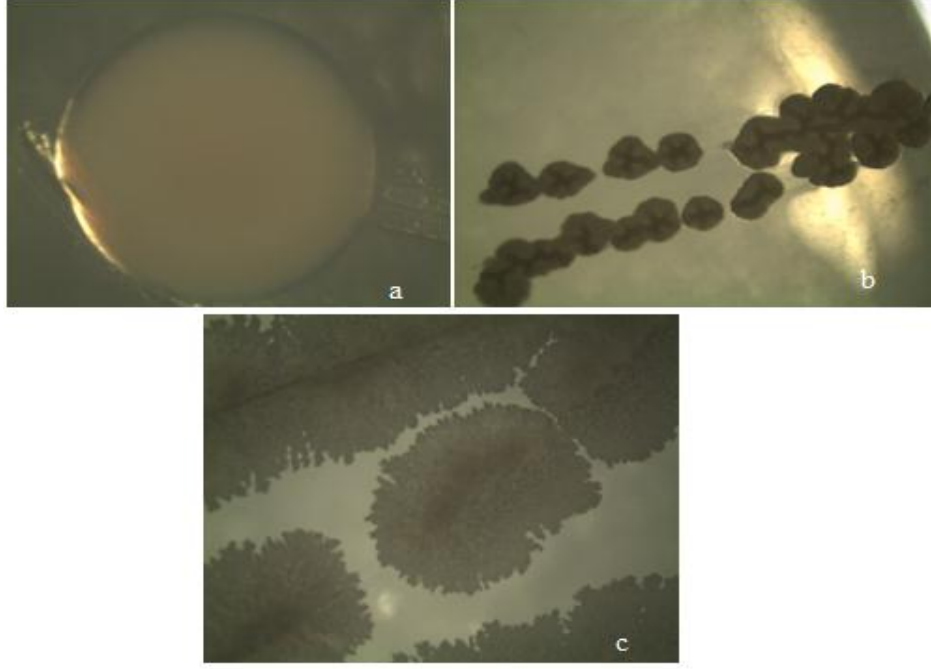
Sitophilus granarius erginleri üzerindeki insektisidal etki çalışması için bakteriyal süspansiyonlar 3 tekrar halinde 1 gr kabuklu buğdaya emdirilerek kurumaması için bekletildi. 20'şer adet larva ilave edilerek iklim dolabına bırakıldı. 10 gün boyunca ölen larva sayısı kaydedildi.

3. BULGULAR

Bu çalışmada Trabzon ve yöresindeki buğday, bezelye, mercimek, pirinç, nohut ve fındık ambarlarından toplanan öğüntü örneklerinden *Bacillus* cinsine ait toplam 26 bakteri izolasyonu yapıldı. Bu bakteriyal izolatlar için Bg (Buğday), B (Bezelye), N (Nohut) ve F (Fındık) şeklinde kodlamalar yapıldı. Örnekleme yapılan mercimek ve pirinç ambarlarından *Bacillus* cinsine ait bakteri izolasyonu gerçekleştirilemedi. İzolasyonu gerçekleştirilen bakterilerin ise daha sonra morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tanımlamaları yapılarak insektisidal etkileri araştırıldı.

3.1. *Bacillus* Cinsine Ait Bakterilerin İzolasyonu

Trabzon ve yöresindeki ambarlardan elde edilen örneklerinden *Bacillus* cinsine ait bakterilerin izolasyonu Traver ve arkadaşlarının önerdiği yöntemlerden yararlanılarak yapıldı. Elde edilen bu izolatlar farklı koloni yapılarına göre seçildi (Şekil 5). Seçilen bu bakteriyal izolatlar izole edildikleri ürün türüne göre Bg1, Bg2, Bg3, Bg4, Bg5, B1, B2, B3, B4, B5, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10, F1, F2, F3, F4, F5 ve F6 şeklinde kodlandı.



Şekil 5. Farklı izolatlarla ait koloni görüntüleri a. Bg4; b. F5; c. N5

3.2. Bakteriyal İzolatların Boyama ve Morfolojik Özellikleri

Yapılan Gram boyama ve endospor boyama sonucunda tüm izolatların Gram + basil oldukları ve endospor ihtiva ettikleri belirlendi. Koloni morfolojilerine göre seçilen izolatların binoküler mikroskop altında incelemeleri yapılarak koloni rengi ve şekli belirlendi. Bu izolatların boyama ve morfolojik özellikleri Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Bakteriyal izolatların boyama ve morfolojik özellikleri

İzolatlar	Koloni Rengi	Koloni Şekli	Hücre Şekli	Gram Boyama	Spor Boyama	NB'deki Görünüm
Bg1	Şeffaf	Dalgalı- Mukuslu	Basil	+	+	Bulanık
Bg2	Şeffaf	Saçaklı	Basil	+	+	Çökelti
Bg3	Beyaz	Dalgalı	Basil	+	+	Bulanık
Bg4	Krem	Yuvarlak	Basil	+	+	Bulanık
Bg5	Şeffaf	Saçaklı	Basil	+	+	Bulanık
B1	Krem	Saçaklı	Basil	+	+	Bulanık
B2	Şeffaf	Yuvarlak	Basil	+	+	Bulanık
B3	Krem	Yuvarlak	Basil	+	+	Çökelti
B4	Krem	Yuvarlak	Basil	+	+	Bulanık
B5	Şeffaf	Dalgalı- mukuslu	Basil	+	+	Bulanık
N1	Krem	Yuvarlak	Basil	+	+	Bulanık
N2	Şeffaf	Dalgalı	Basil	+	+	Çökelti
N3	Krem	Yuvarlak	Basil	+	+	Bulanık
N4	Şeffaf	Dalgalı	Basil	+	+	Bulanık
N5	Krem	Dalgalı	Basil	+	+	Bulanık
N6	Krem	Saçaklı	Basil	+	+	Çökelti
N7	Krem	Saçaklı	Basil	+	+	Bulanık
N8	Şeffaf	Saçaklı	Basil	+	+	Bulanık
N9	Krem	Saçaklı	Basil	+	+	Çökelti
N10	Şeffaf	Dalgalı- mukuslu	Basil	+	+	Bulanık
F1	Açık sarı	Dalgalı damarlı	Basil	+	+	Bulanık
F2	Krem	Dalgalı	Basil	+	+	Bulanık
F3	Krem	Yuvarlak	Basil	+	+	Bulanık
F4	Açık sarı	Dalgalı	Basil	+	+	Çökelti
F5	Krem	Dalgalı- damarlı	Basil	+	+	Bulanık
F6	Krem	Dalgalı	Basil	+	+	Bulanık

3.3. Bakteriyal İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Mikroorganizmaların büyümelerinde etkili olan pH, NaCl ve sıcaklık etmenlerinin optimum olarak belirlenmeleri için çeşitli aralıklarla testler yapıldı. Bu testlerin sonuçları Tablo 10'da verilmektedir. Elde edilen bu sonuçlara göre izolatların alkali, tuz ihtiva eden ortamlarda ve optimum 30 °C'de kolaylıkla büyüyebildikleri gözlemlendi.

Tablo 10. Bakteriyal izolatların fizyolojik özellikleri

İzolatlar	pH					NaCl (%)					Sıcaklık (°C)			
	5	6	9	11	12	5	9	11	13	15	20	30	37	45
Bg1	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Bg2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Bg3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bg4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Bg5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Z+	+	+	-
B1	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
B2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
B3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
B4	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
B5	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	Z+	+	+	+
N1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
N2	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
N3	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	Z+	+	+	+
N4	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Z+	+	+	+
N5	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
N6	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Z+	+	+	-
N7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
N8	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
N9	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
N10	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	Z+	+	+	+
F1	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	Z+	+	+	-
F2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

Tablo 10'un devamı

F3	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	Z+	+	+	+
F4	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
F5	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
F6	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+

Z: Zayıf

Bakterilerin tür tayininde kullanılan kriterlerden birisi de bazı enzimlerin üretilip üretilmediğini, bazı organik maddeleri sentezleyip sentezleyemediklerini belirleyebilmektir. Bu amaçla nişasta hidrolizi, oksidaz ve katalaz testleri yapıldı. Test sonuçları Tablo 11'de verilmektedir. Bg1, Bg2, Bg5, B1, B4, N2, N4, N5, N6, N8 ve N9 numaralı izolatların nişastayı hidroliz ettiği sonucuna varıldı. Katalaz testi sonucunda izolatların hepsinin katalaz enzimini ürettiği gözlemlendi. Oksidaz testinde ise Bg2, N2, N6, F3, F4 numaralı izolatların oksidaz üretilmediği Bg1, Bg3, Bg5, B1, N1, N3, N5, N9 ve N10 numaralı izolatların oksidazı zayıf ürettiği ve diğer izolatların ise oksidazı ürettiği belirlendi.

Tablo 11. Bakteriyal izolatların bazı biyokimyasal özellikleri

İzolatlar	Biyokimyasal Testler		
	Niçasta Hidrolizi	Katalaz	Oksidaz
Bg1	+	+	Z+
Bg2	+	+	-
Bg3	-	+	Z+
Bg4	-	+	+
Bg5	+	+	Z+
B1	+	+	Z+
B2	-	+	+
B3	-	+	+
B4	+	+	+
B5	-	+	+
N1	-	+	Z+
N2	+	+	-
N3	-	+	Z+
N4	+	+	+
N5	+	+	Z+
N6	+	+	-
N7	-	+	+
N8	+	+	+
N9	+	+	Z+
N10	-	+	Z+
F1	-	+	+
F2	-	+	+
F3	-	+	-
F4	-	+	-
F5	-	+	+
F6	-	+	+

Z: Zayıf

API 50CHB test küpüllerine yapılan ekimlerin sonunda 0. tüp kontrol olarak alındı ve renk değişimi olan tüpler pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Aynı şekilde API 20E test küpüllerine yapılan ekimlerin bir kısmı ayıraç (TDA, JAMES, VP1-VP2, NIT1-NIT2) ilave edilerek diğer kısmı ise direk renk değişimi gözlenmesiyle izolatların metabolik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. Renk değişimi Şekil 6'da gösterildiği gibi incelenmiştir.



API50 CH Panel Sistemi



API 20E Panel Sistemi

Şekil 6. Ekim yapılmış API küpülleri

API test kitlerinden elde edilen sonuçlar API Software programında değerlendirilerek izolatların tanımlaması yapıldı. Tanımlanan izolatların isimleri, kod numaraları ve API sonuçları Tablo 12'de verildi.

Tablo 12. Bakteriyal izolatların API sonuçları

İzolatlar	Bakteri İsmi	API Sonuçları (%)
Bg1	Belirlenemedi	-
Bg2	<i>Bacillus cereus</i>	58.0
Bg3	<i>Bacillus pumilus</i>	99.9
Bg4	Belirlenemedi	-
Bg5	Belirlenemedi	-
B1	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.9
B2	<i>Bacillus laterosporus</i>	46.1
B3	<i>Bacillus pumilus</i>	99.9
B4	<i>Bacillus licheniformis</i>	94.8
B5	Belirlenemedi	-
N1	<i>Bacillus pumilus</i>	99.9
N2	Belirlenemedi	-
N3	<i>Bacillus pumilus</i>	99.9
N4	Belirlenemedi	-
N5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99.6
N6	<i>Bacillus mycoides</i>	79.4
N7	<i>Bacillus pumilus</i>	99.9
N8	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.9
N9	<i>Bacillus mycoides</i>	79.4
N10	Belirlenemedi	-
F1	<i>Bacillus pumilus</i>	99.6
F2	<i>Bacillus licheniformis</i>	90.9
F3	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.2
F4	<i>Bacillus megaterium</i>	94.7
F5	<i>Bacillus pumilus</i>	99.9
F6	<i>Bacillus pumilus</i>	99.9

3.4. Bakteriyal İzolatların Moleküler Özellikleri

3.4.1. 16S rDNA Dizi Analizi Sonuçları

Bakteri sistematığının belirlenmesi ve filogenetik ağaç oluşumunda 16S rDNA gen dizilerinin kullanılması günümüzde oldukça rutin hale gelmiştir. Bu sebeple izolatlardan kromozomal DNA'lar izole edildi. Elde edilen kromozomal DNA'ların PCR yardımıyla çoğaltılması sonucu yaklaşık 1.500 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlendi. pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlanan 16S rDNA gen bölgelerinin nükleotit sırasının belirlenmesi için genin her iki tarafından dizin analizi yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi (Tablo 13). Filogenetik ağacın oluşturulmasında dizin analizi gerçekleştirilmiş bu sonuçların mega 5 programı yardımıyla maksimum parsimoni analizinden yararlandı (Şekil 7). Filogenetik ağaç verileri ve 16S rDNA sonuçları birbirlerini desteklemektedir.

