

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***CAPNODIS TENEBRIONIS*'TEN BAKTERİ İZOLASYONU VE BU BAKTERİLERİN  
İNSEKTİSİDAL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ebru GÜNEY**

**ARALIK 2016**  
**TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /**

**Tezin Savunma Tarihi : / /**

**Tez Danışmanı :**

**Trabzon**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalında  
Ebru GÜNEY Tarafından Hazırlanan**

**CAPNODIS TENEBRIONIS'TEN BAKTERİ İZOLASYONU VE BU BAKTERİLERİN  
İNSEKTİSİDAL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

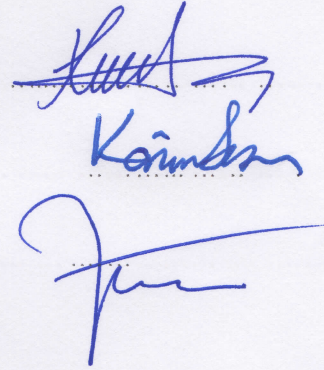
başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 13 / 12 / 2016 gün ve 1680 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU**

**Üye : Prof. Dr. Kazım SEZEN**

**Üye : Doç. Dr. Hatice KATI**



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“*Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae)’ten Bakteri İzolasyonu ve Bu Bakterilerin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi” 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 çalışmalarım sırasında beni yönlendiren, her türlü desteği sağlayan ve değerli bilgilerinden faydalandığım sayın hocam Prof. Dr. Kazım SEZEN’e, laboratuvarında maddi manevi imkanlarını esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, laboratuvar çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları ilgiden dolayı Prof. Dr. İsmail DEMİR, Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim. Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, daima yanımda olan sevgili aileme de teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, çalışmalarına destek sağlayan KTÜ BAP (FYL-2016-5366) Birimine ve TÜBİTAK 2210/C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programına desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Ebru GÜNEY  
Trabzon 2016

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Capnodis tenebrionis*’ten Bakteri İzolasyonu ve Bu Bakterilerin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. 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. 30/12/2016

Ebru GÜNEY

## 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. Meyve Üretimi ve Önemi.....	3
1.3. <i>Capnodis tenebrionis</i> .....	6
1.3.1. Tanımı ve Biyolojisi.....	6
1.3.2. Zarar Şekli Ekonomik Önemi ve Yayılışı .....	7
1.4. Tarım Zararlılarıyla Mücadele Yöntemleri .....	9
1.4.1. Kimyasal Mücadele'nin Çevreye ve İnsanlara Olan Etkisi .....	10
1.4.2. Biyolojik Mücadele .....	12
1.4.3. Mikrobiyal Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar .....	13
1.4.3.1. Virüsler.....	13
1.4.3.2. Funguslar .....	14
1.4.3.3. Nematodlar .....	15
1.4.3.4. Protozoonlar .....	15
1.4.3.5. Bakteriler.....	16
1.4.4. <i>Capnodis tenebrionis</i> ile Mücadele.....	20
1.5. Çalışmanın Amacı .....	21
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	22
2.1. <i>Capnodis tenebrionis</i> 'in Toplanması .....	22
2.2. <i>Capnodis tenebrionis</i> 'ten Bakterilerin İzolasyonu.....	22

2.3.	Saf Kùltürlerin Hazırlanması ve Stoklanması.....	22
2.4.	İzolatların Morfolojik ve Boyama Özelliklerinin Belirlenmesi .....	23
2.4.1.	Gram Boyama .....	23
2.4.2.	Endospor Boyama .....	23
2.5.	İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi .....	24
2.5.1.	Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi .....	24
2.5.2.	pH Aralıklarının Belirlenmesi .....	24
2.5.3.	NaCl Toleranslarının Belirlenmesi.....	24
2.6.	İzolatların Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi.....	25
2.6.1.	Nişasta Hidroliz Testleri.....	25
2.6.2.	Katalaz Testleri .....	25
2.6.3.	Oksidaz Testleri .....	25
2.6.4.	MacConkey Agar Üzerinde Büyüme Yeteneklerinin Belirlenmesi .....	25
2.6.5.	API Test Kitleri ile Bakteriyel İzolatların Tanımlanması .....	26
2.6.5.1.	API 20E Panel Test Sistemi .....	26
2.6.5.2.	API 50 CH Panel Test Sistemi .....	26
2.6.6.	VITEK-2 Test Kitleri ile Bakteriyel İzolatların Tanımlanması .....	27
2.7.	Bakteriyel İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi .....	27
2.7.1.	Genomik DNA İzolasyonu.....	27
2.7.2.	16S rDNA Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması.....	28
2.7.3.	<i>Bacillus</i> Cinsine Ait İzolatlarının <i>cry</i> Gen İçeriklerinin Belirlenmesi .....	28
2.7.4.	16S rDNA Gen Bölgelerinin pGEM-T Vektörüne Klonlanması .....	29
2.7.5.	Kompotent Hücre Hazırlanması.....	29
2.7.6.	16S rDNA Gen Bölgelerinin Kompotent <i>E. coli</i> JM101'e Aktarımı.....	29
2.7.7.	Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz ( <i>EcoRI</i> ) ile Muamelesi .....	30
2.7.8.	Klonların İçerdiği DNA Parçalarının Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi.....	31
2.7.9.	Elde Edilen Baz Dizilimlerinin İncelenmesi .....	31
2.7.10.	<i>Bacillus</i> Cinsi İzolatların Protein İçerikleri.....	31
2.7.10.1.	<i>Bacillus</i> Cinsi İzolatların Spor ve Kristal Süspansiyonlarının Hazırlanması...31	
2.7.10.2.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	32
2.7.10.3.	Kristal Boyama.....	32

2.8.	Bakteriyel İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.....	32
2.8.1.	<i>Galleria mellonella</i> İçin Yarı Sentetik Besin Hazırlanması.....	32
2.8.2.	<i>C. tenebrionis</i> 'ten İzole Edilen Bakterilerin İnsektisidal Aktivite Testleri...	33
3.	BULGULAR.....	34
3.1.	<i>Capnodis tenebrionis</i> Larva ve Erginlerinden Bakteri İzolasyonu .....	34
3.2.	Bakteriyel İzolatların Morfolojik ve Boyama Özellikleri .....	34
3.3.	Bakteriyel İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri .....	37
3.4.	Bakteriyel İzolatların Moleküler Karakterizasyonu.....	57
3.4.1.	16S rDNA Dizileri ve Filogenetik Analizi.....	57
3.4.2.	<i>Bacillus</i> Cinsi İzolatların <i>cry</i> Gen İçerikleri .....	61
3.4.3.	<i>Bacillus</i> Cinsi İzolatların Kristal Protein Profilleri .....	62
3.5.	İnsektisidal Aktivite Çalışmaları .....	62
3.5.1.	İzolatların <i>Pyrrhalta luteola</i> Üzerindeki İnsektisidal Etkileri.....	62
3.5.2.	İzolatların <i>Galleria mellonella</i> (Petek Güvesi) Üzerindeki İnsektisidal Etkileri.....	63
3.5.3.	İzolatların <i>Tenebrio molitor</i> (Un Kurdu) Üzerindeki Doz Denemeleri .....	64
4.	TARTIŞMA .....	66
5.	SONUÇLAR .....	74
6.	ÖNERİLER.....	75
7.	KAYNAKLAR.....	76
8.	EKLER.....	84
	ÖZGEÇMİŞ	



Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

*CAPNODIS TENEBRIONIS*'TEN BAKTERİ İZOLASYONU VE BU BAKTERİLERİN  
İNSEKTİSİDAL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Ebru GÜNEY

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Kazım SEZEN  
2016, 83 sayfa, 16 sayfa ek

*Capnodis tenebrionis* Coleoptera takımından birçok meyve ağacında ciddi zararlar meydana getiren önemli bir tarım zararlısıdır. Bu sebeple hem ülkemizde hem de birçok Asya ve Avrupa ülkesinde bu zararlı ile mücadele büyük önem taşımaktadır. *C. tenebrionis* ile mücadele kimyasal insektisitlerle yapılmaktadır. Ancak kimyasal insektisitlerin hem doğaya hem de canlılara zararlılarında dolayı alternatif yöntemler önem kazanmıştır. Bu nedenle bu zararlı ile mücadelede bakterilerin kullanılmasına yönelik yapılan bu çalışmada *C. tenebrionis* larva ve erginlerinden 21 adet bakteriyel izolat elde edildi ve bu izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlendi. Yapılan karakterizasyon çalışmalarına göre *C. tenebrionis*'in bakteriyel florası, *Bacillus cereus* (E-1, E-4, E-5, E-6, ÖL-4, L-2, L-5, L-6) *Bacillus mycoides* (ÖL-1), *Bacillus pumilus* (L-7), *Paenibacillus xylanilyticus* (L-8), *Bacillus flexus* (L-9), *Bacillus simplex* (L-10, ÖL-5), *Raoultella terrigena* (L-1), *Enterobacter cloacae* (L-3), *Klebsiella oxytoca* (E-2), *Bacillus anthracis* (L-4), *Bacillus safensis* (E-3), *Bacillus amyloliquefaciens* (ÖL-2), *Bacillus aryabhatai* (ÖL-3) şeklinde belirlendi. Bakteriyel izolatların karaağaç yaprak böceği (*Pyrrhalta luteola*), un kurdu (*Tenebrio molitor*) ve petek güvesi (*Galleria mellonella*) larvaları üzerinde insektisidal aktiviteleri araştırıldı. ÖL-4, E-4 ve E-5 numaralı izolatların bu larvalar üzerinde en yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu tespit edildi. Bu izolatların *C. tenebrionis*'e karşı etkili bir bakteriyel mücadele etmenleri olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler** : Biyolojik mücadele, Bakteriyel flora, *Capnodis tenebrionis*, Coleoptera

Master Thesis

SUMMARY

BACTERIAL ISOLATION FROM *CAPNODIS TENEBRIONIS* AND  
DETERMINATION OF THE INSECTICIDAL EFFECTS OF THESE BACTERIA

Ebru GÜNEY

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Kazım SEZEN  
2016, 83 Pages, 16 Pages Appendix

*Capnodis tenebrionis* is one of the pests which create critical harm on the most of fruit trees from Coleoptera order. Therefore, struggle with these harmful pests is very crucial in both in our country and in the countries of Asia and Europe. The struggle with *C. tenebrionis* is done by insecticides. However, the alternative methods have gained importance because of insecticides's the damage of both nature and all creatures. Because of this reason, in this studying which aimed to struggle with this pest, 21 bacterial isolate from larvae and adults of *C. tenebrionis*'s have been obtained and the morphological, physiological, biochemical and molecular properties have been defined. Due to this characterization studies, the bacterial flora of *C. tenebrionis* was defined as, *Bacillus cereus* (E-1, E-4, E-5, E-6, OL-4, L-2, L-5, L-6) *Bacillus mycoides* (OL-1), *Bacillus pumilus* (L-7), *Paenibacillus xylanilyticus*, (L-8), *Bacillus flexus* (L-9), *Bacillus simplex* (L-10, OL-5), *Raoultella terrigena* (L-1), *Enterobacter cloacae* (L-3), *Bacillus anthracis* (L-4), *Klebsiella oxytoca* (E-2), *Bacillus safensis* (E-3), *Bacillus amyloliquefaciens* (OL-2), *Bacillus aryabhatai* (OL-3). The insecticidal activities of the bacterial isolates on the larvae of the elm leaf beetle (*Pyrrhalta luteola*), the mealworm (*Tenebrio molitor*) and the honeycomb moth (*Galleria mellonella*) were investigated. It is detected that isolates with a number of OL-4, E-4 and E-5 have the highest lethal effect on these harmful larvae. These isolates are considered as an effective pest control factor.

**Key Words** : Bacterial flora, Biological control, *Capnodis tenebrionis*, Coleoptera

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. <i>Capnodis tenebrionis</i> 'in biyolojisi .....	7
Şekil 2. <i>Capnodis tenebrionis</i> 'in yaşam döngüsü.....	8
Şekil 3. <i>C. tenebrionis</i> 'in meydana getirdiği zarar şekilleri. ....	9
Şekil 4. <i>Bacillus thuringiensis</i> bakterisinin elektron mikroskopik görünümü.....	17
Şekil 5. <i>Bacillus thuringiensis</i> kristallerinin elektron mikroskopik görüntüsü.....	18
Şekil 6. Kristal proteinlerin etki mekanizması.....	19
Şekil 7. Gram boyama sonucu elde edilen hücre görüntüsü .....	35
Şekil 8. Spor boyama sonucu elde edilen hücre görüntüsü .....	35
Şekil 9. API 50CHB test sistemi görüntüsü.....	42
Şekil 10. API 20E test sistemi görüntüsü.....	42
Şekil 11. Bazı İzolatların PCR ile çoğaltılmış 16S rRNA bölgelerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü .....	57
Şekil 12. Gram pozitif izolatların 16S rDNA bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı.....	60
Şekil 13. Gram negatif izolatların 16S rDNA bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı.....	61
Şekil 14. İzolatların PCR ile çoğaltılmış <i>cry1</i> ve <i>cry2</i> gen bölgelerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü .....	61
Şekil 15. İzolatların gümüş nitrat ile boyanmış protein profilleri.....	62
Şekil 16. <i>Capnodis tenebrionis</i> 'ten izole edilen bakterilerin <i>Pyrrhalta luteola</i> (Karaağaç yaprak böceği) larvaları üzerindeki insektisidal aktiviteleri .....	63
Şekil 17. <i>Capnodis tenebrionis</i> 'ten izole edilen bakterilerin <i>Galleri mellonella</i> (Petek güvesi) larvaları üzerindeki insektisidal aktiviteleri .....	64
Şekil 18. <i>Capnodis tenebrionis</i> 'ten izole edilen bakterilerin <i>Tenebrio molitor</i> (Un kurdu) larvaları üzerindeki doz denemeleri.....	65

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Meyve üreticisi ülkeler .....	3
Tablo 2. Ülkelere göre dünya yaş meyve ihracatında önde gelen ülkeler .....	4
Tablo 3. Ürünlere göre dünya yaş meyve ihracatı .....	5
Tablo 4. <i>B. thuringiensis cry</i> genleri ve Cry proteinlerinin etkili olduğu böcek takımları...17	17
Tablo 5. <i>Capnodis tenebrionis</i> ile mücadelede kullanılan kimyasallar .....	21
Tablo 6. Bakteriyel izolatların morfolojik ve boyama özellikleri.....	36
Tablo 7. Bakteriyel izolatların maksimum ve minimum sıcaklık özellikleri.....	38
Tablo 8. Bakteriyel izolatların farklı NaCl oranlarındaki büyüme kapasiteleri.....	39
Tablo 9. Bakteriyel izolatların minimum ve maksimum pH büyüme aralıkları. ....	40
Tablo 10. Bakteriyel izolatların bazı biyokimyasal özellikleri. ....	41
Tablo 11. Gram pozitif izolatların API 50 CHB test sonuçları.....	43
Tablo 12. İzolatların API 20E test sonuçları.....	47
Tablo 13. API sonuçları ile tanımlanan bakteriyel izolatlar. ....	49
Tablo 14. <i>Bacillus</i> cinsi izolatların VITEK-2 test sonuçları.....	51
Tablo 15. Gram negatif izolatların VITEK-2 sonuçları.....	54
Tablo 16. VITEK-2 sonuçları ile tanımlanan bakteriyel izolatlar. ....	56
Tablo 17. İzolatların 16S rDNA dizin analizi sonuçları. ....	58
Tablo 18. Bakteriyel izolatlara ait kit ve 16S rDNA tanımlaması sonucunda elde edilen sonuçlar. ....	68

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADH	: Arginindehidrolaz
AMY	: Amigdalin
ARA	: Arabinoz
BP	: Baz çifti
CIT	: Sitrat
CFU	: Koloni oluşturabilen birim
DDT	: Dikloro-difenil-trikloroetan
DNA	: Deoksiribonukleik asit
EDWIP	: Dünya böcek patojenleri ekolojik veritabanı
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
GEL	: Jelatin
GLU	: Glikoz
H <sub>2</sub> S	: Hidrojen sülfür
ICP	: İnsektisidal kristal proteini
IND	: İndol
INO	: İnositol
LDC	: Lisindekarboksilaz
MAN	: Mannitol
MEL	: Melibiose
MK	: Metil kırmızısı
NPV	: Nukleopolihedrovirüs
ODC	: Ornitindekarboksilaz
PBS	: Fosfat buffersalin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyonfragmenti uzunluk polimorfizmi
RHA	: Rhamnose
RNA	: Ribonükleikasit
SAC	: Sukroz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOR	: Sorbitol

TDA : Triptofandeaminaz  
URE : Üre  
VIDIL : Böcek viral hastalıkları veritabanı  
VP : Vogesproskauer  
WHO : Dünya sağlık örgütü



## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Tarım, artan dünya nüfusunun yeteri kadar beslenebilmesi açısından en önemli sektördür. Dünyamızda, hızlı nüfus artışının beraberinde getirmiş olduğu kentleşmeyle birlikte, her geçen gün tarım alanları azalmakta ve kişi başına düşen tarım ürünü miktarında düşüş olmaktadır. Geçmişte, tarımsal ürün ve meyve yetiştiriciliği bakımından kendi kendine yeten ülke konumunda olan Türkiye, şimdi birçok ülkeden tarımsal ürün ithal etmektedir. Bunun en önemli sebeplerinden biri ekonomik olarak önemli bitkilerde zararlı böceklerle mücadelenin bilinçli ve yeterli şekilde yapılmamasıdır (URL-1). Dolayısıyla, artan besin ihtiyacının karşılanması amacıyla mevcut tarımsal üretimde yüksek verim ve kalitenin hedeflenmesi gerekmektedir. Bu nedenle ürünlerimize ortak çıkan ve büyük kayıplara neden olan zararlı böceklerle etkili bir mücadele stratejisi geliştirmek çok önemli bir durum haline gelmiştir.