Tablo 13. İzolatların 16S rDNA dizin analizi sonuçları

İzolatlar	Türler	Benzerlik Oranı (%)	Kayıt Numarası
Bg1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	NC_014551
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	99	AJ831841
	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	99	NR_024931
	<i>Bacillus velezensis</i>	99	EF433407
	<i>Bacillus methylotropicus</i>	99	HQ223107
	<i>Bacillus tequilensis</i>	99	AB021198
	<i>Bacillus vallismortis</i>	99	EU138460
	<i>Bacillus mojavensis</i>	99	DQ993670
	<i>Bacillus axarquiensis</i>	99	Q993672
	<i>Bacillus malacitensis</i>	99	EU138516
	<i>Bacillus atrophaeus</i>	97	CP000002
	<i>Bacillus licheniformis</i>	97	NR_042338
	<i>Bacillus aerius</i>	97	AJ831842
	<i>Bacillus altitudinis</i>	97	NR_025130
	<i>Bacillus sonorensis</i>		
Bg2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	AB592540
	<i>Bacillus anthracis</i>	99	AB190217
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	98	AB592543
	<i>Bacillus mycoides</i>	97	AB592538
	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	97	AF013121

Tablo 13'ün devamı

Bg3	<i>Bacillus pumilus</i>	99	NR_043242
	<i>Bacillus safensis</i>	99	AF234854
	<i>Bacillus altitudinis</i>	99	AJ831842
	<i>Bacillus aerophilus</i>	99	AJ831844
	<i>Bacillus stratosphericus</i>	99	AJ831841
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	97	AB598736
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97	NC_014551
	<i>Bacillus vallismortis</i>	97	AB021198
	<i>Bacillus tequilensis</i>	97	HQ223107
	<i>Bacillus velezensis</i>	97	EF433407
Bg4	<i>Bacillus vireti</i>	98	NBRC102452T
	<i>Bacillus novalis</i>	98	AJ542512
	<i>Bacillus drentensis</i>	98	AJ542506.1
	<i>Bacillus bataviensis</i>	98	AJ542508.1
	<i>Bacillus soli</i>	98	AJ542513.1
	<i>Bacillus niacini</i>	97	AB021194.1
	<i>Bacillus pseudomegaterium</i>	97	X77791.1
	<i>Bacillus djibeloensis</i>	97	AF519467.1
Bg5	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	AB592540
	<i>Bacillus anthracis</i>	99	AB190217
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99	AB592543
	<i>Bacillus mycoides</i>	98	AB592538
	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	98	AF013121
B1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	NC_014551
	<i>Bacillus vallismortis</i>	98	EU138463
	<i>Bacillus aerius</i>	98	NR_042338
	<i>Bacillus sonorensis</i>	97	NR_025130
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	97	AJ831841
	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	97	NR_024931
B2	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	99	AB271742
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99	AB271743
	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	98	FJ477040
	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	97	AB199591
B3	<i>Bacillus pumilus</i>	99	NR_043242
	<i>Bacillus safensis</i>	99	AF234854
	<i>Bacillus altitudinis</i>	99	AJ831842
	<i>Bacillus aerophilus</i>	99	AJ831844
	<i>Bacillus stratosphericus</i>	99	AJ831841
	<i>Bacillus vallismortis</i>	97	AB021198
	<i>Bacillus tequilensis</i>	97	HQ223107
	<i>Bacillus atropheus</i>	97	EU138516
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97	NC_014551
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	97	AJ831841
	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	97	NR_024931
	<i>Bacillus methylotropicus</i>	97	EU194897

Tablo 13'ün devamı

B4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	NC_014551
	<i>Bacillus aerius</i>	98	NR_042338
	<i>Bacillus sonorensis</i>	97	NR_025130
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	97	AJ831841
	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	97	NR_024931
B5	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	CP000002
	<i>Bacillus sonorensis</i>	99	NR_025130
	<i>Bacillus mojavenensis</i>	98	EU138460
	<i>Bacillus aerius</i>	98	NR_042338
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98	NC_014551
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	98	AJ831841
	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	98	NR_024931
	<i>Bacillus velezensis</i>	98	EF433407
	<i>Bacillus tequilensis</i>	98	HQ223107
	<i>Bacillus vallismortis</i>	98	AB021198
	<i>Bacillus axarquiensis</i>	98	DQ993670
	<i>Bacillus malacitensis</i>	98	Q993672
	<i>Bacillus atrophaeus</i>	98	EU138516
	<i>Bacillus methylotropicus</i>	97	EU194897
N1	<i>Bacillus pumilus</i>	99	NR_043242
	<i>Bacillus safensis</i>	99	AF234854
	<i>Bacillus altitudinis</i>	99	AJ831842
	<i>Bacillus aerophilus</i>	99	AJ831844
	<i>Bacillus stratosphericus</i>	99	AJ831841
	<i>Bacillus vallismortis</i>	97	AB021198
	<i>Bacillus methylotropicus</i>	97	EU194897
	<i>Bacillus velezensis</i>	97	EF433407
	<i>Bacillus axarquensis</i>	97	DQ993670
	<i>Bacillus tequilensis</i>	97	HQ223107
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97	NC_014551
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	97	AJ831841
	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	97	NR_024931
	N2	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
<i>Bacillus sonorensis</i>		99	NR_025130
<i>Bacillus aerius</i>		99	NR_042338
<i>Bacillus mojavenensis</i>		98	EU138460
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>		98	AB598736
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		98	NC_014551
<i>Bacillus cereus</i>		98	NC_004722
<i>Bacillus atrophaeus</i>		98	EU138516
<i>Bacillus methylotropicus</i>		98	EU194897
<i>Bacillus tequilensis</i>		98	HQ223107
<i>Bacillus vallismortis</i>		98	AB021198
<i>Bacillus axarquiensis</i>		98	DQ993670
<i>Bacillus malacitensis</i>		98	Q993672
<i>Bacillus siamensis</i>		97	GQ281299

Tablo 13'ün devamı

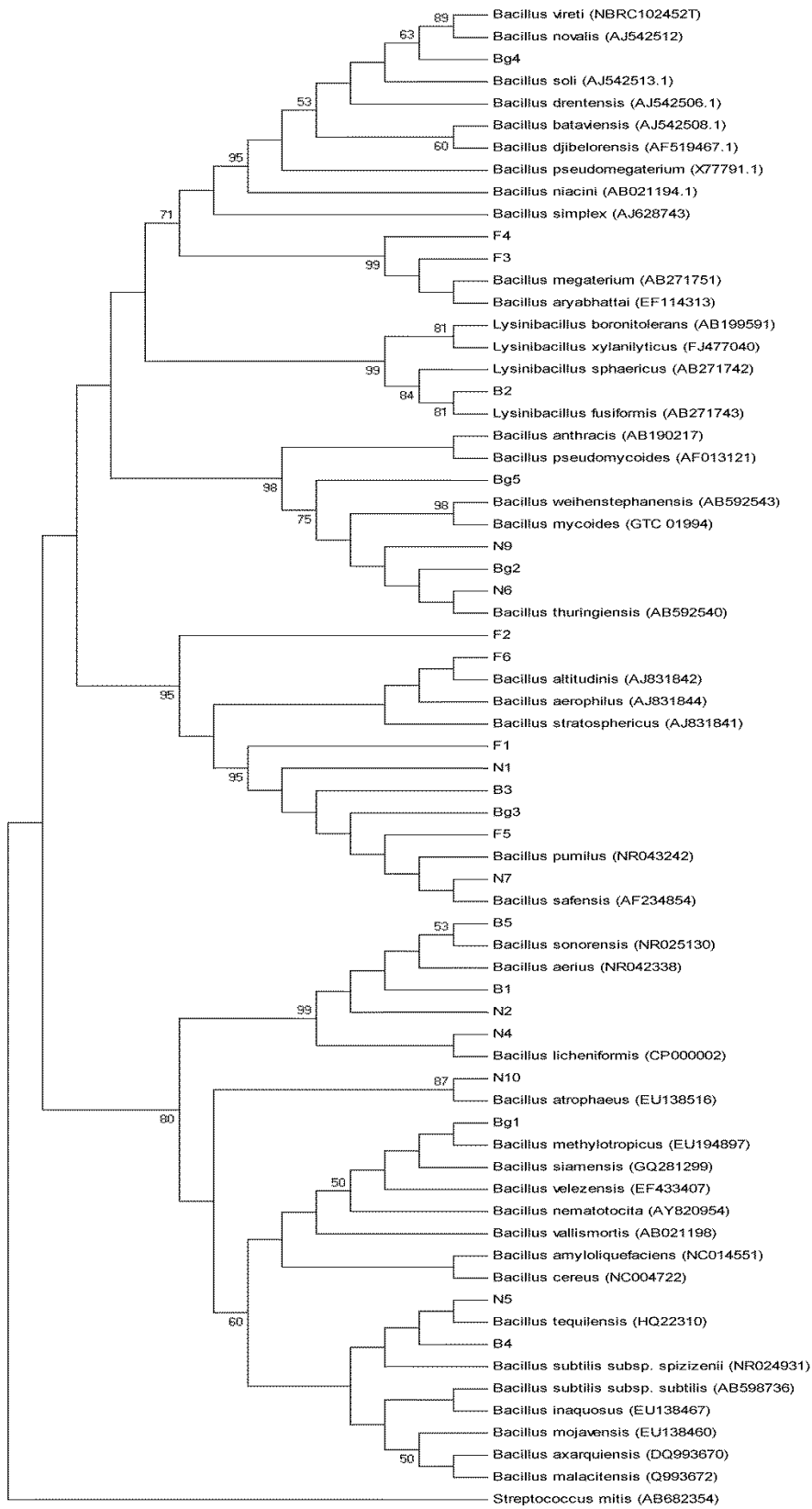
N3	Klonlanamadı	-	-
N4	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	CP000002
	<i>Bacillus sonorensis</i>	99	NR_025130
	<i>Bacillus aerius</i>	99	NR_042338
	<i>Bacillus mojavenis</i>	98	EU138460
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	98	AB598736
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98	NC_014551
	<i>Bacillus cereus</i>	98	NC_004722
	<i>Bacillus atrophaeus</i>	98	EU138516
	<i>Bacillus methylotropicus</i>	98	EU194897
	<i>Bacillus tequilensis</i>	98	HQ223107
	<i>Bacillus vallismortis</i>	98	AB021198
	<i>Bacillus axarquiensis</i>	98	DQ993670
	<i>Bacillus malacitensis</i>	98	Q993672
	<i>Bacillus velezensis</i>	98	EF433407
N5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	NC_014551
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	99	AJ831841
	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	99	NR_024931
	<i>Bacillus atrophaeus</i>	99	EU138516
	<i>Bacillus methylotropicus</i>	99	EU194897
	<i>Bacillus tequilensis</i>	99	HQ223107
	<i>Bacillus vallismortis</i>	99	AB021198
	<i>Bacillus axarquiensis</i>	99	DQ993670
	<i>Bacillus malacitensis</i>	99	Q993672
	<i>Bacillus velezensis</i>	99	EF433407
	<i>Bacillus mojavenis</i>	99	EU138460
	<i>Bacillus cereus</i>	99	NC_004722
	<i>Bacillus licheniformis</i>	98	CP000002
	<i>Bacillus sonorensis</i>	98	NR_025130
	<i>Bacillus pumilus</i>	97	NR_043242
	<i>Bacillus safensis</i>	97	AF234854
	<i>Bacillus altitudinis</i>	97	AJ831842
	<i>Bacillus aerophilus</i>	97	AJ831844
N6	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	AB592540
	<i>Bacillus anthracis</i>	99	AB190217
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99	AB592543
	<i>Bacillus mycoides</i>	97	AB592538
N7	<i>Bacillus pumilus</i>	99	NR_043242
	<i>Bacillus safensis</i>	99	AF234854
	<i>Bacillus altitudinis</i>	99	AJ831842
	<i>Bacillus aerophilus</i>	99	AJ831844
	<i>Bacillus stratosphericus</i>	99	AJ831841
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97	NC_014551
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	97	AJ831841
	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	97	NR_024931
	<i>Bacillus atrophaeus</i>	97	EU138516
	<i>Bacillus methylotropicus</i>	97	EU194897
	<i>Bacillus tequilensis</i>	97	HQ223107

Tablo 13'ün devamı

	<i>Bacillus vallismortis</i>	97	AB021198
	<i>Bacillus velezensis</i>	97	EF433407
N8	Klonlanamadı	-	-
N9	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	AB592540
	<i>Bacillus anthracis</i>	99	AB190217
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99	AB592543
	<i>Bacillus mycoides</i>	97	AB592538
	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	97	AF013121
N10	<i>Bacillus vallismortis</i>	99	AB021198
	<i>Bacillus atrophaeus</i>	99	EU138516
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98	NC_014551
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	98	AJ831841
	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	98	NR_024931
	<i>Bacillus methylotropicus</i>	98	EU194897
	<i>Bacillus tequilensis</i>	98	HQ223107
	<i>Bacillus velezensis</i>	98	EF433407
	<i>Bacillus axarquiensis</i>	98	DQ993670
	<i>Bacillus malacitensis</i>	98	Q993672
	<i>Bacillus mojavensis</i>	98	EU138460
	<i>Bacillus siamensis</i>	98	GQ281299
	<i>Bacillus nematocita</i>	98	AY820954
	<i>Bacillus licheniformis</i>	97	CP000002
F1	<i>Bacillus pumilus</i>	99	NR_043242
	<i>Bacillus safensis</i>	99	AF234854
	<i>Bacillus altitudinis</i>	99	AJ831842
	<i>Bacillus aerophilus</i>	99	AJ831844
	<i>Bacillus stratosphericus</i>	99	AJ831841
	<i>Bacillus vallismortis</i>	97	AB021198
	<i>Bacillus methylotropicus</i>	97	EU194897
	<i>Bacillus velezensis</i>	97	EF433407
	<i>Bacillus axarquensis</i>	97	DQ993670
	<i>Bacillus tequilensis</i>	97	HQ223107
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97	NC_014551
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	97	AJ831841
	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	97	NR_024931
	<i>Bacillus nematocita</i>	97	AY820954
F2	<i>Bacillus pumilus</i>	98	NR_043242
	<i>Bacillus safensis</i>	98	AF234854
	<i>Bacillus altitudinis</i>	98	AJ831842
	<i>Bacillus aerophilus</i>	98	AJ831844
	<i>Bacillus stratosphericus</i>	98	AJ831841
F3	<i>Bacillus megaterium</i>	99	AB271751
	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99	EF114313
F4	<i>Bacillus megaterium</i>	99	AB271751
	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99	EF114313