Ülkemizde ve dünyada tarım üretimi dikkate alındığında ülkemiz meyve üretim alanları bakımından ilk sıralarda yer almaktadır. Meyve üretimi, gerek insan gıdası gerek endüstriyel bakımdan büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle meyve ağaçlarındaki verimi artırmak ve sorunları ortadan kaldırmak önemli bir husus haline gelmiştir.

Meyve üretimindeki azalışta en önemli etkenlerden biri de zararlı böceklerdir. Meyve ağaçlarının hem yapraklarında hem de kök ve gövde kısımlarında çeşitli zararlılar yaşamaktadırlar. Bu zararlıların en önemlilerinden biri Kiraz dip kurdu (*Capnodis tenebrionis*)'dur.

Yaklaşık 1 milyon tanımlanmış böcek türü bulunmaktadır. Bu böceklerden yalnızca çok az bir kısmı ekonomik zararlara yol açmaktadır. Zararlı böceklerin neden olduğu ekonomik kayıplar en çok tarım ürünlerinde meydana gelmesine rağmen ormanlarda, seralarda ve süs bitkilerinde de yadsınamayacak kadar zarara yol açmaktadır (Lacey vd., 2001).

Zararlı böceklerle mücadelede günümüzde çok farklı yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen hala çeşitli kimyasal insektisitlerin ağırlıkta kullanıldığı bilinmektedir. Bu kimyasal insektisitlerin ekolojik dengeyi bozarak doğal çevreye zarar vermesi, hedeflenmiş organizmadan başka yararlı böcekler üzerinde de

öldürücü etki göstermesi, insan sağlığını olumsuz etkilemesi ve bilinçsiz kullanımları dolayısı ile böceklerde dirençlilik kazanılmasına sebep olmaları gibi nedenlerden ötürü yasaklanmaya başlanılmıştır. Bu nedenle uzun yıllardan beri alternatif yollar araştırılmaya başlanmış ve böylece, biyolojik mücadele çalışmaları hız kazanmıştır.

Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Biyolojik mücadele de kullanılacak ajanların birçoğu doğadaki hastalıklı böceklerden izole edilir. Böceklerde hastalıklara neden olan mikroorganizmalar özelleşmiş doğal düşmanlar olarak kabul edilir (Burges ve Hussey, 1971). Biyolojik mücadelede kullanılan etmenler bakteriler, virüsler, funguslar, nematodlar, protozoonlar ve rekombinant tekniklerle geliştirilen etmenlerdir (Peter, 1984). Böceklerle mücadelede mikrobiyal etmenlerin biyolojik mücadele olarak kullanımı 1800'li yıllarda fungusların kullanımıyla başlamıştır (Oğurlu, 2000).

Bu gruplara ait etmenler zararlı böceklerde hastalık oluşturarak böcek popülasyonunun dengede tutulmasını ve zararlarının en az seviyeye inmesini sağlar ve böylece doğal dengeyi korur. Bu etmenlerin büyük bir çoğunluğu konağa özgüdür ve bu özelliği sayesinde yalnızca mücadele yapılmak istenilen organizma üzerinde etkili olur. Böylece faydalı ve predatör böcekler, hayvanlar ve insanlar gibi hedeflenmemiş organizmalar üzerinde herhangi bir risk oluşturmaz. Bunlar, tamamen doğal olmaları sebebiyle ekosistemde herhangi bir kirliliğe yol açmazlar. Dolayısı ile gelecekte kimyasal insektisitlerin yerini bu biyolojik etmenlerin alacağı düşünölmektedir.

EDWIP (The Ecological Database of the World's Insect Pathogens) ve VIDIL (Viral Diseases of Insect in the Literature Database) verilerine göre 2,285 farklı mikroorganizma türünün, 9,407 böcek türüyle ilişkilili olduğu saptanmıştır. Toplam 2,285 mikroorganizma türünün 1,504'ü protozoonlar, 411'i funguslar, 168'i virüsler, 146'sını nematodlar, 51'i bakteriler ve 5'i de diğer organizmalardan oluşmaktadır (Braxton vd., 2003). Bu verilerin sayısı gün geçtikçe yeni araştırmalarla artmaktadır.

Önemli bir meyve zararlısı olan *Capnodis tenebrionis*'le mücadele kimyasallarla mücadele, kültürel mücadele ve mekanik mücadele şeklinde yapılmaktadır. Ancak uzun zamandır bu zararlıyla yapılan mücadeleler zararlı popülasyonunu azaltmada etkili olamamaktadır ve bu yüzden günümüzde mücadele yapılması gereken en önemli zararlılar arasında yer almaktadır.

*C. tenebrionis*'e karşı mücadele etmenin hangi dönemde ve koşullarda, nasıl uygulanacağını belirlemek için öncelikle zararlıyı çok iyi tanımak ve biyolojisini iyi



bilmek gerekir. İkinci olarak yapılması gereken ise kullanılacak biyolojik mücadele etmeninin belirlenmesidir.

Bu bilgiler doğrultusunda meyve yetiştiriciliğinin çok önemli olduğu ülkemizde, *C. tenebrionis*'le mücadele büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, hem bu hem de tarım ve ormancılıkta zarar oluşturan diğer zararlı böceklere karşı etkili bir mücadele ajanını belirleyebilmek amacıyla *C. tenebrionis*'ten bakteri izole edilmiş ve elde edilen bu bakterilerin insektisidal etkileri araştırılmıştır.

## 1.2. Meyve Üretimi ve Önemi

Türkiye, dünya üzerinde uygun iklim kuşağındaki konumu itibariyle bahçe bitkileri yetiştiriciliği açısından üstün ekolojik avantaja sahiptir. 1927 yılından sonra meyve alanlarımızda sürekli artış olmuştur. Meyve tarımı 2014 yılı itibariyle tarım alanları arasında %13,5 paya sahip olarak en önemli tarım ürünü haline gelmiştir. Meyve türlerinin ülke açısından önemi dikkate alındığında, tarım alanları içinde meyve üretim alanları ilk sırada yer almaktadır. TÜİK verilerine göre 2014 yılında ülkemizin toplam meyve ve sebze üretimi 45,4 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Bunun 16,8 milyon tonu meyve üretiminden kaynaklanmıştır. Türkiye'nin meyve üretim kompozisyonuna bakıldığında kiraz ve kayısı üreticiliğinde birinci, vişne de ikinci ve elma üretiminde üçüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2012; TÜİK, 2015). Ayrıca elma, armut, badem, ayva, antep fıstığı gibi türlerin anavatanının Anadolu olması sebebiyle de ayrıca öneme sahiptir. Dünyada da meyve üretimi önemli bir yer tutmaktadır. Çin, Hindistan ve Brezilya gibi ülkeler meyve üretiminde öne çıkarken Türkiye 8. sırada yer almıştır (Tablo 1) (FAO, 2012).

Tablo 1. Meyve üreticisi ülkeler

Sıra	Ülke	Üretim	Pay
1	Çin	137.066.750	21,5
2	Hindistan	71.072.580	11,2
3	Brezilya	38.368.678	6,0
4	ABD	26.548.859	4,2
5	Endonezya	17.744.411	2,8

Tablo 1'in devamı

6	Filipinler	16.370.976	2,6
7	Meksika	15.917.806	2,5
8	Türkiye	14.974.561	2,4
9	İspanya	13.996.447	2,2
10	İtalya	13.889.219	2,2
Genel toplam		636.544.883	

Dünyada yaş meyve ihracatı 2012 yılı itibarıyla 61,8 milyar dolar civarındadır. Önde gelen ihracatçı ülkeler İspanya (7,4 milyar \$), ABD (6,2 milyar \$), Şili (4 milyar \$), Hollanda (3,8 milyar \$) ve İtalya'dır (3,3 milyar \$). Türkiye 1,7 milyar dolarlık ihracat hacmiyle 2012 yılı itibarıyla dünya yaş meyve ihracatından % 2,7'lik pay almış olup ve 11'inci sırada yer almıştır (Tablo 2) (ITC, 2015).

Tablo 2. Ünelere göre dünya yaş meyve ihracatında önde gelen ülkeler (Bin\$)

Ülke	2012	Pay (%)
İspanya	7.373.136	11,9
ABD	6.192.875	10,0
Şili	4.012.651	6,5
Hollanda	3.779.603	6,1
İtalya	3.345.205	5,4
Çin	2.849.940	4,6
Belçika	2.599.436	4,2
Meksika	2.528.752	4,1
Ekvator	2.158.200	3,5
Güney Afrika	2.051.539	3,3
Türkiye	1.655.452	2,7
Dünya toplamı	61.819	-

2012 yılı itibarıyla dünyada ihracatı en çok yapılan yaş meyve muz olmuştur ve bu ürünün ihracatı yaklaşık olarak 8,7 milyar dolar dolayında gerçekleşmiştir. Muzun yaş meyve ihracatındaki payı %14,3 olmuştur (Tablo 3). Muzu daha sonra üzüm ve elma takip etmiştir (ITC).

Tablo 3. Ürünlere göre dünya yaş meyve ihracatı (Bin \$)

Ürün	2012	Pay (%)
Muz	8.869.094	14,3
Üzüm	7.124.245	11,5
Elma	7.109.881	1,5
Portakal	4.636.122	7,5
Mandarin	4.218.600	6,8
Armut	2.530.333	4,1
Çilek	2.328.919	3,8
Şeftali	2.190.027	3,5
Diğer meyveler	2.084.073	3,4
Kivi	2.073.914	3,4
Dünya toplamı	61.819.319	-

Türkiye'nin iklim özellikleri sayesinde hemen hemen her yerinde meyve yetiştiriciliği yapılabilmektedir. Meyvenin hem ihracat hem de sanayi açısından önemli ürünler arasında yer alması sebebiyle üretimde yaşanan sorunların en aza indirilmesi gerekmektedir. Bu sorunlar arasında hastalıklar ve çeşitli zararlılar yer almaktadır. *Capnodis tenebrionis* bu zararlılar arasında en önemlilerinden biridir. Öyle ki hem mücadele konusunda hem de verdiği zarar bakımından önlem alınması gereken ve kayısı, kiraz, erik, vişne, elma, armut gibi birçok meyve ağacında zarar meydana getirdiği belirlenmiş en önemli meyve ağacı zararlılarından biridir.

### 1.3. *Capnodis tenebrionis*, (Kiraz Dip Kurdu) (Coleoptera: Buprestidae)

#### 1.3.1. Tanımı ve Biyolojisi

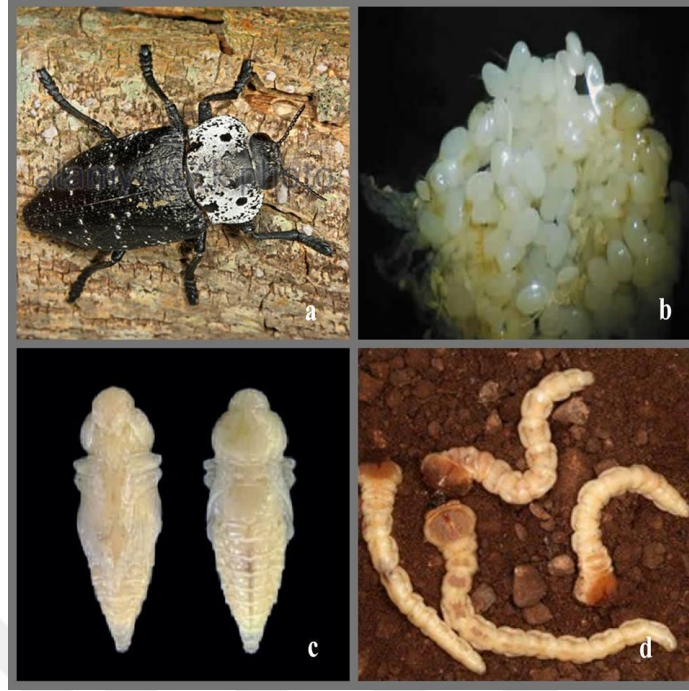
*Capnodis tenebrionis* (Linnaeus, 1767), özellikle sert çekirdekli meyve ağaçlarında oldukça yıkıcı zarar meydana getiren bir meyve ağacı zararlısıdır.

Erginleri siyah renkte, hafif parıltılı pronotum beyaz noktalı zemin üzerinde siyah çeşitli kabarık desenlidir. Kın kanatlarının üzerinde çeşitli şekillerde beyaz çukurcuklar bulunur. Üst kanatları bir iğnenin kolayca batırılmayacağı kadar serttir. Sıcak ve güneşli havaların öğle saatleri en aktif olduğu zamandır. Gürültü ile düz bir hat üzerinde uçar ve dönemeçlerde büyük kavis çizer. Erginlerine genellikle kök boğazında rastlanır. Yaklaşıldığında kendini tehdit altında hissederek ağacın veya dalın eksenini etrafında döner ve saklanmaya çalışır. Yakalanacağını anladığı anda bacaklarını vücut altına çekerek ölü taklidi yapar ve kendini toprağa atarak kuru yapraklar ve otlar arasında hareketsiz olarak gizlenir. Erginleri yaklaşık olarak 12-36 mm boyundadır.

Ergin dişi yumurtalarını tek tek ya da 5 veya 10'lu gruplar halinde kök boğazına yakın çatlaklara, kabuk aralarına, aşı gözlerine, kök boğazı civarındaki toprağa koyar. Yeni bırakılan yumurtalar ilk başta yumuşak ve sarı renklidir. Hava ile temas ettikçe süt beyazı renkte olur. Yumurtaları 1mm boyunda ve oval şeklindedir. En çok yumurta temmuz ayında bırakılır. Kültür ortamında bir dişinin 2000'den fazla yumurta bıraktığı görülmüştür. Yumurtalar 28 °C'de yaklaşık 12 gün içerisinde açılır.

Yumurtadan çıkan larvalar yaklaşık 2 mm boyundadır. Genç larva çok tüylü olup gömlek değiştirdikçe bu tüyler kaybolur. Dört instar evresine sahiptir. Larva boyu gelişme dönemine ve beslenme durumuna göre 2-80 mm civarında olup genellikle sarımtırak renktedir. 13 segmentli ve yassıdır. Baş protoraksı geriye doğru derince sokulmuş, protoraks yassı ve diğer segmentlere göre daha geniştir. Larva süresi kış ve yaz dönemine rastlamasına göre 4,5-12 ay sürer.

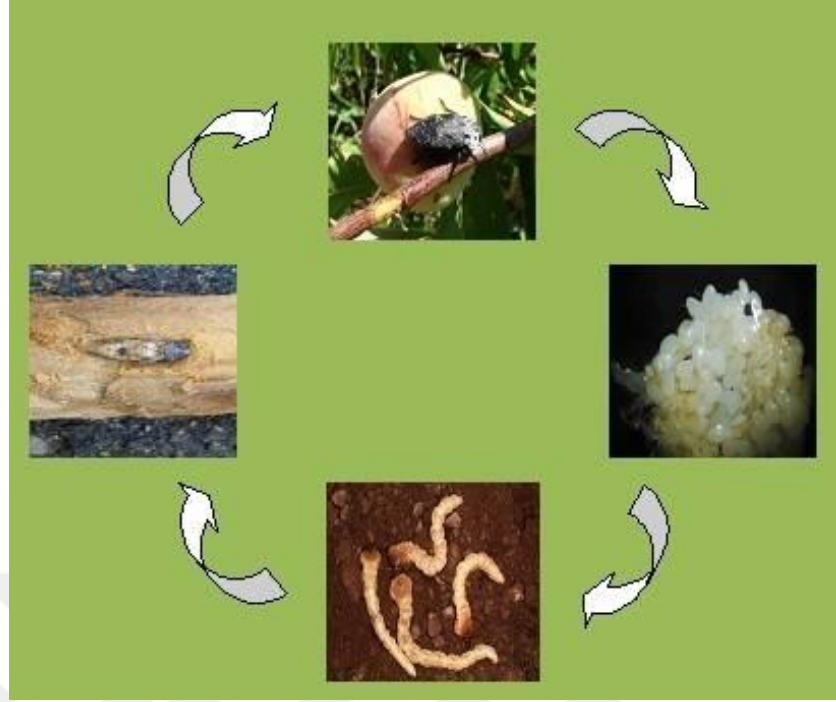
Pupaları oval şekilli ve muntazamdır. Genellikle kök boğazı civarında görülür. Pupa dönemi yaklaşık olarak 1 ay kadar sürer (URL-2) (Şekil 1).



Şekil 1. *Capnodis tenebrionis*'in biyolojisi a) Ergin, b) Yumurta, c) Pupa, d) Larva (URL-3, 4, 5, 6)

### 1.3.2. Zarar Şekli, Ekonomik Önemi ve Yayılışı

Ergin dişi yumurtalarını tek tek ya da gruplar şeklinde kök boğazına yakın çatlaklara, kabuk aralarına, aşı gözlerine, kök boğazı civarındaki toprağa koyar. Yumurtalar 28 °C'de 12 gün sonra açılır. Çıkan larvalar 2 mm boyunda ve çok tüylüdür. Bu tüyler yardımıyla toprak içinde hızla hareket ederek köke girerler. Köklerde beslenerek olgunlaşan *C. tenebrionis* larvaları kök boğazında pupa olur. Pupa dönemi 1 ay kadar sürer. Bu pupalardan iki ayrı dönem içinde ergin çıkışı görülür. 1. dönem ergin çıkışı temmuz ağustos aylarında 2. ergin çıkışı ekim-kasım aylarında olur. Kışı ağaç kabuklarında, toprak altında hareketsiz olarak geçiren erginler baharda aşı gözü ve sürgünlerle oburca beslenip, sıcaklık 25- 26 °C üstüne çıktığında çiftleşerek yumurta bırakır. 1. dönemde çıkan erginler yumurtalarını eylül ekim aylarında 2. dönemde çıkanlar ise haziran temmuz aylarında fidanlarda aşı yerlerine, yaşlı ağaçlarda kök boğazına bırakırlar. İki yılda 1 döl verirler (Şekil 2) (URL-2).



	Aylar											
Yıl	O	Ş	M	N	M	H	T	A	E	E	K	A
1	E	E	E	E	E	E	Y	L	L	L	L	L
2	L	L	L	L	L	L	P	P	E	E	E	E

Şekil 2. *Capnodis tenebrionis*'in yaşam döngüsü. E: Ergin, L: Larva, P: Pupa, Y: Yumurta (URL- 4, 6, 7, 8)

Özellikle taş çekirdekli meyve ağaçları ile elma, armut gibi ağaçların kök kabuklarının altında larva ve larva zararının görülmesi, ağaçların kök boğazında veya kök boğazının civarındaki toprakta oval şekilde deliklerin görülmesi, ağaç altlarında sapından yenmiş taze yaprakların bulunması, aşı gözlerinin veya taze sürgünlerin yenmiş olması bu zararlının varlığını gösterir. Erginler konukçusu oldukları ağaçların yapraklarını çok az da olsa yer fakat özellikle özsuyu düzeni bozulmuş ağaçlarda genç sürgünleri, aşı tomurcuklarını yaprak saplarını oburca yiyerek tahrip eder ve çok büyük zarar verirler. Genç larva daima toprak yüzeyinden aşağıda, kök kabuğunun altında bulunur. Burada kök kabuğunun altındaki kambiyum tabakasını kemirerek beslenir (Şekil 3).

Larva kök kabuğu altında galeriler açarak ilerler ve bu galeriler zamanla pislik ve talaş dolarak tıkanır ve böylece bitkinin beslenmesi durmuş olur. Herhangi bir nedenle kuruyan ya da susuzluk çeken kiraz, kayısı, şeftali, elma, armut, badem, vişne, antepfıstığı gibi meyve ağaçları ile kavak gibi bazı orman ağaçlarında ciddi derecede zarar meydana getirirler. Sonuçta ağaçlarda önce büyüme durur, sonra larva sayısının çoğalması ile gittikçe artan bir zayıflık ve sonunda ölüm görülür. Fidanlar çok çabuk, diğer ağaçlar ise 2-5 sene içinde kururlar. (URL-9). Bu zararlı Güney Avrupa ve Akdeniz bölgesinde oldukça geniş yayılış göstermektedir (Morton ve Garcí'a-del-Pino 2008) .



Şekil 3. *C. tenebrionis*'in meydana getirdiği zarar şekilleri a) Larvanın kök boğazında açtığı delikler, b) Larvanın kök kabuğu altında meydana getirdiği zarar, c)Erginlerin genç yapraklar ve sürgünlerde meydana getirdiği zarar (URL- 10, 11, 12)

#### 1.4. Tarım Zararlılarıyla Mücadele Yöntemleri

İnsanoğlu yaradılışından beri tarımla uğraşmaktadır. Tarım ürünlerinin azalmasındaki en önemli sebep yukarıda da belirtildiği gibi bitkilere zarar veren böcek popülasyonlarıdır. Bu böceklerin zarar seviyelerini en alt düzeyde tutmak için yapılan çalışmalar, zararlılarla mücadele yöntemleri olarak adlandırılmaktadır. Tarımda çeşitli zirai mücadele yöntemleri vardır.

**Kültürel Mücadele;** Toprak bakımı, işlenmesi ve gübrenmesi, yabancı ot ve atıkların temizlenmesi ve bitki nöbetleşmesi gibi toprakla ilgili yapılması gereken şeylerdir.

**Doğal Mücadele;** İnsanların herhangi bir yardımı olmadan doğal kuvvetlerle böcek popülasyonlarının kontrol altında tutulmasıdır.

Yasal Mücadele; Yasal yollardan yararlanılarak zararlıların yayılmalarını önlemektir. Karantina, ambargo, muayene veya sertifika uygulamak bunların başında gelmektedir.

Mekanik Mücadele; Böcekleri çeşitli yöntemlerle toplama işlemidir. Işık tuzaklarıyla pusuya düşürerek, yem ve feromon tuzakları kullanılarak gerçekleştirilir.

Fiziksel Mücadele; Sıcak ve nemden yararlanılarak böceklerin öldürülmesi, elektrik veya radyo dalgaları kullanılarak böceklerin kısırlaştırılmasını içeren mücadele yöntemleridir.

Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin doğal düşmanlarını onlara karşı kullanılarak yapılan bir mücadeleye yöntemidir (Oğurlu, 2000).

Kimyasal Mücadele; Çeşitli kimyasalların toz veya sulu halde kullanılması suretiyle yapılan mücadeledir. Ülkemizde çok yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen, gelişmiş ülkeler bu yöntemi terk etmektedir.

Zararlı popülasyonu oluştuğunda kimyasal mücadele tek çare olarak belirlenmiştir. (Anonim, 2008). Kimyasal insektisitlerin potansiyel olumsuz etkilerinden dolayı zararlıların mücadelesinde kullanılacak diğer yöntemlerin araştırılması yararlı olacaktır.

#### **1.4.1. Kimyasal Mücadele ve Çevreye ve İnsanlara Olan Etkileri**

Tarım ürünlerinin yetiştirilmesinde ve depolanmasında böceklerin meydana getirmiş olduğu zararlar üreticiler ve ülke ekonomisi için büyük kayıplara neden olmaktadır. Bu sorunu çözebilmek adına yaygın bir şekilde kullanılan kimyasal insektisitler zararlı popülasyonun %95'ini yok edebilmektedir (Vural, 1996). Ancak kullanılan bu kimyasal insektisitler ekosistem ve hedeflenmemiş organizmalar üzerinde olumsuz etkilere sahiptir (Ecevit, 1988; Ünal, 1998). Özellikle 1945 yılında DDT'nin bulunmasıyla sentetik kimyasal insektisitlere ilgi artmıştır ancak bununla birlikte beraberinde birçok problemi de getirmiştir.

Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre insektisitlere dayanıklılık, “normal bir popülasyondaki bireylerin çoğunu öldürdüğü tespit edilen zehirli bir maddenin bir dozuna karşı, aynı türün diğer bir popülasyonundaki bireylerin tolerans kazanma yeteneğinin gelişmesi” olarak tarif edilmektedir. Başka bir tanıma göre ise dayanıklılık, “bir arthropod



türünün bir ırkının, aynı türün duyarlı popülasyonunda saptanmış olan LD<sub>100</sub> değerinin iki katı olan ilaç dozundan etkilenmemesi” olarak açıklanmaktadır.

Bu insektisitlere karşı zararlıların geliştirmiş olduğu dayanıklılık sonucunda, çiftçiler dozu artırma ve uygulama süreleri arasındaki zaman aralığını kısaltmayı tercih etmektedirler. İnsektisitlerin bu şekilde bilinçsizce ve aşırı kullanımı ekosistemin bozulmasına, yeraltı sularının kirlenmesine, hedef dışı organizmaların yok olmasına ve besin zincirinin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, daha önce problem olmayan bazı zararlılar ortaya çıkmakta, bu durumda sekonder zararlılara karşı ilaçlama yapma zorunluluğunu da beraberinde getirmektedir. Örneğin, Çukurova’da beyazsineğin, doğal düşmanlarının insektisitlerden zarar görmesi nedeniyle sorun haline gelmiştir (Ünal, 1998). Ayrıca, herhangi bir yolla sulara karışan kimyasal maddeler balıklar tarafından bünyesine alındığında, balıkların büyüme, üreme, kaçma ve saklanma gibi bazı fizyolojik özellikleri ve yetenekleri gibi avantajları insektisitlerin vücutlarında birikimlerine göre giderek azalmakta veya tamamen yok olmaktadır. Bundan dolayı rakipleri tarafından daha kolay avlanmaları sonucu bazı türlerin bütünüyle ortadan kalkması söz konusu olabilmektedir (Ünal, 1998).

Kimyasal insektisitler ayrıca doğada bulunan doğal bitki örtüsüne de zarar vermektedir. Kimyasal insektisitlerin doğada toprak ve bitkilerde birikmelerinden dolayı, yok olmaları çok uzun sürmektedir. Oluşan bu birikim topraktaki normal mikrobiyal popülasyonu bozar ve toprak veriminin düşmesine neden olur ve böylece bitkiler aracılığıyla besin zincirine dahil olarak besin zincirinin en üst seviyesindeki canlılara kadar ulaşır. Kimyasal insektisitler belli bir alana uygulansalar dahi kolayca yok olmadıklarından dolayı ve rüzgâr, yağmur gibi doğal olaylarla çok daha geniş alanlara yayılabilmelerinden dolayı zararı daha da artırmaktadır (Ünal, 1998).

İnsektisitler doğrudan doğruya veya dolaylı olarak insan sağlığını etkilemektedir. Bu etkiler akut ve kronik toksisite olarak iki grup altında toplanabilir (Ecevit, 1988).

Bir kimyasalın bir kez veya kısa bir zaman diliminde (Örneğin, 24 saat) birkaç kez alınması sonucunda vücutta oluşan hasar akut toksisite olarak tanımlanır. Bursa’da 1963 yılında, parathionla ilaçlanmış şeftaliyi yiyen 32 kişiden 7’sinin aynı gün ölmesi akut toksisiteye örnek verilebilir. Kronik toksisite ise bir kimyasalın akut toksisiteye neden olmayacak kadar düşük dozlarda, uzun süre alınması sonucunda sıcakkanlılarda meydana getirdiği fizyolojik düzensizlik olarak tanımlanır. Örneğin, Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde heksakloro benzenli (HCB) insektisitle ilaçlanmış tohumluk buğdayı yiyen

3000 kişide Porfiria (Karayara) hastalığının görülmesi ve bunlarda %11 oranında ölüm meydana gelmesi, dünya çapında ilgi uyandıran bir zehirlenme olayıdır (Ünal, 1998).

Düşük dozlarda alınan bu insektisitlerin insan vücudunda birikimi sonucu, gelecek kuşaklarda neler meydana getireceğini de şimdiden tahmin etmek oldukça zordur. İnsektisitlerin sinir sistemi üzerindeki enzimlere etkili oluşu, önemlerini bir kat daha arttırmaktadır. Bugün özellikle fazla miktarlarda kullanılan klorlandırılmış hidrokarbonların insan ve hayvanların beyin, karaciğer, böbrek ve yağ dokularında toplanarak toksik etkiye bulunduğu bilinmektedir (Ecevit, 1988).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 1985 yılı raporlarına göre, her yıl 1.000.000 kişi pestisitlerden zehirlenmekte ve bunların yaklaşık 20.000'i ölümlerle neticelenmektedir. Dünya pestisit tüketiminin 1/3'ü az gelişmiş ülkelerde gerçekleşmesine rağmen, dünya pestisit ölümlerinin %75'i bu ülkelerde meydana gelmektedir (Ünal, 1998).

Zararlı böceklerle mücadelede kullanılan insektisitlerin bilinen yan etkilerinden dolayı, kimyasal mücadelenin günümüzde mümkün olduğunca kısıtlanması ve bunun yerine daha güvenli olan biyolojik mücadelenin alması gerektiği düşünülmektedir. Son 25 yılı aşkın bir süredir, zararlı böceklerle mücadelenin zararlı etkileri nedeniyle kimyasal insektisit kullanmanın yerine alternatif veya destek yöntemleri araştırmaya başlanmıştır (Bernard ve Jack, 2003). Bunların başında da mikrobiyal mücadele gelmektedir.

#### **1.4.2. Biyolojik Mücadele**

“Biyolojik mücadele” sözcüğü ilk defa Harry Smith tarafından 1919 yılında Kaliforniya Üniversitesi'nde böcek popülasyonlarının doğal yollarla veya çeşitli uygulamalarla kontrol altına alınması olarak kullanılmıştır.

Biyolojik mücadele çalışmaları temelde klasik biyolojik mücadele, çoğaltma (Augmentasyon) ve koruma (konzervasyon) olmak üzere üç ana başlıkta toplanmaktadır. Klasik biyolojik mücadelede, ortama zararlı böceklerin doğal düşmanları verilerek böceklerin zarar oluşturma potansiyelleri ortadan kaldırılır. Çoğaltma, ortama var olan zararlı böceklerinin doğal düşmanlarının sayısının artırılması şeklinde olur. Son olarak koruma da ise doğada mevcut faydalı organizmaların korunarak doğal düşmanların etkili bir şekilde uzun süreli ortamda kalmaları ve zararlı böcek sayılarını zarar eşliğinin altında tutmaları sağlanması şeklinde uygulanır (Demirbağ vd., 2008).

Biyolojik mücadele, diğer mücadele yöntemlerine göre doğal dengenin kurulmasına yardımcı olması, uzun vadede kalıcı sonuçlar vermesi ve nihai hedefe ulaştırabilmesi bakımından en çok tercih edilmesi gereken mücadele yöntemidir (Oğurlu, 2000). Zararlı böcek popülasyonlarını, dolayısıyla böceklerin zararlarını azaltmak için canlı organizmalardan veya bu organizmalara ait ürünler olan mikroorganizmalar, predatörler, parazitoid böcekler, omurgasızlar, omurgalılar, feromonlar, semikimyasallar, bitkisel insektisitler, böcek büyüme düzenleyicilerinden faydalanarak yapılan ekonomik, güvenilir ve başarılı bir mücadele yöntemidir (Demirbağ vd., 2008). Biyolojik mücadele kapsamında kullanılan patojen mikroorganizmalar bakteriler, funguslar, virüsler, protozoonlar ve nematodlardır. Bu mikroorganizmalar kullanılarak yapılan mücadeleye ise ‘Mikrobiyal Mücadele’ denilmektedir.

Mikrobiyal mücadelede kullanılan entomopatojenlerin büyük bir çoğunluğu konağa spesifiktir. Bu nedenle yalnızca mücadelesi yapılmak istenilen organizma üzerinde etkili olur. Tamamen doğal olmaları sebebiyle ekosistemde herhangi bir kirliliğe yol açmazlar ve bu özellikleri, gelecekte kimyasal insektisitlerin yerini bu biyolojik etmenlerin alacağını göstermektedir.