Tablo 13'ün devamı

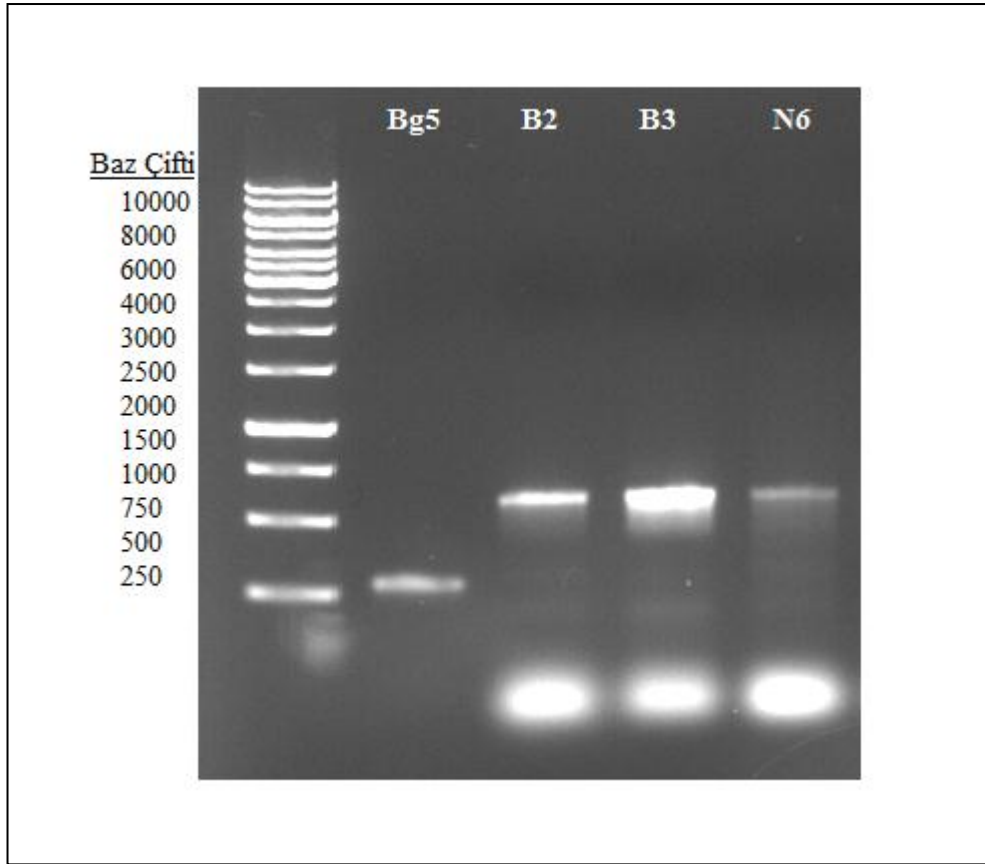
F5	<i>Bacillus pumilus</i>	99	NR_043242
	<i>Bacillus safensis</i>	99	AF234854
	<i>Bacillus altitudinis</i>	99	AJ831842
	<i>Bacillus aerophilus</i>	99	AJ831844
	<i>Bacillus stratosphericus</i>	99	AJ831841
	<i>Bacillus vallismortis</i>	97	AB021198
	<i>Bacillus methylotropicus</i>	97	EU194897
	<i>Bacillus velezensis</i>	97	EF433407
	<i>Bacillus tequilensis</i>	97	HQ223107
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97	NC_014551
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	97	AJ831841
	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	97	NR_024931
	<i>Bacillus atrophaeus</i>	97	EU138516
	F6	<i>Bacillus pumilus</i>	99
<i>Bacillus safensis</i>		99	AF234854
<i>Bacillus altitudinis</i>		99	AJ831842
<i>Bacillus aerophilus</i>		99	AJ831844
<i>Bacillus stratosphericus</i>		99	AJ831841
<i>Bacillus vallismortis</i>		97	AB021198
<i>Bacillus methylotropicus</i>		97	EU194897
<i>Bacillus velezensis</i>		97	EF433407
<i>Bacillus tequilensis</i>		97	HQ223107
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		97	NC_014551
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>		97	AJ831841
<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>		97	NR_024931
<i>Bacillus atrophaeus</i>		97	EU138516
<i>Bacillus axarquensis</i>		97	DQ993670



Şekil 7. 16S rDNA bölgesinin maksimum parsimoni analizi

3.4.2. Bakteriyal İzolatların *cry* Gen İçerikleri

Bacillus thuringiensis'e ait kristal proteinleri kodlayan *cry* genlerini belirleyebilmek için 4 çift genel primer (*cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*) kullanılarak PCR yönteminden yararlanıldı. PCR sonucunda kılavuz suşlarla karşılaştırma yapılarak aynı büyüklükte belirlenen bantlar kaydedildi. Bunun sonucunda Bg5 numaralı izolatta *cry1*, B2, B3 ve N6 numaralı izolatlarda ise *cry3* geninin bulunduğu tespit edildi (Şekil 7).



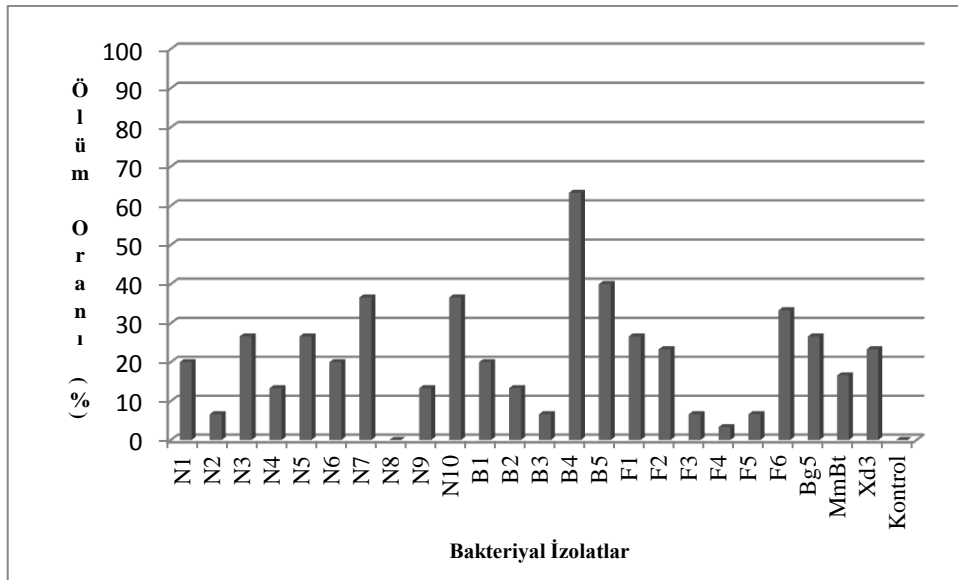
Şekil 8. Tespit edilen *cry* genlerinin agaroz jel görüntüsü

3.5. Bakteriyal İzolatların İnsektisidal Etkileri

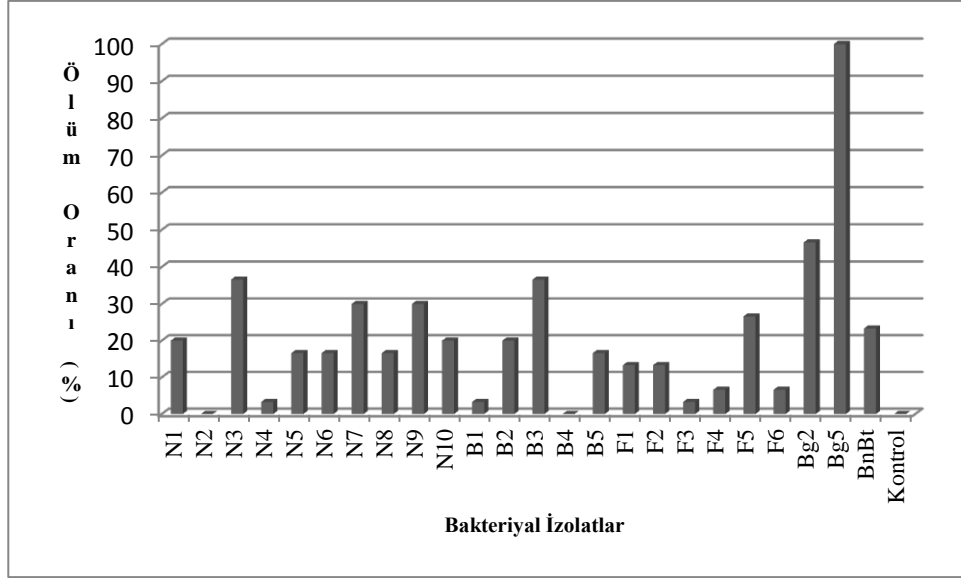
İzolatların insektisidal etkilerinin belirlenebilmesi için laboratuvar ortamında kültürleri oluşturulmuş kuru meyve güvesi (*Plodia interpunctella*), un güvesi (*Ephesia kuehniella*) 3. dönem larvaları ve buğday biti (*Sitophilus granarius*) erginleri kullanıldı. Denemeler 3'er tekrarlı olacak biçimde yapıldı. 10 gün boyunca ölüm oranları takip

edilerek kayıt edildi. Bakteriyal izolatların, kullanılan ajanlar üzerindeki etkileri Şekil 9, 10 ve 11’de gösterilmektedir.

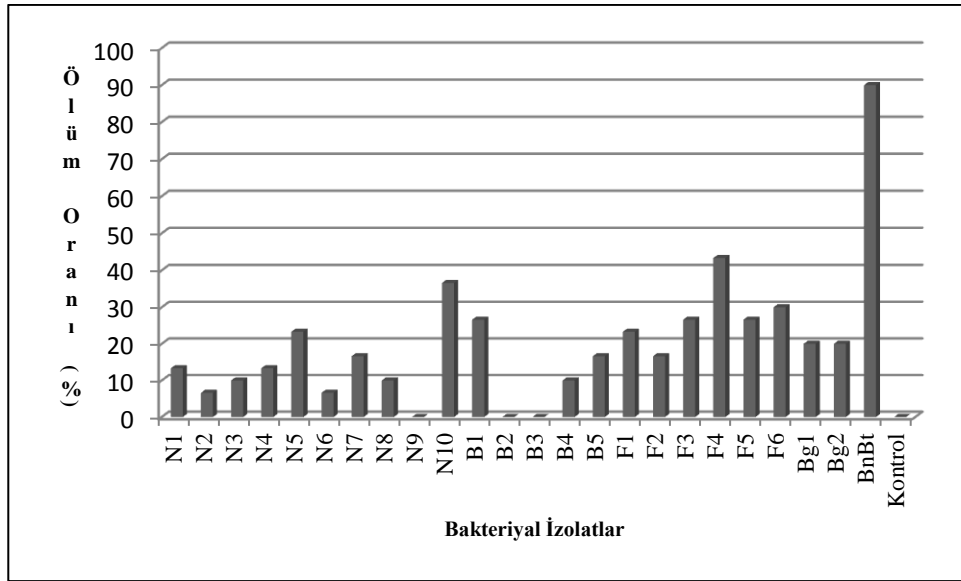
Yapılan tüm denemelerde elde edilen bakteriyal izolatların çok yüksek derecede ölüm oranına sahip olmadıkları gözlemlendi. Sadece *cryI* genine sahip Bg5 numaralı izolatın, *Plodia interpunctella* larvaları üzerinde 2. günde %100 ölüm gerçekleştirdiği belirlendi. Aynı deneyde pozitif kontrol olarak kullanılan BnBt izolatı ise düşük seviyede etki meydana getirdi (% 22). Bioassay testleri içindeki diğer en yüksek aktivite ise *Sitophilus granarius* erginlerinde B4 numaralı izolatta gözlemlendi. B4 nolu izolatın coleopteran grubu üzerinde etkili olan *cry3* genine sahip MmBt ve Xd3 kontrol izolatlarından yaklaşık % 100 oranında fazla etki gösterdiği belirlendi. Ayrıca kontrollerde de 10 gün boyunca hiç ölüm olmadığı belirlendi.



Şekil 9. İzolatların *Sitophilus granarius* erginleri üzerindeki insektisidal etkisi



Şekil 10. İzolatların *Plodia interpunctella* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi



Şekil 11. İzolatların *Ephestia kuehniella* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi

4. TARTIŞMA

Dünya genelinde en önemli ortak sorunlardan biri hızla artan dünya nüfusu için besin kaynaklarının artışının da aynı hızla sağlanmasıdır. Ayrıca, kullanılabilir tarım alanları da gün geçtikçe azalmaktadır. Dolayısıyla, birim alandan elde edilen ürün miktarının artırılması ve üretimden tüketime kadar geçen süreçte ürünün uygun bir şekilde korunması büyük önem taşımaktadır. Tarımsal ürünlerin hasattan tüketimlerine kadar en az düzeyde kayıpla korunmaları gerekir [1].

Günümüzde artık böceklerle mücadelede kimyasallar yerine biyolojik ajanlar tercih edilmeye başlanmıştır. Bu böceklere karşı kullanılan bakterilerden en fazla tercih edileni *Bacillus* türleridir. Etkili ve güvenilir biyolojik kontrol için mevcut ve cinse ait yeni izole edilen bu bakterilerin özelliklerinin belirlenmesi gerekir.

Bacillus cinsine ait izolatları belirlemek için yapılan bu çalışmada Trabzon'daki fındık ve tahıl ambarlarından alınan ögütü örneklerinden 26 kültüre edilebilir bakteriyel izolat elde edildi. Bu izolatların 16S rDNA dizi analizine göre elde edilen sonuçları ile morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testleri, gen bankasındaki benzerleriyle karşılaştırılarak bazılarının cins bazılarının ise tür seviyesinde tanımlamaları yapıldı. Ayrıca bu sonuçlar API20E ve API50CHB test sistemleri kullanılarak da desteklendi.

Genellikle 16S rDNA dizileri son yıllarda diğer bakteriyel türlerde olduğu gibi *Bacillus* türlerini de sınıflandırmak için kullanılır [132]. 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 [133].

API test sistemleri sayesinde izolatların metabolik aktiviteleri ve biyokimyasal özellikleri hakkında kısa zamanda daha kolay bilgi edinilmektedir. Tanımlamanın yetmediği durumlarda "GenBank"ta kayıtlı olan diğer türlerle de yapılan kıyaslama ile gerçekleştirilen tür tayini desteklenmiştir.

Bg1 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi ve biyokimyasal testlerin sonucuna göre *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. vallismortis*, *B. methylotropicus*, *B. tequilensis*, *B. mojavenensis* türlerine benzerlik gösterdiği belirlendi. API testi ile sonuç alınamayan bu izolat için 16S rDNA benzerlik oranlarının hepsinin %99 olması dolayısıyla tür seviyesinde karar verilemediği için bu bakteriyal izolatın tanımlanmasının *Bacillus* sp. olarak cins seviyesinde bırakılmasına karar verildi.

Bg2 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *Bacillus thuringiensis* ve *B. anthracis*'e %99, *B. weihenstephanensis*'e %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Aynı şekilde N9 numaralı izolatın da 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre %99 oranında *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*'e ve %97 oranında *B. mycoides*'e benzerliği belirlendi. Bg2 ve N9 numaralı izolatlar hareketli oldukları için bu iki izolatın *B. anthracis* olmadıklarına karar verildi. *B. weihenstephanensis*, 16S rDNA bölgesindeki ¹⁰⁰³TCTAGAGATAG sırasının varlığıyla *B. thuringiensis*'den ayrılır [134]. B2 ve N9 numaralı izolatlarda bu sıranın olmaması ve API50CHB sisteminin verdiği sonuçtan yararlanarak Bg2 ve N9 numaralı izolatların *B. thuringiensis* olduğuna karar verildi.

Bg3, N1, N3, N7, F1, F5 ve F6 numaralı izolatların 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *B. pumilus*'a %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi ve API50CHB sistemine göre de bu sonuçlar desteklendi. Bu izolatların 16S rDNA dizileri birbirleriyle karşılaştırıldığında %100 benzerlik gösterdiği belirlendi, sadece F1 numaralı izolatın %80 benzerlik gösterdiği kaydedildi. Sonuçlar göz önüne alındığında Bg3, B3, N1, N3, N7, F1, F5 ve F6 numaralı izolatların *B. pumilus* olduğuna karar verildi. Ayrıca API50CHB sisteminde yer alan biyokimyasal testleri karşılaştırıldığında Bg3 ve N1 numaralı izolatın aynı suş, N3, N7, F1, F5 ve F6 numaralı izolatların ise *B. pumilus*'a ait farklı suşlar olabileceğine karar verildi (Tablo 14). Bu yüzden bu 8 izolat aynı tür olarak kaydedildi.

Tablo 14. *B. pumilus* izolatlarının API50CHB sonuçlarının karşılaştırılması

Testler	N3	N7	F1	F5	F6
Arbutin	-	+	+	+	+
D-Glukoz	+	+	+	+	+
D-Tagatoz	+	+	+	-	+
D-Laktoz	-	-	-	+	-
D-Ksiloz	+	+	+	+	-
D-Galaktoz	-	+	+	+	-
D-Maltoz	-	+	+	+	-
D-Turanoz	-	+	+	+	-
N-asetilglukoz amin	-	+	-	+	+
VP	-	-	+	-	-
Amigdalın	-	+	+	+	+

Bg4 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre %98 oranında *B. bataviensis*, *B. drentensis*, *B. soli*, *B. novalis* ve *B. djibeloensis*'e benzediği kaydedildi. API20E panel sistemiyle sonuç alınamayan bu izolatlar için tür seviyesinde karar verilemediğinden *Bacillus* sp. olarak cins seviyesinde bırakılmasına karar verildi.

Bg5 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *B. thuringiensis*'e %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi [135] ve yaklaşık 277 bp büyüklüğündeki *cryI* genini [136, 137] içermesiyle bu sonuç desteklenmiş olup Bg5 numaralı izolatın *B. thuringiensis* olduğuna karar verildi.

B1, B4 ve N5 numaralı izolatların 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *B. amyloliquefaciens*'e %99 ve *B. subtilis*'e %97 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. *B. subtilis* ile yakın akraba olan *B. amyloliquefaciens*, inülinde asit üretememesi, çoğu suşun DNA ve pektin hidrolizini gerçekleştirememesi nedeniyle *B. subtilis* ve *B. subtilis* grubundan (*B. licheniformis* ve *B. pumilus*) ayrılır [138]. Bu bilgilerden yararlanarak B1, B4 ve N5 numaralı izolatların inülinde asit üretebilmesi yeteneği ile bu bakteriler için API50CHB sisteminin verdiği sonuçla aynı şekilde *B. subtilis* olduğuna karar verildi. Ancak biyokimyasal testlerindeki bazı farklılıklar, bu izolatların farklı suşlar olduğunu gösterdi (Tablo 15).

Tablo 15. *B. subtilis* izolatlarının API50CHB sonuçlarının karşılaştırılması

Testler	B1	B4	N5
D-Tagatoz	+	-	-
D-Melibioz	-	+	+
L-Sorboz	+	-	-
L-Ramnoz	+	-	-
Dulsitol	+	-	-
D-Galaktoz	+	-	-
L-Arabinoz	+	-	-
L-Ksiloz	-	+	-
Eritrol	-	+	-
D-Turanoz	+	-	+
L-Arjinin	+	+	-
VP	+	-	-
H ₂ S	+	-	-

B2 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre %99 oranında *Lysinibacillus sphaericus* ve *L. fusiformis*'e benzerlik gösterdiği belirlendi. *B. sphaericus*, *Bacillus* türlerinin aksine lizin, aspartik asit, alanin ve glutamik asit içeren peptidoglukan yapıya sahip olduklarından *Bacillus* cinsinden ayrılarak *L. sphaericus* adını almıştır [139].

Yapılan literatür çalışmalarına göre, biyolojik kontrolde *L. sphaericus* sivrisinek larvalarına karşı yaklaşık 50 yıldır ticari olarak kullanılmaktadır [140]. *L. sphaericus*'un büyümeyi yavaşlatıcı ve üremeyi arttırıcı ilave toksik etkilerinin, sivrisinek larvalarının predatörü olan hemipteran *Laccotrephes griseus*'a (su akrebi) karşı da etki gösterdiği kaydedilmiştir [141]. *L. sphaericus*'un bal arıları [142] gibi yararlı diğer böceklere [143] ve ökaryotik mikroorganizmalara [144] olumsuz bir etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca *B. sphaericus*'un Cry toksini ürettiği bilinmektedir [145]. Literatürde *L. sphaericus*'un Cry3 proteini ürettiğine dair verilere rastlanamamıştır ancak B2 numaralı izolat universal Cry3 primeri ile yapılan PCR sonucunda yaklaşık 600 bp uzunluğunda bant oluşturmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak B2 numaralı izolatın yeni bir *L. sphaericus* suşu olabileceği düşünülmektedir.

B3 numaralı izolatın *cry3* geni primerleriyle yapılan PCR neticesinde yaklaşık 600 bp büyüklüğünde bir bant içermesi [146, 147] nedeniyle bu izolatın *B. thuringiensis* olduğuna karar verildi.

B5 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *B. licheniformis*, *B. mojaviensis* ve *B. atrophaeus*'a %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Yapılan biyokimyasal ve fizyolojik testlerin sonuçlarına bakılarak tür seviyesinde karar verilemediği için tanımlamanın *Bacillus* sp. olarak cins seviyesinde bırakılmasına karar verildi.

N2 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *B. axarquensis* ve *B. sonorensis*'e %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Yapılan biyokimyasal ve fizyolojik testlerin sonuçlarına bakılarak tür seviyesinde karar verilemediği için *Bacillus* sp. olarak cins seviyesinde bırakılmasına karar verildi.

N4 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *B. licheniformis*'e %99, *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens*'e %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. İnülin den asit oluşumu önemli bir ayırt edici kriter olarak değerlendirildiğinde N4 numaralı izolatın *B. amyloliquefaciens* gibi inülini indirgeyememesi bu bakterinin *B. amyloliquefaciens* olduğunu gösterdi [138].

N6 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *B. thuringiensis*'e %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi [135] ve *cry3* geni primerleriyle yapılan PCR neticesinde yaklaşık 600 bp büyüklüğünde bir bant içermesiyle [146, 147] bu sonuç desteklenmiş olup N6 numaralı izolatın *B. thuringiensis* olduğuna karar verildi.

N8 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizinden sonuç çıkarılamamış olup API50CHB sistemine göre %99,9 oranında *B. licheniformis*'e benzediği belirlendi.

N10 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre %99 oranında *B. atrophaeus* ve *B. vallismortis*'e, %98 oranında ise *B. velezensis*, *B. tequilensis*, *B. mojaviensis*, *B. malacitensis*, *B. axarquensis*'e benzerlik gösterdiği belirlendi. *B. subtilis* grubundan olan bu bakteriler arasından *B. atrophaeus* koyu pigment üretmesiyle diğerlerinden ayrılır [148]. N10 numaralı izolatın koyu pigment ürettiği bilindiğinden bu bakterinin *B. atrophaeus* olduğu düşünülmektedir.

F2 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre %98 oranında *B. safensis* ve *B. pumilus*'a, API50CHB sonucuna göre ise %90,9 oranında *B. licheniformis*'e benzerlik gösterdiği belirlendi. Tür seviyesinde tanımlama yapılamadığı için *Bacillus* sp. olarak cins seviyesinde bırakılmasına karar verildi.

F3 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *B. megaterium* ve *B. aryabhatai*'ye %99, API50CHB sonucuna göre *B. licheniformis*'e %99,2 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Tür seviyesinde karar verilemediği için *Bacillus* sp. olarak cins seviyesinde bırakılmasına karar verildi.

F4 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *Bacillus megaterium*'a %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi ve API50CHB sistemine göre bu sonucun desteklenmesi her iki analiz sonucunun ortak değerlendirilmesi F4 numaralı izolatın *B. megaterium* olduğunu gösterdi. Yapılan literatür araştırmasında *B. megaterium*'un daha önce topraktan izole edildiği belirlendi [149].

Çalışmanın ikinci kısmında ise bu izole ve karakterize edilen 26 bakteriyal izolatın insektisidal etkilerin araştırılmasında önemli depo zararlıları olan *Ephestia kuehniella* ve *Plodia interpunctella* larvaları ve *Sitophilus granarius* erginleri üzerinde denemeler gerçekleştirildi.

Elde edilen izolatlardan *B. megaterium* olarak belirlenen F4 numaralı izolatın, *E. kuehniella*'ya karşı %43,3, pozitif kontrol olarak kullanılan BnBt suşunun ise %90 öldürücü etkiye sahip olduğu belirlendi. Literatürde *B. megaterium* ile herhangi bir insektisidal aktivite çalışması yapılmamıştır.

B. thuringiensis olarak belirlenen Bg5 numaralı izolatın *P. interpunctella*'ya karşı 2. günde %100 öldürücü etkiye sahip olduğu belirlendi ve böylece *P. interpunctella* gibi önemli bir depo zararlısına karşı biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabilme potansiyeline sahip bir bakteriyal izolat tespit edilmiş oldu. *cryI* genine sahip bir *B. thuringiensis* olarak tanımlanan bu izolat belki gelecekte depolarda kullanılan kimyasalların yerini alabilecektir.

S. granarius erginleri üzerinde ise en yüksek insektisidal etkinin B4 numaralı izolat tarafından %63,3'lük oranla meydana geldiği belirlendi. B4'ün bu çalışma kapsamında izole ve karakterize edilen ve Cry3'e sahip olduğu belirlenen izolatlar ile pozitif kontrol olarak kullanılan suşlardan (MmBt ve Xd3) çok daha yüksek bir oranda aktivite göstermesi ilginç bir sonuç olarak yorumlandı. Bilindiği gibi larvalara kıyasla erginler üzerinde elde edilen insektisidal değerler çok daha düşüktür.

Bu çalışma kapsamında elde edilen bakteriyal izolatların %0'dan %100'e kadar değişen oranlarda test edilen böcekler üzerinde farklı insektisidal aktivite gösterdikleri belirlendi. Ambarlardan elde edilen çoğu bakteriyal izolatın Lepidoptera takımına ait zararlılar üzerinde önemli derecede öldürücü etkiye sahipken Coleoptera takımı zararlıları

için ise düşük derecede öldürücü etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Bu yüzden ambarlardaki en zararlı böcek grubu da Coleopteranlardır [150]. Bu sonuçlar izolatların yaygınlığının direkt olarak duyarlı böceklerin çoğunluğuyla ilişkili olmadığını gösterdi.