### **1.4.3. Mikrobiyal Mücadelede Kullanılan Etkin Gruplar**

#### **1.4.3.1. Virüsler**

Birçok virüsün böceklerin hastalanmasına neden olarak böcek salgınlarını kontrol altına aldığı bilinmektedir (Steinhaus, 1956). Çiğneyici ağız yapısına sahip böcekler, özellikle yaprak yiyenler, virüs enfeksiyonlarına karşı daha hassastır. Bu durumda yaprak yiyen Lepidoptera tırtıllarıyla, Hymenoptera’nın yalancı tırtılları viral etmenlerden daha fazla zarar görürler (Weiser, 1969). Virüsler birçok böcek takımıyla ilişkilidir. Bununla birlikte büyük bir kısmı Lepidoptera (%83), Hymenoptera (%10) ve Diptera (%4) takımlarında bulunmaktadır (Demirbağ ve Beldüz, 1997). Bu virüsler genellikle 2-3 yılda bir meydana gelen salgınlarda çoğalırlar ve birçok larvayı öldürürler. Böylece afetlerini ortadan kaldırırlar (Lipa, 1975).

Virüsler içerisinde en az 16 familyanın böceklerle mücadelede etkili olduğu tespit edilmiştir (Tanada ve Kaya, 1993).

Şimdiye kadar sınıflandırılan böcek virüslerinin büyük bir kısmı Baculoviridae, Reoviridae, Poxviridae, Picornaviridae, Densoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae ve Iridoviridae familyalarına aittir. Bu böcek virüslerinden, Baculoviridae familyası yalnızca artropodlar için spesifiktir (Demirbağ ve Beldüz, 1997). Çoğu bakülovirüsler sadece bir veya yakından ilişkili birkaç böcek türünü enfekte edebilir (Arif ve Kurstak, 1991). Hastalanan larva önce uyuşuk bir hal alır ve sonra beslenmeyi bırakır. Ölmeden önce ağacın tepesine tırmanır ve arka bacaklarından asılı olarak ölür. Dokuları koyulaşır, ayrışır ve vücutları sıvı hale geçer (Lipa, 1975; Demir, 2004). Baculoviridae familyasına ait bu virüslerin insanlar ve diğer hedeflenmemiş organizmalar için güvenli bir mikrobiyal ajan olması, biyolojik mücadelede kullanılma potansiyelini arttırmaktadır (Granados ve Federici, 1986; Gröner, 1986).

#### 1.4.3.2. Funguslar

Entomopatojen funguslar diğer mikroorganizmalara göre çok daha geniş bir konukçuya sahiptirler. Lepidoptera, Homoptera, Coleoptera ve Diptera takımlarına bağlı türlerde enfeksiyon yaptıkları, bunlardan, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* ve *Lecanicillium lecanii*'nin tüm dünyada yaygın olduğu bilinmektedir (Deacon, 1983). Böcek patojeni olan funguslar genellikle Deuteromycota ve Entomophthorales gruplarına dahildir (Hajek, 1997).

Fungusların biyolojik mücadelede kullanılmaları 1726 yılında Fransa'da Noctuidae larvalarından *Cordyceps* cinsi fungusların izole edilmesiyle başlamıştır (Oğurlu, 2000). Daha sonra 1879 yılında Rusya'da yeşil buğday böceği, *Anisoplia austriaca* Herbst. (Coleoptera: Scarabaeidae)'ya karşı *Metarhizium anisopliae* fungusunun denemeleri yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Steinhaus, 1949). Şimdiye kadar tanımlanan 700'ün üzerinde entomopatojenik fungus tanımlanmıştır ve bunlardan bazıları biyolojik mücadele etmeni olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır (Strasser vd., 2000). Entomopatojenik fungus orijinli yaklaşık 150 ticari preparat 2007 yılından itibaren üretilmekte ve zararlılar ile mücadelede kullanılmaktadır (Faria ve Wraight, 2007).

### 1.4.3.3. Nematodlar

Böceklerde parazit olarak yaşayan ve bazı durumlarda ölümlerine yol açan birçok nematod türü bulunmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda birçok nematod familyasına ait türlerin, böcekler ve diğer omurgasız hayvanlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Poinar, 1979, 1990; Kaya ve Stock, 1997). Steinermatidae ve Heterorhabditidae familyaları günümüzde, özellikle toprak böceklerinin mikrobiyal mücadelesinde en sık kullanılan gruplardır (Liu vd., 2000; Lacey vd., 2001; Erbaş, 2012).

Entomopatojenik nematodlar, toprak içinde konukçu böceği arama yeteneğine sahiptirler. Konukçu böceğe ulaşan entomopatojenik nematodlar, böceğin içine girer ve çeşitli maddeler salgılayarak o böceğin ölümüne neden olurlar. Böceğin içine girişten ölümüne kadar geçen süre, ortam koşullarına bağlı olmakla beraber, yaklaşık 36 saattir. Böcek öldükten sonra entomopatojenik nematodlar böcek içinde ürer ve daha sonra ölü böceği terk ederek yeni konukçu arayışına başlarlar. Yaklaşık 3 adet entomopatojenik nematod bir böceğin ölümü için yeterlidir ve böceğe giriş yaptıktan ortalama 15 gün sonra ölü böcek içinden on binlerce entomopatojenik nematod çıkar (Durmuşoğlu vd., 2013).

### 1.4.3.4. Protozoonlar

Entomopatojenik protozoalar böcek popülasyonlarının düzenlenmesinde ve dengede tutulmasında önemli role sahiptir (Maddox, 1987)

Protozoonların zararlı böcek popülasyonlarında meydana getirdikleri salgınlar, az rastlanılan bir durum olmasına karşın, neden oldukları ferdi ve küçük gruplar halindeki ölümler, zararlı böcek popülasyonlarının zarar eşiğinin altında tutulması bakımından önemlidir (Maddox, 1987). Entomopatojenik protozoonlar genellikle konağa spesifiktirler. Böceklerde oluşturdukları hastalıklar yavaş ilerler. Virülansları düşüktür ve çoğu kez böceklerde kronik enfeksiyonlar oluştururlar. Virülanslarının düşük olması nedeniyle protozoonların enfekte ettiği böceklerin ölümü bazen haftalar sürebilir (Hoffman ve Frodsham, 1993). Protozoonlar çoğu böceklere ağız ve sindirim sistemiyle girer. Sporozonlar ve özellikle mikrosporlar tarafından oluşturulan enfeksiyonun en muhtemel oluşma durumu böcek yiyeceklerinin sporla kirlenmiş olmasıdır (Demirbağ vd., 2008). Protozoonlar tarafından enfekte edilen böceklerin hareketleri yavaşlar ve tembelleşir. Beslenme ve üreme faaliyetlerinde azalma görülür. Ölümün gerçekleşebilmesi için

enfeksiyon seviyesinin çok yüksek olması gerekir. Şimdiye kadar belirlenen birçok protozoa türünün, arthropodlarla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Protozoa sınıfı içerisinde yer alan Ciliphora, Sarcomastigophora, Apicomplexa ve Microspora gruplarına ait türler böcekleri enfekte edebilirler (Maddox, 1987).

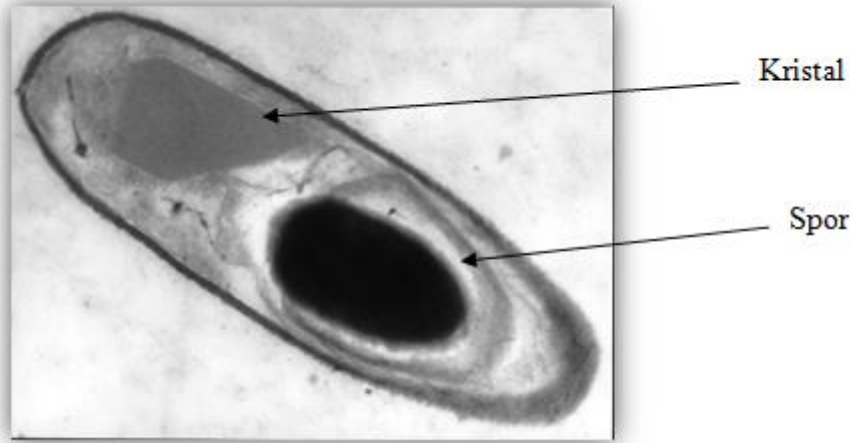
Çoğu entomopatojenik protozoonun hayat döngüsü komplekstir. Sadece canlı konak içerisinde gelişebilirler ve çoğu türün gelişimini tamamlayabilmesi için bir ara konağa ihtiyacı vardır.

#### 1.4.3.5. Bakteriler

Günümüzde zararlı böceklere karşı en fazla kullanılan mikroorganizmalar entomopatojen bakterilerdir. Spor oluşturanlar ve spor oluşturmeyenler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Böceklerle mücadelede, daha çok spor oluşturan bakteriler kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar, bunların sporlarının kuraklık ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Spor oluşturmeyen bakteriler ise olağanüstü koşullar karşısında oldukça dayanıksız ve hassastır. Buna göre, böceklere karşı yapılacak mücadelede, spor oluşturan ve fakültatif bakterilerin kristal taşıyanlarının kullanılması tavsiye edilmektedir (Oğurlu, 2000).

Son 50 yılda yapılan çalışmalarda, birçok entomopatojenik bakteri böceklerden izole edilmiş ve bazılarının izole edildikleri böcekler üzerinde hastalık etmeni olduğu belirlenmiştir. Bunlar arasında toprak grubu bakterilerden olan *Bacillus* türleri öne çıkmaktadır. Bu bakterilerden en önemlisi ise *Bacillus thuringiensis* (Bt)'tir. *Bacillus thuringiensis*, Bacillaceae familyası içerisinde yer almaktadır.

*B. thuringiensis* Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera takımlarındaki böceklere karşı insektisidal özelliğe sahip kristal yapıda toksin üreten, spor oluşturan, Gram-olumlu ve aerobik bir toprak bakterisidir (Beegle ve Yamamoto, 1992) (Şekil 4). Buna rağmen, hastalıklı ve sağlıklı böceklerden, bitkilerin yaprak yüzeylerinden ve depolanmış ürünlerden de izole edilmiştir (Burges ve Hurst, 1977; Carozzi vd., 1991; Kaelin vd., 1994).



Şekil 4. *Bacillus thuringiensis* bakterisinin TEM görüntüsü (URL-13)

*B. thuringiensis* ilk kez 1901 yılında Japon bakteriyolog Ishiwata (1901) tarafından hastalıklı ipek böceği larvalarından izole edilmiştir. Aoki ve Chigasaki (1915) adlı araştırmacılar bakteriyi tanımlamışlardır. Spor bulunan hücrelerde inklüzyon yapılarının varlığını Berliner (1911; 1915) ve Mattes (1927) rapor etmişlerdir. Angus (1954), ipek böceği larvalarının orta bağırsaklarında *B. thuringiensis*'in spor oluşmuş hücrelerinde toksik bir maddenin oluştuğunu bulmuştur. Daha sonra aynı araştırmacı (Angus, 1956) toksik maddenin parasporal yapı içinde olduğunu keşfetmiştir. Hannay ve arkadaşları (1955) bu yapının protein yapıda olduğunu belirlemişlerdir.

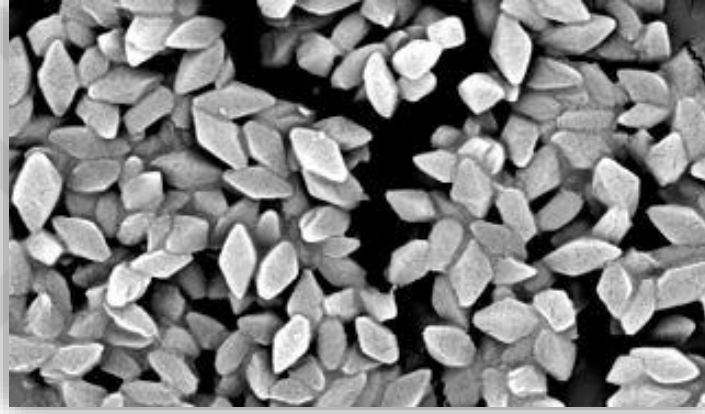
*B. thuringiensis* 'te bulunan kristal (*cry*) genleri insektisidal kristal proteinleri (ICP) kodlar. Bu kristal (*cry*) genleri Lepidoptera (*cry1*), Diptera ve Lepidoptera (*cry2*), Coleoptera (*cry3*), Diptera (*cry4*) ve Coleoptera ve Lepidoptera (*cry5*) grubundaki böceklere karşı etkilidir (Demirbağ vd., 2008) (Tablo 4) (Şekil 5).

Tablo 4. *B. thuringiensis* *cry* genleri ve Cry proteinlerinin etkili olduğu böcek takımları

Gen	Protein	Alttür	Etkili Olduğu Takım
<i>cry1</i>	Cry1	<i>kurstaki</i> (HD-1), <i>aizawai</i> , <i>sotto</i>	Lepidoptera
<i>cry2</i>	Cry2	<i>kurstaki</i> (HD-1), <i>kurstaki</i> (HD-263)	Lepidoptera, Diptera

Tablo 4'ün devamı

<i>cry3A</i>	Cry3A	<i>tenebrionis</i> , <i>morrisoni</i>	Coleoptera
<i>cry3B</i>	Cry3B	<i>japonensis</i>	Coleoptera
<i>cry4</i>	Cry4	<i>israelensis</i>	Diptera
<i>cry5</i>	Cry5	<i>kurstaki</i> (DSIR732)	Coleoptera, Lepidoptera

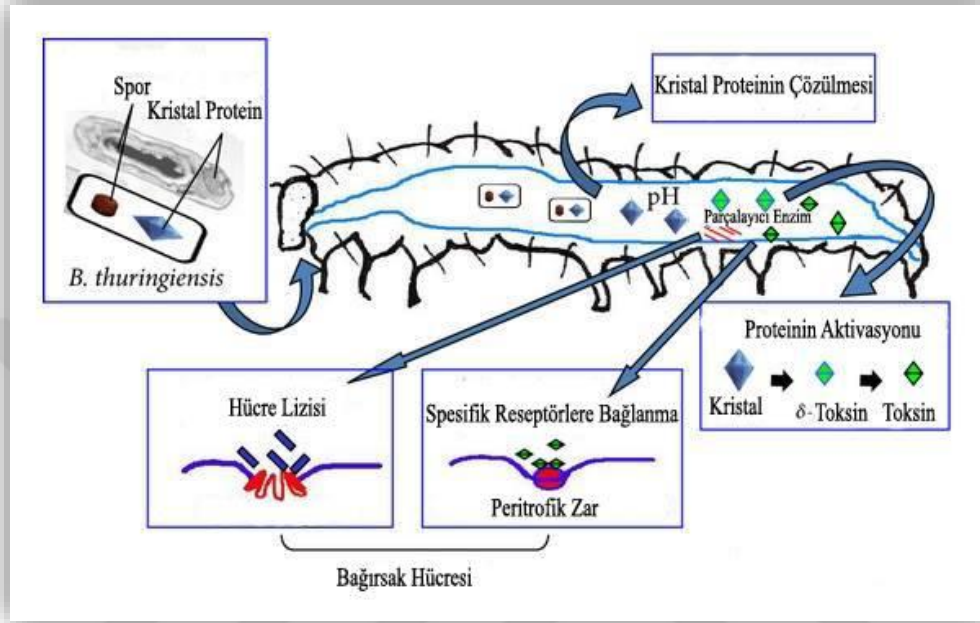


Şekil 5. *Bacillus thuringiensis* kristallerinin elektron mikroskopik görüntüsü (URL-14)

ICP'ler; normal koşullar altında çözünmeden bulunurlar, bu nedenle insanlar ve diğer yüksek organizma grupları için bir risk oluşturmazlar. Buna karşılık pH 9,5'de çözünebilir özellik taşımaları, kristal proteinlerine yoğun bir insektisit özelliği kazandırmaktadır.  $\delta$ - endotoksinler bağırsakta çözünerek protoksine dönüşürler. Daha sonra bağırsak enzimleri tarafından protoksinler parçalanarak aktif toksinler elde edilir. Aktif toksinler bağırsak epitelyum hücrelerinin reseptörlerine tutunarak böceğin bağırsak duvarını felce uğratar ve burayı tahrip ederek gözenekler oluştururlar. Böylece bağırsakta bulunan besin artıkları böcek vücuduna ve kana karışır (Şekil 6). Zehirlenen böcek, toksin aktivitesi sebebiyle hemen ölebileceği gibi 2-3 gün içerisinde kan zehirlenmesi sonucu da ölebilir (Schnepf vd., 1998).



*B. thuringiensis*'in larvalar üzerinde sebep olduğu semptomlar, yavaş hareket etme, beslenmeyi bırakma, sıvı halde dışkı çıkarma, kusma ve vücut içeriklerinin kahverengiden siyaha dönüşmesi olarak sayılabilir (Knowles, 1994).



Şekil 6. Kristal proteinlerin etki mekanizması (URL-15)

ICP'lerin özgün reseptörlere bağlanmasının insektisidal spektrum ile ilgili olduğu tespit edilmiştir (Denolf vd., 1997). Van Rie ve arkadaşları (1989), tütün (*Heliothis virescens*) ve domates kurtlarının (*Manduca sexta*) fırça şeklindeki membran vesiküllerine bağlandıklarını göstermiştir. Fakat bağlanma yerlerinin sayısı farklıdır ve değişik biyolojik aktiviteler gösterir. Bağlanma yerleri için bütün böceklerde toksin ilgisi aynı değildir.

Günümüzde kullanılmakta olan biyo-insektisitlerin %90'ını oluşturan Bt formülasyonları, toplam insektisit pazarının da %5'ini oluşturmaktadır. Modern bitki biyoteknolojisinin kullanımı sonucunda *Bacillus thuringiensis* bakterisinden kopyalanarak verimli kültür çeşitlerine aktarılan tek bir gen (*cry*) sayesinde zararlı böcekler karşı dayanıklı genetiği değiştirilmiş (GD) bitkiler üretilebilmiştir. Yapılan bilimsel araştırmalar sonucunda da bu bitkilerin insan ve hayvan sağlığı üzerine olumsuz bir etkisine de rastlanmamıştır. Böcekler dayanıklı GD mısır ve pamuğun ABD, Çin, Hindistan, Brezilya, Arjantin ve Güney Afrika Cumhuriyeti gibi ülkelerde yaygın olarak üretimi sonucunda verimde %30'lara varan verim artışı sağlanırken insektisit kullanımında da çok

önemli düşüşler gözlenmiştir. Çiftçiler dayanıklı çeşitler sayesinde insektisit ve ilaçlama için harcadıkları yakıt maliyetini en aza indirmişlerdir. GD bitkilerin kullanımı verim artışıyla birlikte ürün kalitesini de artırmıştır.

#### **1.4.4. *Capnodis tenebrionis* ile Mücadele**

*Capnodis tenebrionis*'in etkili doğal düşmanları bilinmemektedir (Marannino ve de Lillo, 2007). Günümüzde bu zararlı ile mücadele kültürel, mekanik ve kimyasal mücadele olmak üzere üç şekilde yapılmaktadır. Kültürel mücadelede, ağaç altlarında bulunan erginlerin kolayca saklanabileceği ot, çalı vs. bulundurulmamalı. Su ve gübrelemeye dikkat edilerek ağaçların zayıf düşmesi engellenmeli ve ağaçların gövdesine kireç badanası yaparak ergin dişilerin yumurta koymasını güçleştirilmesi şeklinde yapılır.

Mekanik mücadelede, sabahın erken saatlerinde ve akşamüzeri gövde ve kök boğazın çevresinde bulunan erginler toplanarak yok edilerek ve kök kabuğu altındaki bulunan larva ve pupalar toplanıp yok edilmesi şeklinde yapılır (URL-2).

Kimyasal mücadelede ise öncelikle mücadeleye karar vermek için böceğin zararının ağaç üzerinde görülmüş olması gerekir. Bu nedenle Mayıs ayının ilk haftasından başlayarak ergin çıkışı gözlenir. Ağaçlarda ergin görüldüğünde veya bu ağaçların kök boğazları açılarak incelendiğinde larvalara veya zararına rastlanırsa ya da toprak yüzeyinde ya da kök boğazında oval delikler gözlenirse mücadeleye karar verilebilir. İlaçlı mücadele Haziran, Temmuz, Ağustos aylarında zararlının yumurtalarını kök boğazına koyduğu dönemde her 15 günde bir yapılır. İlaçlamada, ağaçların 1 m yüksekliğe kadar olan gövdeleri ve 1 m çaplı daire içinde kalan kök boğazı civarında toprak yüzeyi ilaçlanmalıdır. İlaçlar daima su ve çapadan sonra toprak yüzeyi kurumaya başladığı dönemde ve özellikle günün serin saatlerinde yapılmalıdır. Aşılı ağaçlarda aşı ve civarı mutlaka ilaçlanmalıdır. Devamlı ve en az iki yıllık kesintisiz bir mücadele gerektirir (Tablo 5) (URL-9).

Tablo 5. *Capnodis tenebrionis* ile mücadelede kullanılan kimyasallar (URL-2)

Etkili Madde Adı ve Oranı	Formülasyonu	Dozu (preparat) 100 lt. suya
OxydemetonMethyl 265 g/l	EC	150 ml
Dimethoate 400 g/l	EC	200 ml
Azinphosmethyl 230 g/l	EC	200 ml

### 1.5. Çalışmanın Amacı

*C. tenebrionis*'in ekonomik kayıplara sebep olmasından dolayı zarar ve popülasyon seviyesini en aza indirmek önemli bir konu haline almıştır. Çalışmadaki öncelikli amacımız son zamanlarda meyve tarımının en önemli zararlılarından biri olan *C. tenebrionis*'in bakteriyel florasını belirlemek ve tanımlanan bakteriyel izolatların mikrobiyal mücadelede kullanılabilme potansiyellerini araştırmaktır.

## **2. YAPILAN ÇALIŞMALAR**

### **2.1. *Capnodis tenebrionis*'in Toplanması**

Çalışma için gerekli olan *Capnodis tenebrionis* (meyve ağacı dip kurdu) larva ve erginleri 2015 yılında Amasya'da meyve bahçelerinden toplandı. Elde edilen larva ve erginleri toplandıkları yer ve tarih not edildikten sonra, özel kaplara konularak laboratuvara getirildi. Bu larva ve erginlerin makroskobik incelemeleri yapıldıktan sonra ölü larva, larva ve ergin şeklinde ayrıldı.

### **2.2. *Capnodis tenebrionis*'ten Bakterilerin İzolasyonu**

Laboratuvara getirilen ölü ve sağlıklı *C. tenebrionis* larvaların ve erginlerden 1'er adet, steril petri kapları içerisine konularak %70'lik etil alkol ile 5 dakika yüzey sterilizasyonu gerçekleştirildi. Sonra içerisinde steril saf su bulunan petrilere alınarak 2-3 kez yıkayıp, alkolden arındırıldı. Daha sonra tüpün üzerine 1 ml nütrient broth besiyeri ilave edilerek steril bir homojenizatör ile böceklerin iyice ezilmesi sağlandı. Elde edilen karışım bir tülbent vasıtasıyla süzülüp bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Bu süzüntüden 10 µl, 50 µl ve 100 µl alınarak üç ayrı nütrient agar besiyerine ekim yapıldı. Bu ekimler 30°C'lik etüvde 2-3 gün süre ile inkübasyona tabi tutuldu. Kalan karışım 30°C'de 5-6 saat inkübe edildi. Bu inkübasyonun amacı, karışımda çok düşük sayıda olabilecek mikroorganizmaların sayısını artırarak, sonraki ekimde tespit edilmelerini kolaylaştırmaktır. Bu inkübe edilen karışımdan da 10 µl ve 50 µl alınarak yine nütrient agar besiyerlerine ekim yapıldı (Sezen vd., 2007).

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

İnkübasyonun ardından nütrient agar besiyeri üzerinde büyüyen bakteriyel koloniler binoküler mikroskop altında incelendi ve farklı koloni renk ve morfolojilerine sahip olanlar steril öze ile dikkatlice seçilerek çizgi ekimleri yapıldı ve saf kültürler elde edildi. Elde edilen kültürler, numaralandırılarak, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere %20'lik steril gliserol içerisinde – 80 °C'de stoklandı.

## **2.4. İzolatların Morfolojik ve Boyama Özelliklerinin Belirlenmesi**

### **2.4.1. Gram Boyama**

Gram boyama, bakterilerin hücre duvarının içeriği hakkında bilgi veren bir boyama yöntemidir. Gram negatif olarak boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka, gram pozitif olarak boyanan bakterilere göre çok daha incedir. Gram boyama için her bir izolat nütrient sıvı besiyerine ekildi ve 30°C'ye ayarlı su banyosunda 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. Büyüyen kültürlerden bakteriyel smear hazırlandı ve alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan smear, 1 dakika kristal viole ile muamele edilerek dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Kuruması beklenmeden 1 dakika lügol ile muamele edildi. Aseton alkolle renk giderilinceye kadar yıkandıktan sonra, renk kaybını durdurmak için hemen dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Safranin ile 30-60 saniye muamele edildi ve smear tekrar dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Kurutulduktan sonra preparat mikroskop altında incelemeye alındı. Mor renkle boyanan bakterilerin gram pozitif, pembe renk ile boyanan bakterilerin ise gram negatif olduğuna karar verildi (Cappuccino ve Sherman, 1992).

### **2.4.2. Endospor Boyama**

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

## **2.5. İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

### **2.5.1. Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi**

İzolatların maksimum ve minimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla bakteriler nütrient broth besiyerine ekildi ve 30-50°C arasındaki sıcaklıklar için 5 gün, 20-30°C arasındaki sıcaklıklar için 14 gün ve 20°C'nin altındaki sıcaklıklar için 21 gün etüvde inkübe edilerek maksimum ve minimum büyüme sıcaklıkları ortaya çıkarıldı (Sneath, 1968).

İzolatların optimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla nütrient broth besiyeri içinde yapılan 16-24 saatlik kültürlerden,  $OD_{600} = 0,1$  olacak şekilde yeniden nütrient broth besiyerine ekim yapıldı. Hazırlanan kültürler 28, 30 ve 37°C'lerde büyütüldü. Yapılan bu kültürlerden saat başı örnekler alınarak spektrofotometrede  $OD_{600}$ 'de absorbans değerleri ölçülerek bakterilerin optimum olarak büyüdüğü sıcaklıklar ortaya çıkarıldı (Cappuccino ve Sherman, 1992).

### **2.5.2. pH Aralıklarının Belirlenmesi**

İzolatların büyüebildiği pH aralığının belirlenmesi için izolatlar değişik pH değerlerine (3, 4,5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) sahip nütrient broth besiyerlerine inoküle edildi ve 30°C'ye ayarlı etüvde üç gün inkübe edildi. İnkübasyon neticesinde üreme olup olmadığına bakıldı (Cappucino ve Sherman, 1992).

### **2.5.3. NaCl Toleranslarının Belirlenmesi**

İzolatların NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla %1, 3, 5, 7, 9 ve 11 oranında NaCl eklenmiş nütrient sıvı besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerlerinden 4'er ml deney tüplerine alınarak her izolattan ekim yapıldı ve 14 gün boyunca 30°C'ye ayarlı etüvde inkübe edildi. Üreme olan ve olmayan tüpler belirlenerek, izolatların hangi oranlarda tuzu tolere edebildiklerine karar verildi (Sneath, 1968).

## **2.6. İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

### **2.6.1. Nişasta Hidroliz Testleri**

İzolatların nişastayı hidroliz edip etmediklerinin belirlenmesi için “nişasta agar besiyerleri” hazırlandı (Ek-2). Bu besiyerini içeren petrilere herbir izolattan çizgi ekim yapıldı ve 3 ve 7 gün boyunca 30°C’ye ayarlı etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra petrilere üzerine lugol ilave edildi ve koyu kahverengi rengin oluşumu nişastanın hidroliz olduğunu, mavi rengin oluşumu ise nişastanın hidroliz olmadığını gösterdi (Benson, 1985).

### **2.6.2. Katalaz Testleri**

Bakteriler, aerobik solunum sırasında hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve bazı durumlarda ise tamamen toksik olan süperoksitler üretmektedir. Mikroorganizmalar, oluşan bu ürünleri etkisiz hale getirmek için katalaz ve peroksidaz enzimlerini üretir. İzolatların katalaz enzimi üretilip üretilmediğini ortaya çıkarılması amacıyla “triptik soy agar besiyeri” hazırlandı. İzolatlar bu besiyeriye içeren petrilere ekildikten sonra, 24-48 saat 30°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından petrilere %3’lük hidrojen peroksit çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz kabarcıklarına göre testin pozitif olduğuna karar verildi (Cappucino ve Sherman, 1992).

### **2.6.3. Oksidaz Testleri**

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

### **2.6.4. MacConkey Agar Üzerinde Büyüme Yeteneklerinin Belirlenmesi**

İzolatların MacConkey agar üzerinde büyüyebilme yeteneklerine bakmak için steril bir öze ile MacConkey ağara ekim yapıldı. 24 saat inkübe edildikten sonra büyüme olup olmadığına bakıldı.

### **2.6.5. API Test Kitleri ile Bakteriyel 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.

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

Bu test uygulanırken nütrient agar üzerinde büyütülmüş gece kültürleri bir özeyle alınarak %0.85 NaCl içerisinde iyice karışması sağlanır. Burada aktarılacak olan kültür miktarı McFarland standardı kullanılarak belirlendi. Hazırlanan bu kültür daha sonra tüm kuyucuklara doldurulur. Bu aşamada kuyucuk içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmelidir. Daha sonra bu API panelleri 18-24 saat inkübasyona tabii tutulurlar. Elde edilen sonuçların renklerine bakarak sonucun pozitif mi yoksa negatif mi olduğuna karar verildi.

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

İzolatların bu test sisteminde değerlendirilmelerinin yapılabilmesi için bir gece önceden bakterilerin genel bir besiyeri olan tripton soy agar (TSA) besiyerine çizgi ekimleri yapıldı. İnkübasyon sonunda elde edilen tek kolonilerden 3 ml'lik besiyeri içerisinde 'McFarland' standartı 0,5 olacak şekilde aktarıldı. Hazırlanan bu bakteri karışımı test panellerinin başlangıç gözeneğine ilave edilip panel dik tutularak bakteri karışımının tüm test kuyucuklarına aynı anda ulaşması sağlanır. Ekimi yapılmış paneller özel bölmelerine yerleştirildikten sonra 24 saat ile 48 saat arasında inkübasyona tabii tutulur. Bu panel sistemini API 20E'den uygulandığındaki farkı panele sonradan ayıraç ilavesi yapılmamasıdır. Elde edilen sonuçlar gibi renklerine bakarak sonucun pozitif mi yoksa negatif mi olduğuna karar verildi.



### **2.6.6. VITEK-2 Test Kitleri ile Bakteriyel İzolatların Tanımlanması**

VITEK-2, bakterilerin asidifikasyon, alkalinizasyon, enzim hidrolizi gibi çeşitli metabolik aktiviteleri belirleyen ve geniş bir veri tabanı üzerinde tanımlanmalarını sağlayan sistemdir. Bu sistemde spor oluşturan gram pozitif basiller için BCL, gram pozitif koklar ve spor oluşturmeyen gram pozitif basiller için GP, gram negatif fermentatif ve nonfermantatif basiller içinse GN kartları kullanılır.

Örnekler triptik soy agar besiyerine ekildi ve 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra steril bir swap yardımıyla alınan bakteri steril tuz solüsyonuna aktararak süspansiyon haline getirildi. McFarland bulanıklık aralığı BCL için 1.80-2.20, GN ve GP kartları içinse 0.50-0.63 olacak şekilde ayarlandı ve süspansiyonlar kasetlere yerleştirildi. Kartlar da süspansiyonlara yerleştirilerek barkodları bilgisayar sistemine tanıtıldı ve cihazın otomatik taşıyıcı sistemine yüklendi. Yaklaşık 14-15 saat sonra sonuçlar alındı.

### **2.7. Bakteriyel İzolatların Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **2.7.1. 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 10mg/ml lizozim ilave edildi ve 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 ve 80°C’de 5 dakika bekletilip soğutuldu. Karışıma 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, pellet oluşuncaya kadar alt üst edildi

ve 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellete 600 µl etanol ilave edilip, 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 Rehydration Solution"da çözüldü ve 65 °C'de 1 saat bekletildi ve 4 °C'de muhafaza edildi.

### 2.7.2. 16S rDNA Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Genomik DNA'ları izole edilen bakteriyel izolatların 16S rDNA dizileri, (geri) 5'-ATTCTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA-3' ve (ileri) 5'-ATG GTA CCG TGT GTG ACGGGC GGT GTG TA-3' primer dizileri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı. PCR işleminde GoTaq DNA Polymerase (Promega) enzimi kullanıldı. 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.