5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda 26 bakteriyal izolat elde edildi. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlenerek bazı ambar zararlıları üzerindeki insektisidal etkileri belirlendi. Bu çalışmalara göre;

1. Elde edilen 26 bakteriyal izolatın morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerine göre karakterizasyonları yapıldı ve tanımlamaları gerçekleştirildi. Bunlardan 6 tanesi cins seviyesinde *Bacillus* sp. olarak (Bg1, Bg4, B5, N2, F2, F3), 20 tanesi ise tür seviyesinde tanımlandı. Tür seviyesinde tanımlanan bakteriler; *B. thuringiensis* (Bg2, Bg5, B3, N6, N9), *B. pumilus* (Bg3, N1, N3, N7, F1, F5 ve F6), *B. subtilis* (B1, B4, N5), *B. amyloliquefaciens* (N4), *B. licheniformis* (N8), *B. atropheus* (N10), *B. megaterium* (F4) ve *Lysinibacillus sphaericus* (B2). Bu izolatlar 8 farklı türle temsil edilmektedirler.
2. Bg3 ve N1 numaralı izolatların *B. pumilus*'un aynı suşu, N3, N7, F1, F5 ve F6 numaralı izolatların ise bu türe ait farklı suşlar olabileceğine karar verildi.
3. Bg5 numaralı izolatın *cry1* ve B2, B3, N6 numaralı izolatların ise *cry3* genini ihtiva ettikleri belirlendi.
4. N2 ve N9 numaralı izolatların *cry* geni içermediği ancak *B. thuringiensis* olduğu belirlendi.
5. İzole edilen bu bakterilerin farklı ambar zararlıları üzerindeki insektisidal etkilerinin belirlenmesi için yapılan deneylerde Bg5 numaralı izolatın *P. interpunctella* larvaları üzerinde 2. günde % 100'lük oranda bir ölüm meydana getirdiği belirlendi.
6. F4 numaralı izolatın *E. kuehniella* larvaları üzerinde % 43,3 oranında öldürücü bir etkiye sahip olduğu belirlendi.
7. Pozitif kontrol olarak kullanılan ve *cry1*'e sahip olduğu bilinen BnBt suşunun ise *E. kuehniella* larvaları üzerinde % 90 oranında bir öldürücü etkiye sahip olduğu belirlendi.
8. *S. granarius* erginleri üzerinde ise en yüksek insektisidal etkinin B4 numaralı izolat tarafından % 63,3'lük oranla meydana geldiği belirlendi.
9. Bg5 nolu izolatın *P. interpunctella*'ya, BnBt'nin *E. kuehniella*'ya ve B4 nolu izolatın ise *S. granarius*'a karşı oldukça etkili oldukları tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, Trabzon'daki fındık ve tahıl depolarından 6'sı cins 8'i ise farklı türlerde olmak üzere toplam 26 farklı kültüre edilebilir bakteri izole edildi ve bunların bazı depo zararlıları üzerindeki insektisidal etkileri araştırıldı. Çalışmada ulaşılan sonuçlardan hareketle, gelecek çalışmalara yönelik olarak aşağıdaki hususlar belirlenmiştir.

1. Elde edilen *Bacillus thuringiensis* izolatlarından saflaştırılan kristal proteinlerin toksin çeşidine göre biyolojik aktivitesi farklı böceklerde test edilebilir.
2. Yüksek toksik aktiviteli suşlar için protein profil çalışmaları yapılabilir.
3. *B. thuringiensis* izolatlarının serolojik testleri bilinen serotiplere göre tanımlamak için uygulanabilir ve izolatlarımızda eğer mevcut ise yeni ve bilinmeyen serotipler araştırılabilir.
4. Yüksek insektisidal aktiviteli *B. thuringiensis* izolatının kültür koşullarındaki çalışmalarla büyük miktarda kristal protein üretimi için uygulanabilir. Ayrıca hedef proteinleri daha hızlı ve ekonomik bir şekilde üretmek için toksin protein üreten *cry* genleri plazmidler yardımıyla *E. coli*'ye uygun bir vektörle klonlanabilir.
5. Cins seviyesinde tanımlanan türlerin G+C içeriği, DNA-DNA hibridizasyonu ve yağ asitlerinin GC analizi gibi ilave yöntemler kullanılarak tür seviyesinde tanımlanmaları gerçekleştirilebilir.
6. *Lysinibacillus sphaericus* olduğu düşünülen B2 numaralı izolatın *cry* gen içeriği araştırılabilir.
7. *B. pumilus* ve *B. subtilis*'e ait farklı alt suşları olduğu düşünülen izolatların alt tür belirleme çalışmaları yapılabilir.

7. KAYNAKLAR:

1. http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/19fec2f129fbdba_ek.pdf, Depolanmış Ürün Zararlılarıyla Savaşım, Sorunlar ve Çözüm Yolları, 22 Kasım 2011.
2. Donahaye, E.J. ve Messer, E., Reduction in grain storage losses of small-scale farmers in tropical countries, Research Report, The Allan Shawn Feinstein World Hunger Program, Brown University, USA (1992) RR-91-7, 19.
3. Boxall, R.A., Post-harvest losses to insect a world overview, International Biodeterioration&Biodegradation, 48 (2001) 137-152.
4. Miller, G.T. Living in the environment, 10th Edition, Belmont, C.A., Wadsworth, 1998.
5. Ayvaz, A., Un güvesi, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) ve yumurta parazitoidi *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae)'un bazı biyolojik özellikleri üzerine gamma radyasyonunun etkileri, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Eğitimi Ankara, 2001.
6. Yılmaz, S. “Çeşitli habitatlardan izole edilen *Bacillus thuringiensis* suşlarının moleküler karakterizasyonu ve bazı zararlı böceklere karşı mücadelede kullanımı”, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Kayseri, 2010.
7. Kegley, S.E. ve Wise, L.J., Pesticides in fruit and vegetables, Sausalito, CA, University Science Books, 1998.
8. Newsom, L.D., Consequences of insecticide use on nontarget organisms, Department of Entomology, Louisiana State University, Baton rouge, Louisiana, 1996.
9. Aguilar, C, Borrull, F. ve Marce, R.M., Determination of pesticides in environmental waters by solid-phase extraction and gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry dedection, Journal of Chromatography, 771 (1997) 221–231,.
10. Yücel, Ü., Pestisitlerin insan ve çevre üzerine etkileri, Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Nükleer Kimya Bölümü, Ders notları, 2007.
11. Bülbüloğlu, O., Çeşitli toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus thuringiensis*'lerin izolasyonu, karakterizasyonu ve insektisidal etkilerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Trabzon, 2000.

12. National Research Council, Subcommittee on Insect Pest, Insect Pest management and Control, Washington, 150-155, 1984.
13. Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I. ve Chambliss, G. H., *Bacillus*, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology", 9nd Edition, Volume 2, by edited Collier L., Balows, A. and Susman, M., Oxford University Pres, New York, 709-730, 1998.
14. Wipat, A. ve Harwood, C.R., The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium, FEMS Microbiology Ecology, 28 (1999) 1-9.
15. Hongyu, Z., Ziniu Y. ve Wangxi, D., Isolation, distribution and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from warehouses in China, Crop Protection, 19 (2000) 449-454.
16. Anonim, Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Cilt: 1, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara, 393, 1995a.
17. Anonim, Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Cilt: 4, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara, 393, 1995b.
18. Emekçi, M. ve Ferizli, A.G., Current Status of Stored Product Protection in Turkey. IOBC/WPRS Study Group Integrated Protection of Stored Products, Berlin, IOBC wprs Bulletin, 23, 10 (2000) 39-45.
19. Arthur, F.H., Grain protectants: current status and prospect for the future, J. Stored Prod. Res. 32 (1996) 293-302.
20. Wilson, E.O., First word. Omni, 12, 6, 1990.
21. Uygun, N., Ulusoy, M. R. ve Satar, S., Biyolojik Mücadele, Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi, 1, 1 (2010) 1-14.
22. Ayvaz, A., Öztürk, F., Yaray, K. ve Karahacioglu, E. Effects of the gamma radiations and malathion on confused flour beetle, *Tribolium confusum*, J. Du Val. Pakistan Journal of Biological Sciences, 5, 5 (2002) 560-562.
23. National Research Council, Subcommittee on Insect Pest, Insect Pest management and Control, Washington (1984) 150-155.
24. Smith, R. F., Consideration on safety of certain biological agents for arthropod control, Bull WHO, 48 (1980) 685-698.
25. Ridgway, R.L. ve M. N. Inscoe, Mass-Reared naturel enemies for pest control: trends and challenges, in mass-reared naturel enemies: application, regulation, and needs, Ridgway, R.L., M.P. Hoffman, M. N. Inscoe, and C.S. Glenister, Eds. Thomas Say Publications in Entomology, Entomological Society of America, Lanham, Maryland, 1998.

26. Garrity, G.M., Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Release 5.0, Springer-Verlag, New York, 529-531, 2004.
27. Logan, N.A. ve Turnbull, P.C.B., *Bacillus* and recently derived genera, Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H., Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, 357-358, 1999.
28. Sneath, P.H.A., Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, edited by P.H.A. Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe, J.G., Williams and Wilkins, Holt, 1104-1139, 1986.
29. Massle, J., Roberts, G. ve White, O. J., Selective isolation of *Bacillus sphaericus* from soil by use of acetate as major source of carbon, Applied and Environmental Microbiology (1985) 1478-1481.
30. Koneman, E.W., vd., Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott Williams and Wilkins, 1535, 2006.
31. Fitz-James, P.C., Young, F.E., Morphology Sporulation, The Bacterial Space (editors) In Gould and Hurst, Academic Press, London and New York, 39-72, 1969.
32. Errington, J., Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*, Nature Reviews: Microbiology, 1 (2003) 117-127,.
33. http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_thuringiensis, *Bacillus thuringiensis*, 06 Mayıs 2012.
34. Albayrak, G., Moleküler Biyoloji-Protein Sentezi ve Yıkımı, Yıldırım, A., Bardakçı, F., Tanyolaç, B. ve Karataş, M., 1. Baskı, 143-165, Nobel Yayın Dağıtım, 2007.
35. Madigan, T.M., Martinko, J.M., Brock-Mikroorganizmaların Biyolojisi, Çökmüş, C., 11. Baskıdan Çeviri, 256-298, Palme Yayıncılık, Ankara, 2010.
36. Tanaka, T., Kuroda, M. ve Sakaguchi, K., Isolation and characterization of four plasmids from *Bacillus subtilis*, Journal of Bacteriology, 129, 3 (1977) 1487-1494.
37. Voskuil, M. I. ve Chambliss, G. H., Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis*, Applied and Environmental Microbiology, 59, 4 (1993) 1138-1142.
38. Ombui, J. N., Mathenge, J. M., Kimotho, A. M., Macharia, J. K. ve Nduhiu, G., Frequency of antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from milk, East African Medical Journal, 73, 6 (1996) 380-384.

39. Andrup, L., Damgaard, J. ve Waaermann, K., Mobilization of small plasmids in *Bacillus* subsp. *israelensis* is accompanied by specific aggregation, Journal of Bacteriology, 175, 220 (1993) 6530-6536.
40. McDonald, K. O. ve Burke, W. F., Plasmid transformation of *Bacillus sphaericus* 1593, Journal of General Microbiology, 130 (1984) 203-208.
41. Parini C., Fortina M. G., Manachini P. L., De Rossi E. ve Riccardi G., Detections and characterization of naturally occurring plasmids in *Bacillus licheniformis*, FEMS Microbiology Letters, 5, 3 (1991) 329-334.
42. Kunnimalaiyaan M., Stevenson D. M., Zhou Y. ve Vary P. S., Analysis of the replicon region and identification of an rRNA operon on pBM400 of *Bacillus megaterium* QM B1551, Molecular Microbiology, 39, 4 (2001) 1010-1021.
43. Dobritsa, A. P., Dobritsa, S. V. ve Tanyashin, V. I., Isolation and characterization of plasmid from the *Bacillus brevis* var. G-B cells, Molecular & General Genetics, 164, 2 (1978) 195-204.
44. Bodorova-Urgosikova, J., Benada, O. ve Tich, P., Large-scale isolation and partial characterization of plasmid DNA from *B. larvae*, Folia Microbiologica, 37, 2 (1992) 82-86.
45. Yoshimura, K., Yamamoto, O., Seki, T. ve Oshma, Y., Distribution of heterogenous and homologous plasmids in *Bacillus* spp., Applied and Environmental Microbiology, 46, 6 (1983) 1268-1275.
46. Chang, Y. H., Shangkuan, Y. H., Lin, H. C. ve Liu, H. W., PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells, Applied and Environmental Microbiology, 69, 8 (2003) 4502-4510.
47. Vilas-Boas, G.T., Peruca, A.P.S. ve Arantes, O.M.N., Biology and Taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*, Canadian Journal of Microbiology (2007) 673-687.
48. Priest, F.G. ve Grigorova, R., Methods in Microbiology, Grigorova, R. ve Norris, J.R., 565-591, Academic pres, 1990.
49. Gordon, R.E., Haynes, W.C. ve Pang, C.H.-N. The Genus *Bacillus*, Washington, D.C. United States Department of Agriculture, 1973.
50. <http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v01bacil.pdf>, 06.05.2012.
51. Priest, F.G., Goodfellow M. ve Todd C., The genus *Bacillus*: A numerical analysis, Berkeley, R.C.W. ve Goodfellow, M., 91-103, Academic Press, London, 1981.
52. Austin, B. ve Priest, F., Modern Bacterial Taxonomy, Van Nostrand Reinhold, UK, 1986.

53. Woese, C.R., Bacterial evolution, Microbiol Rev, (1987).
54. Claus, D. ve Berkeley, C.W, The Genus *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Sneath, P.H.A., Williams, Wilkins, Baltimore, 2, 1105-1139, 1986.
55. Logan, N.A., ve Berkeley, R.C.W., Identification of *Bacillus* Strain Using the API System, Journal of General Microbiology, 130 (1984) 1871-1882.
56. Frachon, E., Hamon, S., Nicolas L. ve de Barjac, H., Cellular fatty acid analysis as a potential tool for predicting mosquitocidal activity of *Bacillus sphaericus* strains, Appl. Environ. Microbiol, 57 (1991) 3394-3398.
57. The Inter Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, Environmental Health Criteria 217-Microbial Pest Control Agent *Bacillus thuringiensis*, World Health Organization, 1-125, 1999.
58. Höfte, H. ve Whiteley, H.R., Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*, Microbiol. Rev., 53, 2 (1989) 242-255.
59. Bone, L.W., Activity of commercial *Bacillus thuringiensis* preparations against *Trichostrogylus colubriformis* and *Nippostrrogylus brasiliensis*, J. Invertebr. Pathol., 53, 2 (1989) 276-277.
60. Prieto-Samsonov, D.L., *Bacillus thuringiensis* from biodiversity to biotechnology, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 19, 3 (1997) 202-219.
61. Lacey, L.A. ve Goettel, M.S., Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 1st century, Entomophaga, 40, 1, 3 (1995) 27.
62. Beegle, C.C. ve Yamamoto, T., Invitation Paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research and Development, Can. Entomol., 124 (1992) 587- 616.
63. http://www.bt.ucsd.edu/bt_history.html, History of Bt, 07 Mayıs 2012.
64. Uribe, D., Martinez, W. ve Ceron, J., Distribution and Diversity of Cry Genes in Native Strains of *B. thuringiensis* Obtained from Colombia, J. Invert. Pathol., 82 (2003) 119-127.
65. Prasertphon, S., Areekul, P. ve Tanada, Y., Sporulation of *Bacillus thuringiensis* in Host Cadavers, J. Invertebr. Pathol., 21 (1973) 205-207.
66. Grassi, S. ve Deseö, K.V., The Natural Occurrence of *Bacillus thuringiensis* Berl. and Its Importance in the Plant Protection, Proceedings of Seminar on Phytopathology, Sorrento, Italy, 26-29 March 1984, Clueb Publishing Co., 2, 424-433.

67. Aly, C., Germination of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Spores in the Gut of *Aedes* larvae (Diptera: Culicidae), J. Invertebr. Pathol., 45 (1985) 1-8.
68. Aly, C., Mulla, M.S. ve Federici B.A., Sporulation and Toxin Production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in Cadavers of Mosquito Larvae (Diptera: Culicidae), J. Invertebr. Pathol., 46 (1985) 251-258.
69. Carlson, C.R., Caugant, D.A. ve Kolsto, A.B., Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains, Appl. Environ. Microbiol., 60 (1994) 1719-1725.
70. Gonzales, J.M. Jr., Dulmage, H.T. ve Carlton, B.C., Correlation between Specific Plasmids and δ -endotoxin Production in *Bacillus thuringiensis*, Plasmid, 5 (1981) 351-365.
71. Lereclus, D., Delecluse, A. ve Lecadet, M-M., Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practise. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 37-70, 1993.
72. Carlton, B., Development of Genetically Improved Strains of *Bacillus thuringiensis*. IN: Biotechnology for Crop Protection, Hadin, P., Mann, J., Hollingworth, R., (eds.). American Chemical Society, Washington, D.C., 260-279, 1988.
73. Mahillon, J., Resohazy, R., Hallet, B. ve Delcour, J., IS231 and Other *Bacillus thuringiensis* Transposable Elements: a Review, Genetica, 93 (1994) 13-26.
74. Faust, R. M., Spizizen, J., Cage, V., ve Travers, R. S., Extrachromosomal DNA in *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, var. *finitimus*, var. *sotto*, and in *Bacillus popilliae*, J. Invertebr. Pathol., 33 (1979) 232-238.
75. Hansen, B.M., Damgaard, P.H., Eilenberg, J. ve Pedersen, J.C., Molecular and Phenotypic Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Leaves and Insects, J. Invertebr. Pathol., 71 (1998) 106-114.
76. de Barjac, H. ve Frachon, E., Classification of *Bacillus thuringiensis* Strains, Entomophaga, 35 (1990) 233-240.
77. de Barjac, H., Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In: Burges, H.D. (ed.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. New York, London, Academic Press Inc., 35-43, 1981.
78. Goldberg, L.J. ve Margalit, J., A Bacterial Spore Demonstrating Rapid Larvicidal Activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*., Mosq. News, 37 (1977) 355-358.

79. Krieg, A., Huger, A.M., Langenbruch, G.A. ve Schnetter, W., *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, a New Pathotype Effective against Larvae of Coleoptera, Z. Angew. Entomol., 96, 5 (1983) 500-508.
80. Narva, KE, Payne, J.M., Schwab, G.E., Hickle, L.A., Galasan, T. ve Sick, A.J., Novel *Bacillus thuringiensis* Microbes Active against Nematodes, and Genes Encoding Novel Nematode-Active Toxins Cloned from *Bacillus thuringiensis* Isolates: European Patent Application EP0462 721A2. Munich, Germany, European Patent Office, 1991.
81. Bajwa W.I., Kogan M., *Bacillus thuringiensis* - Based Biological Control of Insect Pests, (<http://ippc.orst.edu/dir/microbial/bt/>), 2001.
82. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rien, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. ve Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, PMID:9729609 (1998) 775–806.
83. Tanada, Y. ve Kaya H. K., *Insect Pathology*, Academic Pres, Inc., London, 1993.
84. Porcar, M. ve Juarez-Perez, V., PCR-Based Identification of *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Genes, FEMS Microbiol. Rev., 26 (2003) 419-432.
85. Agaisse, H. ve Lereclus, D., How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? J. Bacteriol. 177, PMID:7592363 (1995) 6027–6032.
86. Jarrett, P. ve Stephenson, M.. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. Appl. Environ. Microbiol., 56, PMID:2383006 (1990) 1608–1614.
87. Vilas-Boas, G.F.L.T., Vilas-Boas, L.A., Lereclus, D. ve Arantes, O.M.N., *Bacillus thuringiensis* conjugation under environmental conditions. FEMS Microbiol. Ecol. 25 (1998) 369-374.
88. Thomas, D.J.I., Morgan, J.A.W., Whipps, J.M. ve Saunders, J.R., Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strain in laboratory culture and river water, and Dipteran larvae, Appl. Environ. Microbiol. PMID:11133463 (2001) 330-338.
89. Vilas-Boas, L.A., Vilas-Boas, G.F.L.T., Saridakis, H.O., Lemos, M.V.F., Lereclus, D., and Arantes, O.M.N. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm, FEMS Microbiol. Ecol., 31, PMID:10719207 (2000) 255–259.
90. Ferreira, L.H.P.L., Suzuki, M.T., Itano, E.M., Ono, M.A., ve Arantes, O.M.N. Ecological aspects of *Bacillus thuringiensis* in an oxisoil, Sci. Agric. Sin. 60 (2003) 19–20.

91. Juarez-Perez, V.M., Ferrandis, M.D. ve Frutos, R., PCR based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes, Appl. Environ. Microbiol. 63, PMID: 9251188 (1997) 2997–3002.
92. Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., vd., Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection, Appl. Environ. Microbiol., 64, PMID:9835590 (1998) 4965–4972.
93. <http://www.isb.vt.edu/news/2003/news03.jul.html>, ISB News Report, 08 Mayıs 2012.
94. Li, J.D., Carroll, J. ve Ellar, D.J., Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 31, 353(6347), 815–821, 1991.
95. Grochulski, P., vd., *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation, J. Mol. Biol., 254, 3 (1995) 447-464.
96. Johnson, D.E., Bacterial-membrane transport of b-exotoxin, an anti-metabolite of RNA-synthesis, *Nature (London)*, 260: 333–335. doi:10.1038/260333a0. PMID:815825., 1976.
97. WHO (World Health Organization), International programme on chemical safety (IPCS): microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. Environ. Health Criteria, 217 (1999) 1-105.
98. Estruch, J.J., Warren, G.W., Mulis, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A. ve Koziel, M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, doi:10.1073/pnas.93.11.5389. PMID:8643585, 1996, 5389-5394.
99. Chen, J., Yu, J., Tang, L., Tang, M., Shi, Y. ve Pang, Y., Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* fulllength and N-terminally truncated vip3A gene in *Escherichia coli*, J. Appl. Microbiol., PMID:12859763 (2003) 1365-2672.
100. Shi, Y., Xu, W., Yuan, M., Tang, M., Chen, J. ve Pang, Y., Expression of *vip1/vip2* genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides, J. Appl. Microbiol., PMID:15357725 (2004) 757–765.
101. Visser, B., Bosch, D. ve Honée, G., Domain-Function Studies of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins: A Genetic Approach. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Pesticide: Theory and Practice. Chichester, New York, Toronto, Wiley and Sons, 71-88, 1993.
102. Feitelson, J.S., The *Bacillus thuringiensis* Family Tree, In Kim, L. (ed.), *Advanced Engineered Pesticides*. Marcel Dekker. Inc., New York, N.Y. 63-71, 1993.

103. Zukowski, K., Laboratory Examination of the Effectiveness of New Biological Preparations for Reducing Populations of Cockroaches (*Blattella germanica* L.), Rocz. Panstw. Zakl. Hig., 46 (1995) 293-297.
104. Knowles, B. H., Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal δ -endotoxin, In *Advances in Insect Physiology*, 24. Evans, P.D. (ed.), Academic Press, London, 275-308, 1994.
105. http://muou.sc.mahidol.ac.th/research_wp_bt.html, MU-OU:CRC, 09 Mayis 2012.
106. Promdonkoy, B. ve Ellar, D. J., Structure-function relationships of a membrane pore forming toxin revealed by reversion mutagenesis, Mol. Membr. Biol. (2005) 327–337.
107. Butko, P., Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses, Appl. Environ. Microbiol. (2003) 2415-2422.
108. Ferre, J., vd., Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins, FEMS Microbiol. (1995) 1-7.
109. Tabashnik, B.E., Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*, Annu. Rev. Entomol., 39 (1994) 47–79.
110. McGaughey, W.H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*, Science, 229 (1985) 193–195.
111. Ferre J. ve Van Rie J., Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*, Annu. Rev. Entomol., 47 (2002) 501-33.
112. Van Rie J., vd., Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*, Science, 247 (1990) 72–74.
113. Gould, F., vd., Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89, 7986–7990, 1992.
114. Jurat-Fuentes J., vd., Altered glycosylation of 63- and 68-kilodalton microvillar proteins in *Heliothis virescens* correlates with reduced Cry1 toxin binding, decreased pore formation, and increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins, Appl. Environ. Microbiol. (2002) 5711–5717.
115. Martin P.A.W. ve Travers R.S., Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates, Appl. Environ. Microbiol., 55 (1989) 2437–2442.
116. Chilcott C.N. ve Wigley P.J., Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand., J. Invertebr. Pathol., 61 (1993) 244–247.

117. Meadows, M.P., Ellis, D.J., Butt, J., Jarret, P. ve Burges, H.D. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in animal feed mill. Appl. Environ. Microbiol., 58 (1992) 1344–1350.
118. <http://www.greenbook.net/welcome.htm>, Crop Protection Chemicals Reference, 12/10/1998.
119. Copping, L.G. (ed.), The Biopesticide Manual, British Crop Protection Council, Franham, Surrey, U.K., 1998.
120. <http://www.cdms.net/manuf/manuf.asp>, Crop Data Management Systems, 12/10/1998.
121. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/epa/m2.htm>, USEPA/OPP Pesticide Products Database, 12/10/1998.
122. Sanchis, V. Biotechnological improvement of *Bacillus thuringiensis* for agricultural control of insect pests: benefits and ecological implications. In Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Edited by J.F. Charles, A. Delecluse, and C. Nielsen-Le Roux. Kluwer Academic Publishers, England, 441–459, 2000.
123. Gould, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. Annu. Rev. Entomol., PMID:15012402 (1998) 701–726.
124. Shelton, A.M., Zhao, J.-Z. ve Roush, R.T., Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. Annu. Rev. Entomol., 47: PMID:11729093 (2002) 845–881.
125. Wisniewski, J.P., Frangne, N., Massonneau, A., ve Dumas, C., Between myth and reality: genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy. Biochimie, 84, PMID:12595137 (2002) 1095–1103.
126. Bourguet, D., Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the European corn borer: What chance for Bt maize? Physiol. Entomol. 29 (2004) 251–256.
127. Travers, R.S., Martin, P.A.W. ve Reichelderfer, C.F., Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp., Applied and Environmental Microbiology, (1987) 1263-1266.
128. Cappuccino, J. G. ve Sherran, N., Microbiology, a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York, 1992.
129. Sneath, A. P., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, Sneath, A. P., Mair, N. S., Sharge, M. S. ve Holt, J. G., Williams and Wilkins, Baltimore, 1968.