### 2.7.3. *Bacillus* Cinsine Ait İzolatlarının *cry* Gen İçeriklerinin Belirlenmesi

E-1, E-5, E-6, E-7, L-8, L-9 kodlu izolatların *cry* gen içeriklerinin tespit edilebilmesi için PCR yapıldı. Bu çalışmada kullanılan genel primerler: *cry1* (ileri, 5'-CAT GAT TCA TGCGGC 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 AAATAA TCT GGG AAA TAG T-3'), *cry3* (ileri, 5'-CGT TAT CGC AGA GAG ATG ACATTA AC-3'; geri, 5'-CAT CTG TTG TTT CTG GAG GCA AT-3') ve *cry4* (ileri, 5'-GCATAT GAT GTA GCG AAA CAA GCC -3'; geri, 5'-GCG TGA CAT ACC CAT TTCCAG GTC C-3') (Ben-Dov vd., 1997). Ayrıca PCR ürünlerini doğrulamak için *cry1* ve *cry2* genlerini içeren *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BnBt) suşu kullanıldı. 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.

#### 2.7.4. 16S rDNA Gen Bölgelerinin pGEM-T Vektörüne Klonlanması

PCR yöntemi ile çoğaltılan 16S rDNA gen bölgeleri pGEM-T Easy Vector System (Promega)'i kullanılarak pGEM-T vektörüne klonlandı. Reaksiyon, 10 µl 2X Rapid Ligation Buffer, 8 µl İnsert 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.

#### 2.7.5. Kompetent Hücre Hazırlanması

Bir gün önceden petriye ekilmiş *Escherichia coli* JM101 suşundan 3 ml Luria-Bertani (LB) besiyerine ekim yapıldı ve 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 devam edildi. 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 CaCl<sub>2</sub> 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 CaCl<sub>2</sub> ile çözdürüldü. Hazırlanan kompetent hücre 4°C'de en az 2 saat bekledikten sonra kullanıldı.

#### 2.7.6. 16S rDNA Gen Bölgelerinin 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 dikkatli bir şekilde çözdürüldü. LB<sup>Amp</sup> agar besiyerine 40 µl X-Gal (40 mg/ml), 40 µl IPTG (24 mg/ml) ve transform olmuş hücre yayma ekim yapıldı. Petriler 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra içerisine plazmid alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçildi.

### 2.7.7. 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<sup>Amp</sup> 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 3 M Sodyum Asetat (pH 5.2) koyuldu. Tekrar altüst 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 edilerek 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 rDNA 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 10x reaksiyon tamponu ve 7,5 µl H<sub>2</sub>O 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 enziminin inaktive olması için bekletildi. Ardından %1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

### 2.7.8. Klonların İÇerdiği DNA Parçalarının Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi

Doğrulan klonlar 5 ml LB<sup>Amp</sup> sıvı besiyerine ekildi ve 37 °C’de 200 rpm’de gece boyu inkübe edildi. Kùltürler 16 saatlik inkübasyon sonunda 14.000 rpm’de 2 dakika çöktürüldükten sonra plazmit izolasyon kiti (Fermantas-GeneJET Plasmid Mini Prep Kit) kullanılarak izole edildi. Plazmid DNA konsantrasyonları OD<sub>260</sub>’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.

### 2.7.9. Elde Edilen Baz Dizilimlerinin İncelenmesi

Sekans sonucunda elde edilen 16S rDNA gen bölgesinin baz dizilimi gen bankasında bulunan diğer dizilerle karşılaştırıldı ve Mega (6) programı ile de bu dizilerin birbirleriyle olan benzerlikleri karşılaştırıldı. Bu programda analiz için Neighbor-Joining metodu, filogeni testi için 1.000 tekrarlı Bootstrap metodu kullanılarak izolatların filogenetik ağacı çizildi, ağaçta 50’nin üzerindeki benzerlikler gösterildi. Sonuçlar değerlendirildi.

### 2.7.10. *Bacillus* Cinsi İzolatların Protein İçerikleri

#### 2.7.10.1. *Bacillus* Cinsi İzolatların Spor ve Kristal Süspansiyonlarının Hazırlanması

*B. thuringiensis* izolatları “nütrient agar” besiyerlerinde beş gün büyütüldü. Besiyerlerinden alınan spor-kristal karışımları soğuk 1 M’lık NaCl’de süspanse edildi. Daha sonra bu karışım 13.000×g’de 4 °C’de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet steril ddH<sub>2</sub>O ile iki kez yıkandı. Pellet steril ddH<sub>2</sub>O’da çözüldü. Elde edilen proteinin konsantrasyonu Bradford (1976) yöntemi ile tayin edildi. Kullanılmaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

### 2.7.10.2. SDS-poliakrilamid Jel Elektroforezi

*B. thuringiensis* olduğu düşünölen izolatlardaki kristal proteinleri tespit etmek için spor-kristal karışımları sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) analiz edildi.

Miktarları tayin edilmiş olan protein numunelerinden uygun miktarlarda (10 µl) alındı. Bu numunelere muamele tamponu (60 mM Tris-HCl (pH 6,8), %25 Gliserol, %2 SDS, %5 2-merkaptöetanol, %0,1 bromo fenol blue) ilave edildikten sonra numuneler kaynayan su içerisinde 10 dakika bekletildi. Daha sonra Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %10'luk SDS-PAGE'e yüklendi. Jele 30 mA akım uygulanarak ayrılma işlemi gerçekleştirildi.

Ayrılma işlemi sonrası boyamadan önce, yürütölen proteinlerin jelde buldukları yerde kalmasını sağlamak ve istenmeyen kimyasalları (üre, tampon çözelti) uzaklaştırmak için etanol ve asetik asit çözeltisi içerisinde sabitleme yapıldı. Boyama işlemi için gümüş nitrat jele emdirildi. Jel, görüntü oluşumu için sodyum hidroksit ve formaldehit çözeltisi içerisine alındı. Görüntü oluşumu sağlandıktan sonra jel görüntüsü tarayıcı yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldı.

### 2.7.10.3. Kristal Boyama

*Bacillus thuringiensis* olduğu düşünölen izolatlardaki kristal proteinleri tespit edebilmek için kristal boyama yapıldı. Öncelikle hazırlanan kristal süspansiyonları lam üzerine ince bir tabaka halinde yayılarak smear haline getirildi. Preparat üç kez ateşten geçirilerek kristallerin lam üzerine yapışması sağlandı. 70 sn buffalo black'de 20 sn karbon funchsini'de bekletilerek kristal yapıların boyanması sağlandı.

## 2.8. Bakteriyel İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

### 2.8.1. *Galleri mellonella* İçin Yarı Sentetik Besin Hazırlanması

Aktivite testlerinde kullanılan *G. mellonella* için yarı sentetik besin hazırlandı. Bunun için 500 gr kepek, 200 gr petek, 150 ml süzme bal, 150 ml su ve 300 ml gliserin bir kapta iyice karıştırıldı (Bronskill, 1961).

### 2.8.2. *C. tenebrionis*'ten İzole Edilen Bakterilerin İnsektisidal Aktivite Testleri

*C. tenebrionis*'ten izole edilen ve karakterizasyonları yapılan izolatlar 96 saat 30°C'ye ayarlı sallayıcıda 5 ml nütrient sıvı besiyeri içerisinde inkübe edildi. Sonra 3000×g'de 10 dakika santrifüj edildi. Hücrelerin oluşturduğu pellet 5 ml steril PBS'de çözüldü. Bakteri yoğunlukları, spektrofotometrede ölçülerek ayarlandı (Ben-Dov vd., 1995).

Uygun konsantrasyonlarda hazırlanan izolatların insektisidal etkilerini tespit etmek amacıyla karaağaç yaprak böceği (*Pyrrhalta luteola*), un kurdu (*Tenebrio molitor*) ile petek güvesi (*Galleria mellonella*) üzerinde testler gerçekleştirildi.

Testlerde karaağaç yaprak böceği için bakteri yoğunluğu OD<sub>600</sub>'de 1,89 (1,8×10<sup>9</sup> bakteri/ml) olacak şekilde ayarlanmış süspansiyondan bulaştırılan taze karaağaç yaprakları 15 cm çapındaki plastik kutulara yerleştirildi. Sonra bu kutulara, 3-4 saat aç bırakılmış, sağlıklı 3. evre *Pyrrhalta luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae) larvalarından 10'ar adet yerleştirildi.

Petek güvesi için 1,8×10<sup>9</sup> bakteri/ml bakteri emdirilmiş özel besiyeri, 15cm çapındaki plastik kutulara yerleştirildikten sonra 3-4 saat aç bırakılmış sağlıklı 2-3. evre *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarından 10'ar adet kutulara yerleştirildi.

Un kurdu için OD<sub>600</sub>'de 1,89 (1,8×10<sup>9</sup> bakteri/ml) ayarlanan bakteri süspansiyonundan seyreltikler oluşturularak 1,8×10<sup>9</sup>, 1,8×10<sup>8</sup>, 1,8×10<sup>7</sup> ve 1,8×10<sup>6</sup> olmak üzere 4 farklı konsantrasyon ayarlandı. Bu süspansiyonlardan emdirilmiş kepekler 15 cm'lik plastik kutulara yerleştirildikten sonra gece boyu aç bırakılmış sağlıklı 10'ar adet 3. evre *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvaları da bu kutulara yerleştirildi.

Deney düzenekleri 28°C'de 12:12 ışık periyodunda ve %60 nem ortamında gerçekleştirildi ve 15 gün boyunca günlük takip edildi. Kontrol grubunda ise steril PBS kullanıldı. Tüm denemeler üç defa tekrar edildi ve 15 gün sonunda ölüm oranları Abbott formülüne göre hesaplandı (Abbott, 1925).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. *Capnodis tenebrionis* Larva ve Erginlerinden Bakteri İzolasyonu

Bu çalışmada, Amasya bölgesindeki meyve bahçelerinden toplanan *Capnodis tenebrionis* larva ve erginlerinden 5 tanesi ölü larvadadan, 6 tanesi erginden ve 10 tanesi sağlıklı larvalardan olmak üzere 21 adet izolat elde edildi. Daha sonra izole edilen bu bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilerek insektisidal aktivitelerine bakıldı.

Saflaştırılan bu izolatlardan larvalardan izole edilenler L-1, L-2, L-3, L-4, L-5, L-6, L-7, L-8, L-9, L-10; erginlerden izole edilenler E-1, E-2, E-3, E-4, E-5, E-6; ölü larvalardan izole edilenler ise, ÖL-1, ÖL-2, ÖL-3, ÖL-4, ÖL-5 olarak isimlendirildi.

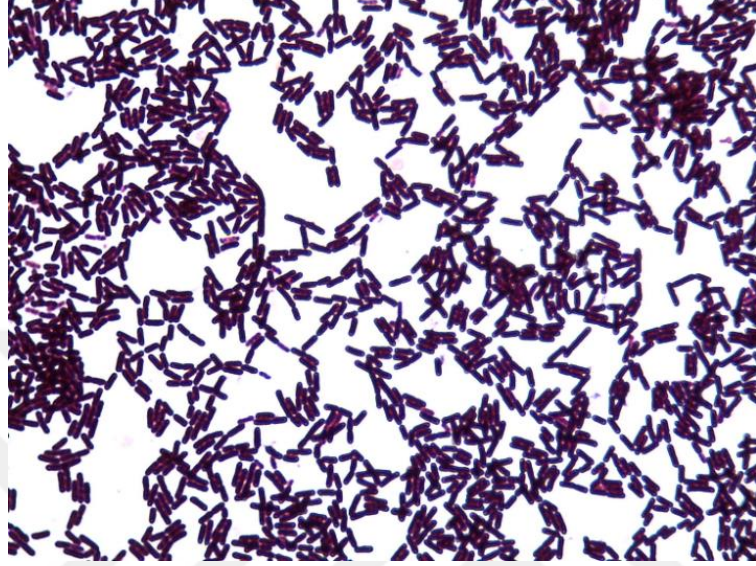
#### 3.2. Bakteriyel İzolatların Morfolojik ve Boyama Özellikleri

İzolatların koloni rengi ve şekli binoküler mikroskop kullanılarak incelendi. Bu inceleme sonuçlarına göre; L-1 numaralı izolatın açık krem renkli düz- yuvarlak olduğu, L-2 numaralı izolatın krem renkli düz-yuvarlak, L-3 numaralı izolatın krem düz-yuvarlak, L-4 numaralı izolatın krem renkli düz-yuvarlak, L-5 ve L-6 numaralı izolatların krem renkli dalgalı-yuvarlak, L-7 ve L-8 numaralı izolatların açık krem ve dalgalı, L-9 numaralı izolatın krem renkli ve düz-yuvarlak, L-10 numaralı izolatın krem dalgalı-yuvarlak, ÖL-1 numaralı izolatın açık krem rizoidli, ÖL-2 numaralı izolatın şeffaf renkli ve mukuslu, ÖL-3 numaralı izolatın açık krem düz-yuvarlak, ÖL-4 numaralı izolatın krem düz-yuvarlak, ÖL-5 numaralı izolatın açık krem düz-yuvarlak, E-1 numaralı izolatın krem dalgalı-yuvarlak, E-2 numaralı izolatın açık krem düz-yuvarlak, E-3 numaralı izolatın krem düz-yuvarlak, E-4, E-5 ve E-6 numaralı izolatların ise krem dalgalı-yuvarlak koloni morfolojisine sahip olduğu belirlendi.

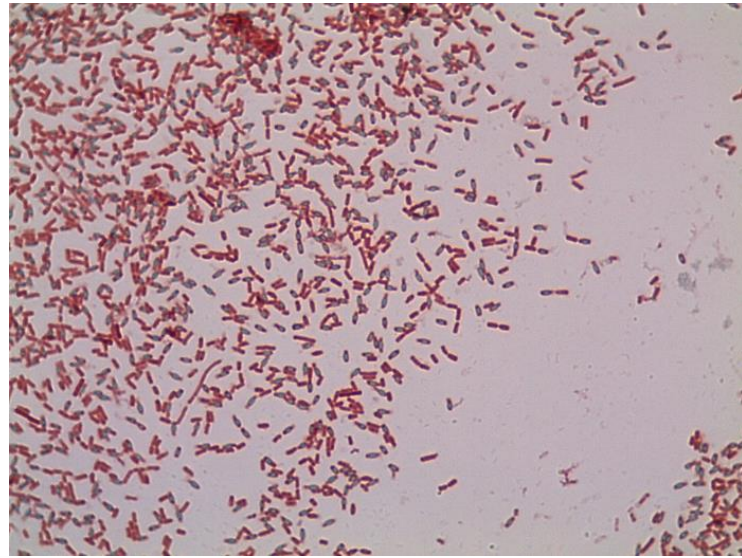
Yapılan gram boyama ve endospor boyama sonucunda L-1, L-3, E-2 numaralı izolatların hücre şeklinin kokobasil, L-2, L-4, L-5, L-6, L-7, L-8, L-9, L-10, ÖL-1, ÖL-2, ÖL-3, ÖL-4, ÖL-5, E-1, E-3, E-4, E-5, E-6 numaralı izolatların hücre şeklinin basil olduğu belirlendi (Şekil 7).



L-1, L-3, E-2 numaralı izolatların gram negatif ve endospor ihtiva etmediği, L-2, L-4, L-5, L-6, L-7, L-8, L-9, ÖL-1, ÖL-2, ÖL-3, ÖL-4, E-1, E-3, E-4, E-5, E-6 numaralı izolatların ise hem gram pozitif hem de endospor ihtiva ettikleri belirlendi (Şekil 8).



Şekil 7. Gram boyama sonucu elde edilen hücre görüntüsü



Şekil 8. Spor boyama sonucu elde edilen hücre görüntüsü

Uygulanan hareket testinin sonucuna göre L-1, ÖL-1 ve E-2 numaralı izolatlar hareketsiz, L-2, L-3, L-4, L-5, L-6, L-7, L-8, L-9, L-10, ÖL-2, ÖL-3, ÖL-4, ÖL-5, E-1, E-3, E-4, E-5, E-6 numaralı izolatların hareketli olduğu belirlendi (Tablo 6).

Tablo 6. Bakteriyeel izolatların morfolojik ve boyama özellikleri

İzolatlar	Koloni Rengi	Koloni Şekli	Hücre Şekli	Gram Boyama	Spor Boyama	Hareket Testi
L-1	Açık Krem	Düz Yuvarlak	Kokobasil	-	-	-
L-2	Krem	Düz Yuvarlak	Basil	+	+	+
L-3	Krem	Düz Yuvarlak	Kokobasil	-	-	+
L-4	Krem	Düz Yuvarlak	Basil	+	+	-
L-5	Krem	Dalgalı Yuvarlak	Basil	+	+	+
L-6	Krem	Dalgalı Yuvarlak	Basil	+	+	+
L-7	Açık Krem	Dalgalı Yuvarlak	Basil	+	+	+
L-8	Açık Krem	Dalgalı Yuvarlak	Basil	+	+	+
L-9	Krem	Düz Yuvarlak	Basil	+	+	+
L-10	Krem	Dalgalı Yuvarlak	Basil	+	+	+
ÖL-1	Açık Krem	Rizoidli	Basil	+	+	-
ÖL-2	Açık Krem	Dalgalı Yuvarlak	Basil	+	+	+
ÖL-3	Açık Krem	Düz Yuvarlak	Basil	+	+	+
ÖL-4	Krem	Düz Yuvarlak	Basil	+	+	+

Tablo 6'nın devamı

ÖL-5	Açık Krem	Düz Yuvarlak	Basil	+	+	+
E-1	Krem	Dalgalı Yuvarlak	Basil	+	+	+
E-2	Açık Krem	Düz Yuvarlak	Kokobasil	-	-	-
E-3	Krem	Düz Yuvarlak	Basil	+	+	+
E-4	Krem	Dalgalı Yuvarlak	Basil	+	+	+
E-5	Krem	Dalgalı Yuvarlak	Basil	+	+	+
E-6	Krem	Dalgalı Yuvarlak	Basil	+	+	+

### 3.3. Bakteriyel İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Mikroorganizmaların büyümelerinde etkili olan pH, NaCl, ve sıcaklık gibi fiziksel faktörlerinin optimum aralıklarının belirlemek amacıyla çeşitli aralıklarda testler yapıldı.

Sıcaklık testlerinde tüm izolatların 35°C'de büyüebildikleri, +4°C'de L-1, L-10 ve ÖL-5 numaralı izolatların zayıf büyüebildikleri, 10°C'de L-1, L-10 ve ÖL-2 numaralı izolatların büyüebildikleri, 40°C'de yalnızca ÖL-1 numaralı izolatın büyüemediği, 45°C'de L-3,L-7, L-8, L-9, ÖL-2, ÖL-3, ÖL-5 ve E-3 numaralı izolatların büyüebildiği, 50 °C'de ise L-7 ve E-3 numaralı izolatların iyi büyüebildikleri belirlendi (Tablo 7).

Tablo 7. Bakteriyeel izolatların maksimum ve minimum sıcaklık özellikleri

İzolatlar	4°C	10°C	35°C	40°C	45°C	50°C
L-1	-	+	+	+	-	-
L-2	-	-	+	+	-	-
L-3	-	-	+	+	+	-
L-4	-	-	+	+	-	-
L-5	-	-	+	+	-	-
L-6	-	-	+	+	-	-
L-7	-	-	+	+	+	+
L-8	-	-	+	+	+	-
L-9	-	-	+	+	+	-
L-10	Z+	+	+	+	-	-
ÖL-1	-	+	+	-	-	-
ÖL-2	-	-	+	+	+	-
ÖL-3	-	-	+	+	+	-
ÖL-4	-	-	+	+	-	-
ÖL-5	Z+	+	+	+	+	-
E-1	-	-	+	+	-	-
E-2	-	-	+	+	-	-
E-3	-	-	+	+	+	+
E-4	-	-	+	+	-	-
E-5	-	-	+	+	-	-
E-6	-	-	+	+	-	-

Z: Zayıf

İzolatların NaCl'ye olan toleranslarını belirlemek için yapılan testler sonucunda %1 ve %3 NaCl içeren besiyerinde tüm izolatların büyüyebildikleri, %5 NaCl içeren besiyerinde E-6 numaralı izolatın zayıf pozitif olduğu, L-8 ve ÖL-1 numaralı izolatın büyüemediği, %7 NaCl içeren besiyerinde E-3, E-4, ÖL-2, ÖL-3, ÖL-5, L-3, L-7, L-9 numaralı izolatların büyüyebildikleri, %9 ve %11 NaCl içeren besiyerinde E-3, ÖL-2, L-7, ve L-9 numaralı izolatların büyüyebildikleri gözlemlendi (Tablo 8).

Tablo 8. Bakteriyel izolatların farklı NaCl oranlarındaki büyüme kapasiteleri

İzolatlar	%1	%3	%5	%7	%9	%11
L-1	+	+	+	-	-	-
L-2	+	+	+	-	-	-
L-3	+	+	+	+	-	-
L-4	+	+	+	-	-	-
L-5	+	+	+	-	-	-
L-6	+	+	+	-	-	-
L-7	+	+	+	+	+	+
L-8	+	+	-	-	-	-
L-9	+	+	+	+	+	+
L-10	+	+	+	-	-	-
ÖL-1	+	+	-	-	-	-
ÖL-2	+	+	+	+	+	+
ÖL-3	+	+	+	+	-	-
ÖL-4	+	+	+	-	-	-
ÖL-5	+	+	+	+	-	-
E-1	+	+	+	-	-	-
E-2	+	+	+	-	-	-
E-3	+	+	+	+	+	+
E-4	+	+	+	+	-	-
E-5	+	+	+	-	-	-
E-6	+	+	Z+	-	-	-

Z: Zayıf

İzolatların pH toleransını belirlemek için yapılan testlerde pH 5, 6, 7, 8, ve 9'da hepsinin büyüebildiği, pH 3 ve 4'de hiçbirinin büyüemediği, pH 10'da yalnızca ÖL-1'in büyüemediği, pH 11' de E-2, ÖL-1, ÖL-2, ÖL-3'ün büyüemediği gözlemlendi (Tablo 9).

Tablo 9. Bakteriyel izolatların minimum ve maksimum pH büyüme aralıkları

İzolatlar	3	4	5	6	7	8	9	10	11
L-1	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-2	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-3	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-4	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-5	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-6	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-7	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-8	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-9	-	-	+	+	+	+	+	+	+
L-10	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ÖL-1	-	-	+	+	+	+	+	-	-
ÖL-2	-	-	+	+	+	+	+	+	-
ÖL-3	-	-	+	+	+	+	+	+	-
ÖL-4	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ÖL-5	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E-1	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E-2	-	-	+	+	+	+	+	+	-
E-3	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E-4	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E-5	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E-6	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Bakterilerin tür tayininde bazı enzimleri üretip üretmedikleri, bazı organik maddeleri sentezleyip sentezleyemedikleri ya da yine bazı organik maddeleri parçalayıp parçalayamadıkları da önemli bir kriterdir. Bu amaçla nişasta hidrolizi, oksidaz ve katalaz testleri yapıldı. Test sonuçları Tablo 10’da verilmektedir. Bu testlerin sonucuna göre katalaz testinde yalnızca L-1 izolatının katalaz enzimi üretmediği görülmüştür. Oksidaz testinde E-1 numaralı izolat zayıf pozitif iken, L-3, L-4, L-8, ÖL-1, ÖL-3 ve ÖL-4 numaralı izolatların oksidaz enzimi üretmediği sonucu elde edildi. Nişasta hidrolizi

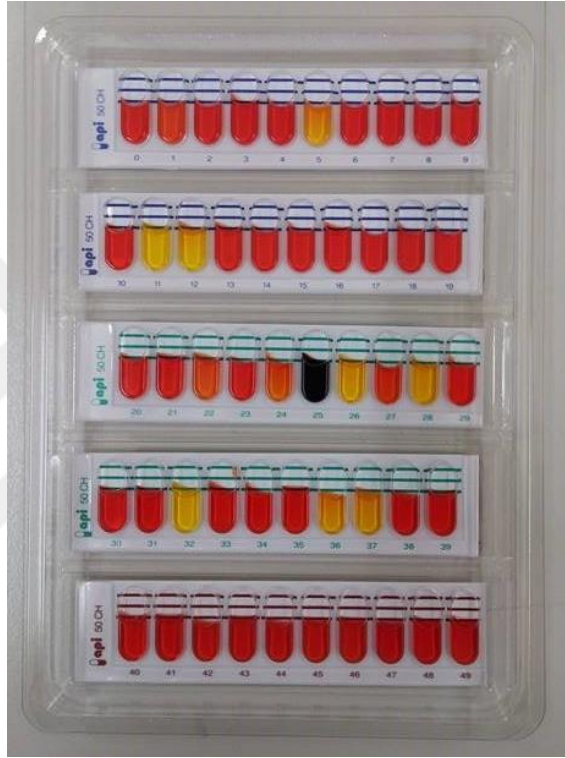
testinde ise E-1, E-4, E-5, E-6, L-2, L-4, L-5, L-6, L-8, L-9, ÖL-1, ÖL-2, ÖL-4 numaralı izolatların nişastayı hidrolize ettiği sonucuna varıldı.

MacConkey agar üzerinde büyüebilme yeteneklerini araştırmak için ekim yapıldı. Bunun sonucunda L-1, L-3 ve E-2 numaralı izolatlar pozitif sonuç verirken, L-10 ve ÖL-5 numaralı izolatlar zayıf büyüme gösterdi. L-2, L-4, L-5, L-6, L-7, L-7, L-8, L-9, ÖL-1, ÖL-2, ÖL-3, ÖL-4, E-1, E-3, E-4, E-5, ve E-6 numaralı izolatlar ise MacConkey agar üzerinde büyüemedi (Tablo 10).

Tablo 10. Bakteriyel izolatların bazı biyokimyasal özellikleri

İzolatlar	Katalaz Testi	Oksidaz Testi	Nişasta Testi	MacConkey Testi
L-1	-	+	-	+
L-2	+	+	+	-
L-3	+	-	-	+
L-4	+	-	+	-
L-5	+	+	+	-
L-6	+	+	+	-
L-7	+	+	-	-
L-8	+	-	+	-
L-9	+	+	+	-
L-10	+	+	-	Z+
ÖL-1	+	-	+	-
ÖL-2	+	+	+	-
ÖL-3	+	-	-	-
ÖL-4	+	-	+	-
ÖL-5	+	+	-	Z+
E-1	+	Z+	+	-
E-2	+	+	-	+
E-3	+	+	-	-
E-4	+	+	+	-
E-5	+	+	+	-
E-6	+	+	+	-

API 50CHB test k p llerine yapılan ekimlerin sonunda sıfır numaralı t p kontrol olarak alındı ve renk değişimi olan tüpler pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Tablo 11). Aynı şekilde API 20E test k p llerine 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 (Tablo 12). Bir izolatımıza ait API 20E ve API 50CHB test panellerinin sonuçları ise şekil 9 ve 10’da gösterildiği gibidir.



şekil 9. API 50CHB test sistemi görüntüsü



şekil 10. API 20E test sistemi görüntüsü



Tablo 11. Gram pozitif izolatların API 50 CHB test sonuçları

Testler	Açık Adı	L-2	L-4	L-5	L-6	L-7	L-8	L-9	L-10	ÖL-1	ÖL-2	ÖL-3	ÖL-4	ÖL-5	E-1	E-3	E-4	E-5	E-6
GLY	Gliserol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ERY	Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
DARA	D-Arabinoz	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
LARA	L-Arabinoz	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
RIB	D-Riboz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DXYL	D-Xylose	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
LXYL	L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADO	D-Adonitol	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
MDX	Metil- $\beta$ -D- Xylopiranosid	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAL	D-Galaktoz	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
GLU	D-Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FRU	D-Fruktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tablo 11'in devamı

MNE	D-Mannoz	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
SBE	L-Sorboz	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
RHA	L-Rhamnoz	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
DUL	Dulcitol	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
INO	İnositol	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
MAN	D-Mannitol	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
SOR	D-Sorbitol	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MDM	Metil- $\alpha$ D- mannopiranosid	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MDG	Metil- $\alpha$ D- glikopiranosid	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
NAG	N- asetilglukozamin	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
AMY	Amygdalin	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-

Tablo 11'in devamı

ARB	Arbutin	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
ESC	Esculin-ferrik sitrat	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAL	Salisin	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
CEL	D-selobiyoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	D-Maltoz	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	D-Laktoz (sığır kökenli)	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
MEL	D-Melibiyoz	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
SAC	D-Sakaroz (sükroz)	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
TRE	D-trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
INU	İnulin	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
MLZ	D-Melezitoz	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
RAF	D-rafinoz	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AMD	Amidon (nişasta)	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+

Tablo 11'in devamı

GLYG	Glikojen	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
XLT	Ksilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEN	Gentiobiyo	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
TUR	D-Turanoz	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
LYX	D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAG	D-Tagatoz	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
DFUG	D-fukoz	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFUC	L-Fukoz	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
DARL	D-Arabitol	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
LARL	L-Arabitol	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GNT	Potasyum glukonat	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
2KG	Potasyum 2- ketoglukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5 KG	Potasyum 5- ketoglukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 12. İzolatların API 20E test sonuçları

Testler	Substrat	Aktivite	L- 1	L- 2	L- 3	L- 4	L- 5	L- 6	L- 7	L- 8	L- 9	L- 10	ÖL- 1	ÖL- 2	ÖL- 3	ÖL- 4	ÖL- 5	E- 1	E- 2	E- 3	E- 4	E- 5	E- 6
ONPG	ONPG	β-galaktosidaz	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
ADH	Arginin	Arginin dihidrolaz	-	-	+	-	+	-	+	-	Z+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LDC	Lisin	Lisin dekarboksilaz	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
ODC	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	Sitrat	Sitrat kullanımı	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	Nathiosulfate	H <sub>2</sub> S üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	Üre	Üre hidrolizi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	Triptofan	Deaminaz	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	İndol	İndol üretimi	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
VP	Napiruvat	Aseton üretimi	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
GEL	Kömür jelatin	Jelatinaz	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
GLU	Glukoz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	Mannitol	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	+	-	-	+	Z+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-

Tablo 12'nin devamı

SOR	Sorbitol	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
RHA	Ramnoz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	+	-	-	+	Z+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
SAC	Sakaroz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	+	-	-	+	Z+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
MEL	Melibiyoz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	+	-	-	+	Z+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
AMY	Amigdalın	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	+	-	-	+	Z+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
ARA	Arabinoz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	+	+	-	-	+	Z+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-

API test kitlerinden elde edilen sonuçlar API Software programında değerlendirilerek izolatların tanımlaması yapıldı. İzolatların benzerlik gösterdiği bakteriler Tablo 13’de verildi. Buna göre L-4, L-9, ÖL-2 ve ÖL-4 numaralı izolatların tanımlaması gerçekleştirilemedi. Diğer izolatlar ise tür seviyesinde tanımlandı.

Tablo 13. API sonuçları ile tanımlanan bakteriyel izolatlar

İzolatlar	Bakteri Türü
L-1	<i>Routella terrigena</i>
L-2	<i>Bacillus thuringiensis</i>
L-3	<i>Enterobacter cloacae</i>
L-4	Tanımlanamadı
L-5	<i>Bacillus thuringiensis</i>
L-6	<i>Bacillus thuringiensis</i>
L-7	<i>Bacillus pumilus</i>
L-8	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
L-9	Tanımlanamadı
L-10	<i>Bacillus subtilis</i>
ÖL-1	<i>Bacillus thuringiensis</i>
ÖL-2	Tanımlanamadı
ÖL-3	<i>Bacillus megaterium</i>
ÖL-4	Tanımlanamadı
ÖL-5	<i>Bacillus subtilis</i>
E-1	<i>Bacillus thuringiensis</i>
E-2	<i>Klebsiella oxytoca</i>
E-3	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>
E-4	<i>Bacillus thuringiensis</i>
E-5	<i>Bacillus thuringiensis</i>
E-6	<i>Bacillus thuringiensis</i>

VITEK-2 panel test sistemi ile tam otomatik olarak bakterilerin asidifikasyon, alkalinizasyon, enzim hidrolizi gibi çeşitli metabolik aktiviteleri belirlendi ve kendi veritabanı üzerinde sonuçlar değerlendirildi. Gram pozitif sporlu bakteriler için VITEK-2

BCL kartı, gram negatif kok ve basil bakteriler içinse VITEK-2 GN kartı kullanılarak biyokimyasal bazı özellikler test edildi ve sonuçları Tablo 14 ve 15’de gösterilmiştir.