130. Benson, H. J., Microbiological Applications, a Laboratory Manuel in General Microbiology, Brock, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, 1985.
131. Ben-Dov, E., Boussiba, S. ve Zaritsky, A., Mosquito Larvicidal Activity of *Escherichia coli* with Combinations of Genes from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*, J. Bacteriol., (1995) 2581-2587.
132. Stackebrandt E. ve Swiderski J., From phylogeny to systematics: the dissection of the genus *Bacillus*, Berkeley R., Heyndrickx M., Logan N. ve De Vos P. (ed.), Applications and systematics of *Bacillus* and relatives, S822, Blackwell, Malden, 2002.
133. Springer B., Stockman L., Teschner K., Roberts G. D., ve Bottger E. C., Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods, J. Clin. Microbiol., 34 (1996) 296–303.
134. Lechner S, Mayr R, Francis K., P., PruB., M, Kaplan T., WieBner-Gunkel E., Stewart G., S., A., B. ve Scherer S., *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group, Internetonial Journal of Systematic Bacteriology, 48 (1998) 1373-1382.
135. Stackebrandt E. ve Goebel B., M., Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology, Int. J. Syst. Bacteriol., 44 (1994) 846-849.
136. Ben-Dov E., Zaritsky A., Dahan E., Barak Z., Sinai R., Manasherob R., Khameraev A., Troitskaya E., Dubitsky A., Berezina N. ve Margalith Y., Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*, Appl. Environ. Microbiol. 63 (1997) 4883-4890.
137. Katı H., Sezen K., Nalçacıoğlu R. ve Demirbağ Z., A Highly Pathogenic Strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* in Lepidopteran Pests, The Journal of Microbiology, 45 (2007) 553-557.
138. Logan N. A., ve R. C. W. Berkeley, Identification of *Bacillus* strains using the API system, J. Gen. Microbiol., 130 (1984) 1871-1882.
139. Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe A. ve Fujiwara T., Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov. and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57 (2007) 1117-1125.
140. Kellen W.R., Clark T.B., Lindegren J.E., Ho B.C., Rogoff M.H. ve Singer, S., *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes, J. Invertebr. Pathol., 7 (1965) 442-448.

141. Mathavan S., Velpandi A. ve Johnson J.C., Sub-toxic effects of *Bacillus sphaericus* 1593M on feeding growth and reproduction of *Laccotrephes griseus* (Hemiptera: Nepidae), Exp. Biol., 46 (1987) 149-153.
142. Davidson E.W., Morton H.L., Moffett J.O. ve Singer S., Effect of *Bacillus sphaericus* Strain SSII-1 on Honey Bees, Apis-Mellifera, J. Invertebr. Pathol., 29 (1977) 344-346.
143. Brown I.D., Watson T.M., Carter J., Purdie D.M. ve Kay B.H., Toxicity of VectoLex (*Bacillus sphaericus*) products to selected Australian mosquito and nontarget species, J. Econ. Entomol., 97 (2004) 51-58.
144. Tietze N.S., Olson M.A., Hester P.G. ve Moore J.J., Tolerance of sewage treatment plant microorganisms to mosquitocides, J. Am. Mosquito Control Assoc., 9 (1993) 477-479.
145. Jones W. G., Nielsen-Leroux C., Yang Y., Yuan Z., Dumas V. F., Monnerat R. G. ve Berry C., A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*, FASEB Journal, 21 (2007) 4112-4120.
146. Sezen K., Muratoğlu H., Nalçacıoğlu R., Mert D., Demirbağ Z. ve Katı H., Highly pathogenic *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* from European shot-hole borer, *Xyleborus dispar* (Coleoptera: Scolytidae), New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science, 36 (2008) 77-84.
147. Katı H., Sezen K. ve Demirbağ Z., Characterization of a Highly Pathogenic *Bacillus thuringiensis* Strain Isolated from Common Cockchafer, *Melolontha melolontha*, Folia Microbiol. 52 (2007) 146-152.
148. Nakamura L. K., Taxonomic Relationship of Black-Pigmented *Bacillus subtilis* Strains and a Proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov., International Journal of Systematic Bacteriology (1989) 295-300.
149. Zhu Y-J., Liu G-H. ve Liu B., Pilot study on geographic diversity of *Bacillus* species in soil of China, <http://www.yzxz.com/images/upfile/2009-8/200981205950.doc> 18 Temmuz 2012
150. Hongyu Z., Ziniu Y. ve Wangxi D., Composition and Ecological Distribution of Cry Proteins and Their Genotypes of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Warehouses in China, Journal of Invertebrate Pathology, 76 (2000) 191-197.

8. EKLER

Ek 1. Besiyeri, Ayıraç, Boyalar ve Kimyasalların Hazırlanışı

Ek 1. 1. Besiyerlerinin Hazırlanışı

Leura-Bertani Agar (LB Agar): 500 ml besiyeri için 5 g tripton, 2,5 g yeast extract, 2,5 g sodyum klorür (NaCl) ve 6 g agar-agar tartılarak saf su ile 500 ml ye tamamlanır, otoklavlanarak steril edilir.

Leura-Bertani Broth (LB Broth): 500 ml besiyeri için 5 g tripton, 2,5 g yeast extract ve 2,5 g sodyum klorür (NaCl) tartılarak saf su ile 500 ml ye tamamlanır, otoklavlanarak steril edilir.

Nişasta Agar: 1g nişasta 10 ml soğuk ddH₂O'da çözüldükten sonra 100 ml nütrient agarla karıştırılır ve otoklavlanarak steril edilir.

Nütrient Agar (NA): Ticari olarak satılan hazır nütrient agar kullanıldı. 1000 ml besiyeri için 28 g tartılıp 1000 ml ye tamamlanır ve otoklavlanarak steril edilir. Kullanılan marka: Fluka, Katalog no: 70148

Nütrient Broth (NB): Ticari olarak satılan hazır nütrient broth kullanıldı. 1000 ml besiyeri için 13 g tartılıp 1000 ml ye tamamlanır ve otoklavlanarak steril edilir. Kullanılan marka: LAB M, Katalog No: 061915

Tryptic Soy Agar (TSA): Ticari olarak satılan hazır besiyeri kullanıldı. 1000 ml besiyeri için 40 g tartılıp 1000 ml ye tamamlanır ve otoklavlanarak steril edilir. Kullanılan marka: Merck, Katalog no: 1,05458,0500

Spor Zorlayıcı Besiyeri: 50 mg mangan sülfat (MnSO₄), 100 mg kalsiyum klorür (CaCl₂), 500 mg magnezyum sülfat (MgSO₄), 28 g nütrient agar tartılıp saf su ile 1000 ml ye tamamlanır ve otoklavlanarak steril edilir.

MacConkey Agar (MCA): Ticari olarak satılan hazır besiyeri kullanıldı. Kullanılan marka: Merck, Katalog no: 1,05465,0500

Ek 1.2. Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı

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

Gram İyodu: 1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür (KI) 5 ml saf suda çözülüp; üzerine 250 ml saf su ve 60 ml % 5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ilave edilir.

Kristal Violet Boyası: Bu boya için iki ayrı solüsyon hazırlanıp ardından ikisi birbirine karıştırılır: 1) 1 g kristal violet, 10 ml %95'lik etanol, 90 ml saf su ile karıştırılır. 2) 4 g amonyum oksalat ve 400 ml saf su ile karıştırılır. Bu iki solüsyon daha sonra birbirine karıştırılarak 1 gece bekledikten sonra kullanılır.

Malaşit Yeşili: 5 g malaşit yeşili 100 ml saf suda çözülür; süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek kullanılır.

Safranin: 2,5 g safranin O, 100 ml etanol ve 500 ml saf su karıştırılarak hazırlanır.

Ek 1.3. Kimyasalların Hazırlanışı

X-Gal Hazırlanışı: 0,1M 10 ml hazırlamak için 400 mg tartılıp 10 ml ye tamamlanır, filtre yardımıyla steril edilir. X-Gal moleküler ağırlığı; 408,61 g'dir.

IPTG Hazırlanışı: 0,1M 10 ml hazırlamak için 238,3 mg tartılıp 10 ml'ye tamamlanır, filtre yardımıyla steril edilir. IPTG moleküler ağırlığı; 238,3 g'dir.

Ampicilin Sulandırılması: 1 g tuzlu ampicilin 9,5 ml saf suda çözülür ve filtre yardımıyla steril edilir.

TENS(Tris-EDTA-NaOH-SDS) Hazırlanışı: 10 mM pH 8,0 Tris, 1mM pH 8,0 EDTA, 0,1 N NaOH ve %0,5 SDS ile hazırlanır.

3M pH 5,2 Sodyum Asetat Hazırlanışı(100ml): 40,824 g sodyum asetat 50 ml saf suda çözüldükten sonra asetik asit yardımıyla pH'ı 5,2'ye ayarlanır ve daha sonra 100 ml'ye tamamlanır. Otoklavlanarak kullanılır.

Ek 2., Elde Edilen İzolatların 16S rRNA Gen Sıraları

B1:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAGCCTCGCGGC
 TTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATG
 TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACC
 GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCC
 CCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTA
 AACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTC
 GCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTC
 GCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCC
 ACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGA
 GCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACGCCC
 AATAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGT
 AGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTTCGAACG
 GTACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTC
 ACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTG
 CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCT
 CAGGTCCGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTA
 ATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCTAAAAGCCACCTTTTATGATTG
 AACCATGCGGTTCAATCAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATC
 CCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCTGACCTA
 AGGGAGCAAGCTCCCATCGGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCC
 AGCGTTCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

B2:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCTGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACCTGAGAACGACTTTATCGGATTAGCTCCCTCTCGCGAG
 TTGGCAACCGTTTGTATCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCAACCGTTGCCCCCGAAGGGGAAACTATATCTCTACAGTGGTCAACGGGA
 TGTCAAGACCTGGTAAGNTCTTCGCGTTGCTTCGAAATAAACACATGCTCCNC
 CGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCC
 CCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCC
 TAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGT
 TTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGATAGTCGCTTT
 CGCCACTGGTGTTCCTCCAAATCTCTACGCATTTACCCGCTACACTTGGAAATC

CACTATCCTCTTCTGCACTCAAGCCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTG
 AGCCGTGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCC
 CAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACG
 TAGTTAGCCGTGGCTTTCTAATAAGGTACCGTCAAGGTACAGCCAGTTACTACT
 GTACTTGTCTTCCCTTACAACAGAGTTTACGAACCGAAATCCTTCTTCACTC
 ACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTGCCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTG
 CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCT
 CAGGTTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTA
 ATGCGCCGCGGGCCCATCCTATAGCGACAGCCGAAACCGTCTTTTCAAGTATTTT
 ACCATGAGATGAAATAAATTATTCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCC
 CAACTATAGGGTAGGTTGCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTC
 AAAGGAGCAAGCTCCTTCTCTGTTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCG
 CAGCGTTCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

B3:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTATGGGATTGGCTAAACCTTGCGGT
 CTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCGACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTGAGAGGATG
 TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACC
 GCTTGTGCGGGCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTTCGACCCGACTCCCC
 AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAA
 CACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCG
 CTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGC
 CACTGGTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCAC
 TCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGC
 CGGGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAA
 TAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT
 TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCGAGCAGTTACTCTCGCAC
 TTGTTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGC
 GCGGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC
 CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAG
 GTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTAGCTAATG
 CGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACC
 ATGCGGTTCAAGGAACTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAG
 TCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCCGGG
 AGCAAGCCCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT
 TCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

B4:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGT
 TTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGCTTGTACCAGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGGTCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAAATTAACCACATGCTCCAC
 CGCTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCC
 CCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCT
 AACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
 CGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTC
 GCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCC
 ACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGA
 GCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCC
 AATAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGT
 AGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACG
 GTACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTC
 ACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTG
 CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCT
 CAGGTCCGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACTAGCTAA
 TGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAAC
 CATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCA
 GTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCGCTAACATCAG
 GGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGTCATGTATTAGGCACGCCGCCAG
 CGTTCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

B5:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAGCCTCGCGGC
 TTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCAGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATG
 TCAAGACCTGGTAAGGATTCTTCGCGTGCTTCGAAATAAACACATGCTCCACC
 GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCC
 CAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTAAAGGGGCGGAAACCCTCTA
 AACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGAACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
 CGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTT
 CGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCC
 CACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTG
 AGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACGCC

CAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACG
 TAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTTCGAAC
 GGTAATTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACT
 CACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCT
 GCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTC
 TCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTA
 ATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCTGAAAGCCACCTTTTATAATTG
 AACCATGCGGTTCAATCAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATC
 CCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTGACATC
 AGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCC
 AGCGTTCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

Bg1:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGT
 TTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGNTCTCGCGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCG
 CTTGTGCGGGCCCCNGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCC
 CAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTA
 AACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTC
 GCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCC
 CCACTGGTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCCA
 CTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAG
 CCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTCACGCCCA
 ATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA
 GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGG
 CACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCA
 CGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGC
 CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTC
 AGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAAT
 GCGCCGCGGGTCCATCTGCAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAAC
 CATGCGGTTACAGACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCA
 GTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAG
 GGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAG
 CGTTCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

Bg2:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACCTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGT
 CTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCC
 GCTTGTGCGGGCCCCGTGCAATTCCTTTGAGTTTCAAGCCTTGCGGGCCCGTACT
 CCCCCAGGCGGAGGTGCTTAAATGCGTTAACTTCAGGCACTAAAGGGGCGGGA
 AACCTCTAACACTTAGCACTAATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTA
 ATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTACGTTACAGACCAGAAAG
 TCGCCTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCCGCTACACATG
 GAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCA
 CGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTT
 TACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTG
 GCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATT
 CAACTAGCACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCA
 TCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTA
 CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCA
 CCCTCTCAGGTTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACT
 AACTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCACCTTTCAAT
 TTCGAACCATGCAGTTCAAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCAGGAT
 TATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCTAA
 CTTCATAAGAGCAAGCTCTTAATCCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACG
 CCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

Bg3:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTATGGGATTGGCTAAACCTTGCGGT
 CTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATG
 TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACC
 GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAAGTCTTGCAGCCGACTCC
 CCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCT
 AACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
 CGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTC
 GCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCC
 ACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGA
 GCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCC

CATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGCTGCTGGCACGTA
 GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAGGTACCGTTCAAGTGTGAGCAGTTACTCTCG
 CACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCA
 CGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGC
 CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTC
 AGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTAGCTAA
 TGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAAC
 CATGCGGTTCAAGGA ACTATCCGGTATTAGTCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCA
 GTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCCGG
 GAGCAAGCTCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGC
 GTTCGTCTGAGCCATGATCAA ACTCTAGAAT

Bg4:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGC
 AGCCTGCAATCCGA ACTGAGAATGGTTTTATGGGATTGGCTAGACCTTGCGGC
 TTTGCGACCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAACGTCCTATCTCTAGGAGTGTGAGAGGA
 TGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCAC
 CGGCTGTGCGGGCCCCAGTCAATTCCTATGAGTTCCAGCATGGCGGCCGTA
 CCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAAACCC
 CCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
 GTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAAGCCG
 CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGA
 ATTCCGCTTTCCTCCTCTGCACTCAAGTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACG
 GTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAGGACCGCCTGCGCGCGCTTTA
 CGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGG
 CACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGGCAGTTAC
 TCCGGTACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGACCCGAAGGCCTTCATC
 GCTCACGCGGCGTCTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACT
 GCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCAC
 CCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTA
 GCTAATGCGCCGCGGGCCATCTGTAAGTGTGAGCCGAAACCGACTTTCAGTT
 TTCCAACATGAGTTGAAAAAGATTATCCGGTATTAGTCTCCGGTTTCCCGAAGTT
 ATCCAGTCTTACAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAAC
 CATTGGGAGCAAGCTCCCAACGATTCGCTCGACTTGCATATATTAGGCACGCC
 GCCAGCGTTCGTCTGAGCCATGATCAA ACTCTAGAAT

Bg5:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACATATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACCTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGT
 CTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGTCCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG
 CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTION
 CAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTA
 ACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTC
 GCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTACAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCC
 CCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCA
 CTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAG
 CCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCCA
 ATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA
 GTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAG
 CACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCA
 CGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGC
 CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTC
 AGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAAT
 GCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCTTTCATTTCTAAC
 CATGCAGTTCAAATATTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTTCCCGGAGTTATCCCA
 GTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACTTCATA
 AGAGCAAGCTCTTAATCCATTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCA
 GCGTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

N1:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTATGGGATTGGCTAAACCTTGCGGT
 CTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATG
 TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACC
 GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCC
 CCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCT
 AACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
 CGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTC
 GCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCC
 ACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGA
 GCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCAGCTGCGAGCCCCCTTACGCC

AATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGT
 AGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCGAGCAGTTACTCTCG
 CACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCA
 CGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGC
 CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCT
 AGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTAGCTAA
 TGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAAC
 CATGCGGTTCAAGGA ACTATCCGGTATTAGTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCA
 GTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCCGG
 GAGCAAGCTCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGC
 GTTCGTCTGAGCCATGATCAA ACTCTAGAAT

N2:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAGCCTCGCGGC
 TTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATG
 TCAAGACCTGGTAAGGTTCCNNGCGTTGCTTCGAATTA AACACATGCTCCACC
 GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTGAGTTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCC
 CAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGTCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTA
 AACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTC
 GCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTC
 GCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCC
 ACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGA
 GCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACGCCC
 AATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGT
 AGTTAGCCGTGGCCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTCGAACG
 G TACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTC
 ACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTG
 CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCT
 CAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTA
 ATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCTAAAAGCCACCTTTTATGATTG
 AACCATGCGGTTCAATCAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATC
 CCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTGACCTA
 AGGGAGCAAGCTCCCGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCC
 AGCGTTCGTCTGAGCCATGATCAA ACTCTAGAAT

N4:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AGACTGCGATCCGAACACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAGCCTCGCGGCT
 TCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGG
 GCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAC
 CTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTG
 CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACC
 TGTCACTCTGCCCCGAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTGAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG
 CTTGTGCGGGCCCCCGTCAACTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCC
 CAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTA
 AACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTC
 GCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTC
 GCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCC
 ACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGA
 GCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACGCCC
 AATAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGT
 AGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTGCAACG
 GTACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTC
 ACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTG
 CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCT
 CAGGTCCGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTA
 ATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCTAAAAGCCACCTTTTATGATTG
 GAACCATGCGGTTCAATCAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTAT
 CCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCTGACCT
 AAGGGAGCAAGCTCCCGTCGGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGC
 CAGCGTTCGTCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

N5:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AGACTGCGATCCGAACACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGT
 TTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGGTTGTGAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCG
 CTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCC
 AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCTAAC
 ACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGC
 TCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCC
 ACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCCACT
 CTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCC
 GGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCCAAT

AATTCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT
 AGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGCA
 CTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACG
 CGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCT
 CCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCA
 GGTCCGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATG
 CGCCGCGGGTCCATCTGCAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACC
 ATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAG
 TCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGG
 GAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGC
 GTTCGTCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

N6:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACCTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGT
 CTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCATGCTCACCCG
 TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAG
 GCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACA
 CTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGT
 CCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCA
 ACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAATTCCACT
 TTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCC
 GTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCCAAT
 AATTCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT
 AGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCAC
 TTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGGAAGCCTTCATCACTCACGC
 GGCCTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC
 CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAG
 GTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGC
 GACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTCAATTTCAACCA
 TGCAGTTCAAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGT
 CTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACTTCTTGAG
 AGCAAGCTCTCAATCCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGC
 GTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

N7:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTATGGGATTGGCTAAACCTTGCGGT
 CTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATG
 TCAAGACCTGGTAAGGGTCTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACC
 GCTTGC GCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCC
 AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAA
 CACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCCG
 CTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGC
 CACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCCAC
 TCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGC
 CGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCAA
 TAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT
 TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCGAGCAGTTACTCTCGCAC
 TTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGC
 GCGGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC
 CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAG
 GTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTAGCTAATG
 CGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACC
 ATGCGGTTCAAGGAACTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAG
 TCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCGCTAACATCCGGG
 AGCAAGCTCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT
 TCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

N9:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
 AGCCTACAATCCGAACCTGAGAACGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGT
 CTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGTCCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGT
 CAAGACCTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGC
 TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTGAGTTCAGCCTTGCGGCCGTA TCTCCCCAG
 GCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCCTCTAACA
 CTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCT
 CCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCC
 ACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAATTCCACT
 TTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCC
 GTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCCACCTGCGCGCGCTTTACGCCAAT

AATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGATGGCACGTAGTT
 AGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCAC
 TTGTTCTTCCCTAACAAACAGGGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGC
 GGC GTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC
 CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAG
 GTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGC
 GACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAATTTTCGAACCA
 TGCAGTTCAAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTTCCCGGAGTTATCCCAGT
 CTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACTTCTTGAG
 AGCAAGCTCTCAATCCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGC
 GTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

N10:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 AGACTGCGATCCGAACAGACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGT
 CTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
 CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
 CTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGAATCCCTATCTCTAGGGGTGTCAGAGGATG
 TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGTTTGAATTAACCACATGTTCCCTCGCT
 TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAG
 GCGGAGTGCTTAATGCGTTAGGTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACCA
 CTTAGTACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCCGCT
 CCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGGCCAGAGAGTCGNTTTCGCC
 ACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCCACT
 CTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCC
 GGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCCAAT
 AATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT
 AGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCAC
 TTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGC
 GGC GTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC
 CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAG
 GTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACTAGCTAATGC
 GCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCAT
 GCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTTCCCGGAGTTATCCCAGTC
 TTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGA
 GCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTT
 CGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

F1:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
 CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
 GGACTGCGATCCGAACAGACTGAGAACAGATTTATGGGATTGGCTAACCTTGCGGT

CTTGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGG
GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACACCGGCAGTCA
CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
CTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATG
TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACC
GCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTAATCCCC
AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGACTAAGGGGCGGAAACCCCTAA
CACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCG
CTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCCGCTTCGC
CACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCAC
TCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGC
CGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCCAA
TAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT
TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCGAGCAGTTACTCTCGCAC
TTGTTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGC
GGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC
CCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAG
GTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACTAGCTAATG
CGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACC
ATGCGGTTCAAGGAACTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAG
TCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCCGGG
AGCAAGCTCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGT
TCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

F2:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
AGACTGCGATCCGAACAGACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTGCGGT
CTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAAGG
GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACACCGGCAGTCA
CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
CTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATG
TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACC
GNTTNGCGGNCCCGTCANNCTTTGAGTTCAGTNTGCNNCGTACTCCCCAGGCG
GAGTGCTTATGCGTNAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTACACTTAG
CACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCA
CGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCCGCTTCGCCACTGGT
GTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCCTC
TTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGC
TTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCCAATAATTCCG
GACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGT
GGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCAAGCAGTTACTCTTGCACCTGTTCT
TCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTT
GCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAG
GAATCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCT

ACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCG
GGTCCATCTGTAAAGTGACAGCCGAAGCCGTCTTTCATCCTTGAACCATGCGGTT
CAAGGAACTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAG
GCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCCGGGAGCAAGC
TCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCT
GAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

F3:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
AGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTTTTATGGGATTGGCTTGACCTCGCGGT
CTTGACAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
CCTTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
CTGTCACTCTGTCCCCCGAAGGGGAACGCTCTATCTCTAGAGTTGTACAGAGGAT
GTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCAC
CGGCTTGTGGCGGGCCCCGGTCAATTCCTTGAGTTTCAGTCTTTCGACCCGTA
CCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGGAAACCC
TCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
GTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAAAGCCGC
CTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAA
TTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGT
TGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTTACG
CCCAATAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
CGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACGAGCAGTTACTC
TCGTACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCAC
TCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGC
TGCTTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCT
CTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCT
AATGCACCGCGGGCCCATCTGTAAGTGATAGCCGAAACCATCTTTCAATCATC
TCCCATGAAGGAGAAGATCCTATCCGGTATTAGCTTCGGTTTCCCGAAGTTATC
CCAGTCTTACAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTC
ATAGAAGCAAGCTTCTAATCAGTTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCG
CCAGCGTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

F4:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
CGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGC
AGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTTTTATGGGATTGGCTTGACCTCGCGGT
CTTGACAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
CCTTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
CTGTCACTCTGTCCCCCGAAGGGGAACGCTCTATCTCTAGAGTTGTACAGAGGAT

GTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTGTGCTTCGAATTAACCACCATGCTCCC
 ACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTCTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTAC
 TCCCCAGGCGGAGTGCCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACC
 CTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC
 TGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAAAGCCGC
 CTTCCGCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACACCGCTACACGTGGAA
 TTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTCTCCAATGACCCTCCACGGT
 TGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTTACG
 CCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
 CGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACGAGCAGTTACTC
 TCATACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCAC
 TCACGCGGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGC
 TGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCT
 CTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCT
 AATGCACCGCGGGGCCATCTGTAAGTGATAGCCGAAACCATCTTTCAATCATC
 CCCCATGAAGGAGAAGATCCTATCCGGTATTAGCTTCGGTTTCCCGAAGTTATC
 CCAGTCTTACAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACGTC
 ATAGAAGCAAGCTTCTAATCAGTTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCG
 CCAGCGTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

F5:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTG
 TGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAG
 CGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAG
 ATTTATGGGATTGGCTAAACCTTGGCGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTG
 TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCC
 ACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTAAATGCTG
 GCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACATAACCCAACATCTCACG
 ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAA
 GCCCTATCTCTAGGGTTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGNTCTCGCGTT
 GCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTAGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTT
 TGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCT
 GCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCG
 TGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCG
 TCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTAC
 GCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCC
 CAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAG
 AAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCGGGACAACGCTTGCCACCT
 ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTAC
 CGTCAAGGTGCGAGCAGTTACTCTCGCACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGCTT
 TACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTC
 CATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCA
 GTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCAGGTCCGGTACGCATCGTCGCCTTGGTG
 AGCCATTACCCCACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGACA
 GCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCATGCGGTTCAAGGAACTATCCGGTATT
 AGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTA
 CTCACCCGTCCGCGCTAACATCCGGGAGCAAGCTCCCTTCTGTTTCGCTCGACT

TGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCTA
GAAT

F6:

ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
CGGCATGCTGACCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGC
AGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTGCGGT
CTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCA
CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
CTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTACAGAGGATG
TCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCG
CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCC
AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAA
CACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCG
CTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGC
CACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAATTCAC
TCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGC
CGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCCAA
TAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT
TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCAAGCAGTTACTCTTGAC
TTGTTCTTCCCTAACAACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGC
GGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC
CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAG
GTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGC
GCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGATAGCCGAAACCGTCTCTCATCCTTGAACCAT
GCGGTTCAAGGAACTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTC
TTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCTAACATCCGGGA
GCAAGCTCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTT
CGTCCTGAGCCATGATCAAACCTCTAGAAT

ÖZGEÇMİŞ

Meriç DEMELİ 04.01.1987 tarihinde Trabzon'da doğdu. Liseyi Trabzon Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Lisans eğitimi almaya hak kazandı. 2009 yılında bu bölümden Biyolog unvanıyla mezun oldu. Aynı yıl içinde Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.