Tablo 14. *Bacillus* cinsi izolatların VITEK-2 test sonuçları

Testler	Açık Adı	L- 2	L- 4	L- 5	L- 6	L- 7	L- 8	L- 9	L- 10	ÖL- 1	ÖL- 2	ÖL- 3	ÖL- 4	ÖL- 5	E- 1	E- 3	E- 4	E- 5	E- 6
BXYL	Beta-Xylosidaz	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
LysA	L-Lizin Arilamidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AspA	L-Aspartat Arilamidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LeuA	Leusine Arylamidase	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
PheA	Fenilalanin Arilamidaz	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
ProA	L-Prolin Arilamidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BGAL	Beta-galaktosidaz	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
PyrA	L-Pirolidonil-Arilamidaz	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
AGAL	Alfa-Galaktosidaz	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
AlaA	Alanin Arilamidazı	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
TyrA	Tirosin Arilamidaz	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
BNAG	Beta-N-Asetil-Glukozamin	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
APPA	Ala-Phe-Pro Arilamidaz	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
CDEX	Siklodekstrin	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
dGAL	D-galaktoz	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GLYG	Glikojen	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
INO	Myo-İnositol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-

Tablo 14'ün devamı

MdG	Metil-A-D-Glukopiranozid Asitlenmesi	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
ELLM	Ellman	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
MdX	Metil-D-Ksilosid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMAN	Alfa-Mannosidaz	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
MTE	Maltotriose	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
GlyA	Glisin Arilamidaz	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
dMAN	D-Mannitol	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
dMNE	D-Mannoz	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
dMLZ	D-Melezitoz	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
NAG	N-Asetil-D-Glukozamin	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
PLE	Palatinoz	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
IRHA	L-Ramnoz	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
BGLU	Beta-Glukozidaz	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
BMAN	Beta-Mannosidaz	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PHC	Fosforil Kolin	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVATE	Piruvat	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
AGLU	Alfa-Glukozidaz	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dTAG	D-Tagatoz	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Tablo 14'ün devamı

dTRE	D-trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
INU	Inulin	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
dGLU	D-Glikoz	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
dRIB	D-Riboz	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
PSCNa	Putresin Asimilasyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl6.5%	% 6.5 Nacl'de Büyüme	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
KAN	Kanamisin direnci	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
OLD	Oleandomisin direnci	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ESC	Eskülin hidrolizi	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
TTZ	Tetrazolyum Kırmızı	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
POLYB_R	Polymixin_B direnci	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+

Tablo 15. Gram negatif izolatların VITEK-2 sonuçları

Testler	Açık Adı	L-1	L-3	E-2
APPA	Ala-Phe-Pro Arilamidaz	-	-	-
ADO	Adonitol	+	-	+
PyrA	L-Pirolidonil-Arilamidaz	+	-	+
IARL	L-arabitol	-	-	+
dCEL	D-selobiyoz	+	+	+
BGAL	Beta-galaktosidaz	+	+	+
H <sub>2</sub> S	H <sub>2</sub> S Üretimi	-	-	-
BNAG	Beta-N-Asetil-Glukozamin	-	+	-
AGTp	Glutamil Arilamidaz pNA	-	-	-
dGLU	D-Glukoz	+	+	+
GGT	Gama-Glutamil-Transferaz	-	+	+
OFF	Fermantasyon / Glukoz	+	+	+
BGLU	Beta-glukozidaz	+	+	+
dMAL	D-Maltoz	+	+	+
dMAN	D-Mannitol	+	+	+
dMNE	D-Mannoz	+	+	+
BXYL	Beta-Xylosidase	+	+	+
BAlap	Beta-Alanin Arilamidaz pNA	-	-	-
ProA	L-Prolin Arilamidaz	+	-	-
LIP	Lipaz	-	-	-
PLE	Palatinoz	+	+	+
TyrA	Tirosin Arilamidaz	+	+	+
URE	Üre	-	-	+
dSOR	D-Sorbitol	+	+	+
SAC	Sakaroz	+	+	+
dTAG	D-Tagatoz	-	-	+
dTRE	D-trehaloz	+	+	+
CIT	Sitrat	+	+	+
MNT	Malonat	+	+	+
5KG	5-Keto-D-Glukonat	+	-	+

Tablo 15'in devamı

ILATk	L-Laktat Alkalinleştirme	+	+	+
AGLU	Alfa-Glukozidaz	-	-	-
SUCT	Süksinat Alkalinleştirme	+	+	+
NAGA	Beta-N-Asetil-Galaktozaminidaz	-	-	-
AGAL	Alfa-Galaktosidaz	+	+	+
PHOS	Fosfataz	-	+	+
GlyA	Glisin Arilamidaz	+	-	-
ODC	Ornitin dekarboksilaz	+	+	-
LDC	Lizin dekarboksilaz	+	-	+
IHISa	L-Histidin asimilasyon	-	-	-
CMT	Coumarate	-	-	-
BGUR	Beta Glukuronidaz	-	-	-
O129R	O / 129 Direnç	+	+	-
GGAA	Glu-Gly-Arg-Arilamidaz	-	-	-
IMLTa	L-Malat Asimilasyon	-	-	-
ELLM	Ellman	-	-	+
ILATa	L-Laktat Asimilasyon	-	-	-

VITEK-2 panel test sistemi ile bakterilere ait bazı biyokimyasal testler bilgisayar tarafından otomatik olarak değerlendirilerek izolatların tanımlaması sağlandı ve sonuçlar Tablo 16'da verildi. Buna göre L-9, L-10, ÖL-2 ve E-3 numaralı izolatlar tanımlanamazken diğer izolatlar tür seviyesinde tanımlandı.

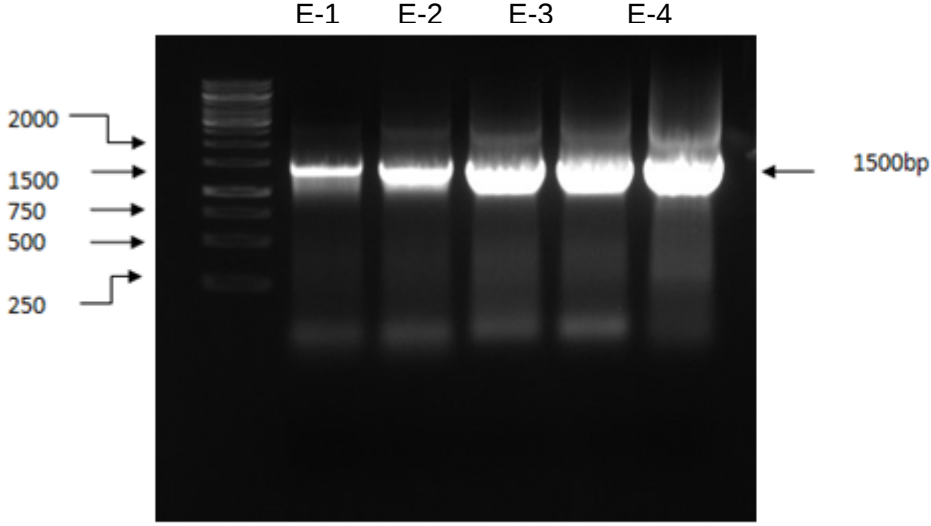
Tablo 16. VITEK-2 sonuçları ile tanımlanan bakteriyel izolatlar

İzolatlar	Bakteri Türü	Benzerlik (%)
L-1	<i>Raoutella ornithinolytica</i>	99
L-2	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	89
L-3	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	99
L-4	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	94
L-5	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	89
L-6	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	87
L-7	<i>Bacillus pumilus</i>	87
L-8	<i>Bacillus sirculans/ Paenibacillus glucanolyticus</i>	89
L-9	Tanımlanamadı	
L-10	Tanımlanamadı	
ÖL-1	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	94
ÖL-2	Tanımlanamadı	
ÖL-3	<i>Bacillus megaterium</i>	89
ÖL-4	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	85
ÖL-5	<i>Bacillus smithii</i>	94
E-1	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	87
E-2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99
E-3	Tanımlanamadı	
E-4	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	87
E-5	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	87
E-6	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	91

### 3.4. Bakteriyel İzolatların Moleküler Karakterizasyonu

#### 3.4.1. 16S rDNA Dizileri ve Filogenetik Analizi

Bakteri sistematığının belirlenmesi ve filogenetik ağaç oluşumunda 16S rDNA gen dizilerinin kullanılması günümüzde oldukça yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Bu yüzden öncelikle izolatlardan kromozomal DNA'lar izole edildi ve bu elde edilen kromozomal DNA'ların 16S rDNA bölgeleri PCR ile çoğaltılarak yaklaşık 1.500 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlendi (Şekil 11).



Şekil 11. Bazı İzolatların PCR ile çoğaltılmış 16S rRNA bölgelerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü (M: Markır (Fermentas, GeneRuler 1kb)

pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlanan 16S rDNA gen bölgelerinin nükleotid sırasının belirlenmesi için genin her iki tarafından dizin analizi yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi (Tablo 17). Filogenetik ağacın oluşturulmasında dizin analizi sonuçları ile Mega 6 programı yardımıyla maksimum parsimoni analizinden yararlanıldı. Filogenetik ağaç verileri ve 16S rDNA sonuçları birbirlerini desteklemektedir (Şekil 12 ve 13).

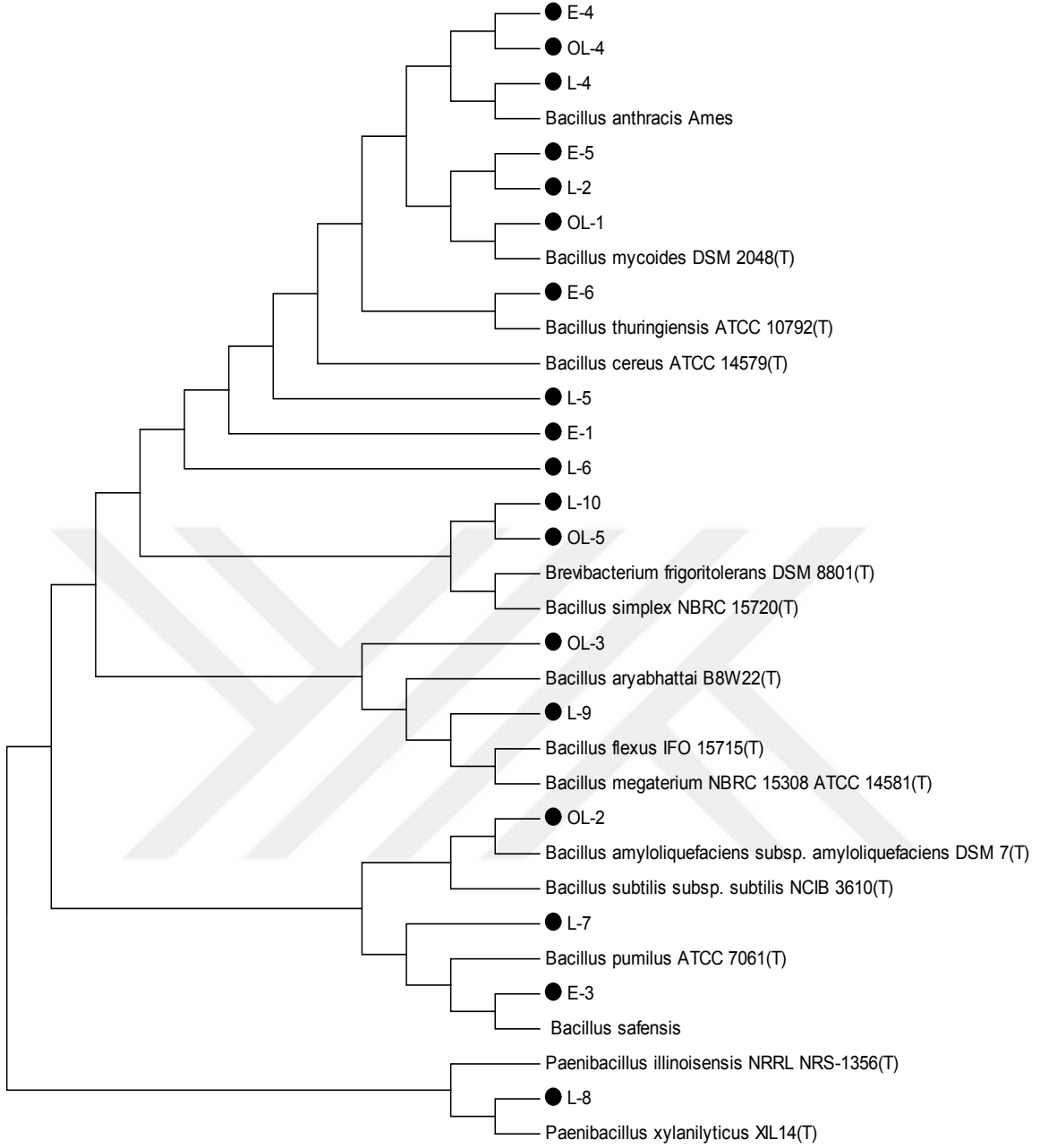
Tablo 17. İzolatların 16S rDNA dizin analizi sonuçları

İzolatlar	Türler	Benzerlik (%)
L-1	<i>Raoultella terrigena</i> <i>Raoultella variicola</i> <i>Raoultella ornithinolytica</i>	99
L-2	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus anthracis</i>	99
L-3	<i>Enterobacter ludwigii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter cancerogenus</i>	99
L-4	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus anthracis</i>	99
L-5	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus toyonensis</i>	99
L-6	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus toyonensis</i>	99
L-7	<i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus altitudinis</i> <i>Bacillus safensis</i>	99
L-8	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> <i>Paenibacillus illinoisensis</i> <i>Paenibacillus pabuli</i>	99
L-9	<i>Bacillus flexus</i> <i>Bacillus aryabhatttai</i> <i>Bacillus megaterium</i>	99
L-10	<i>Bacillus simplex</i> <i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	99

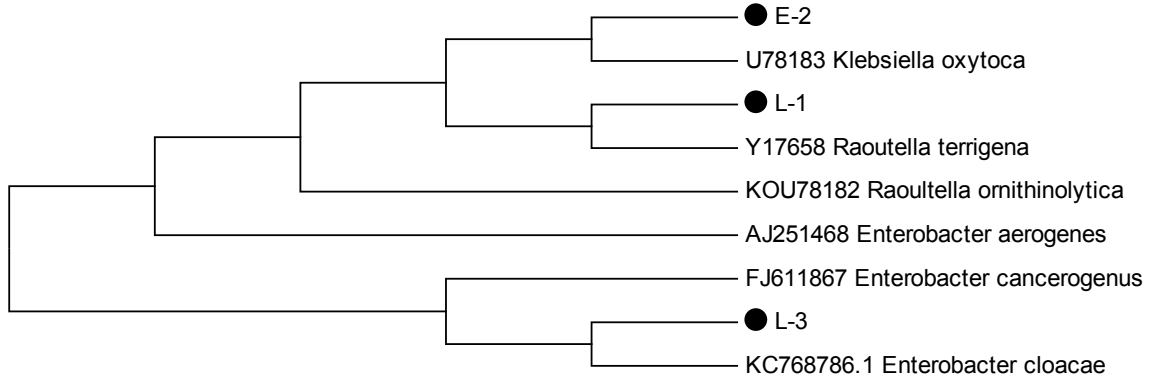


Tablo 17'nin devamı

ÖL-1	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus mycoides</i> <i>Bacillus cereus</i>	99
ÖL-2	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus siamensis</i>	99
ÖL-3	<i>Bacillus aryabhatai</i> <i>Bacillus megaterium</i>	99
ÖL-4	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus toyonensis</i>	99
ÖL-5	<i>Bacillus simplex</i> <i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	99
E-1	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus anthracis</i>	99
E-2	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Raoultella terrigena</i>	99
E-3	<i>Bacillus stratosphericus</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus safensis</i>	99
E-4	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus anthracis</i>	99
E-5	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus toyonensis</i>	99
E-6	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>	99



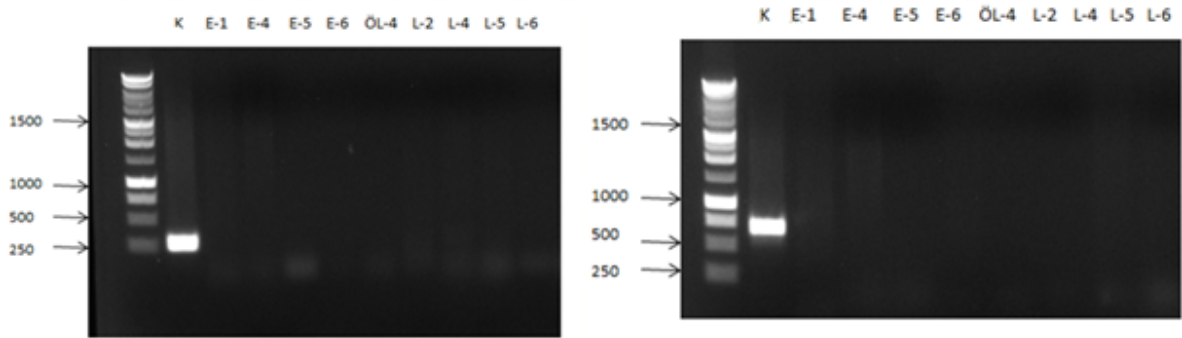
Şekil 12. Gram pozitif izolatların 16S rDNA bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı



Şekil 13. Gram negatif izolatların 16S rDNA bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı

### 3.4.2. *Bacillus* Cinsi İzolatların *cry* Gen İçerikleri

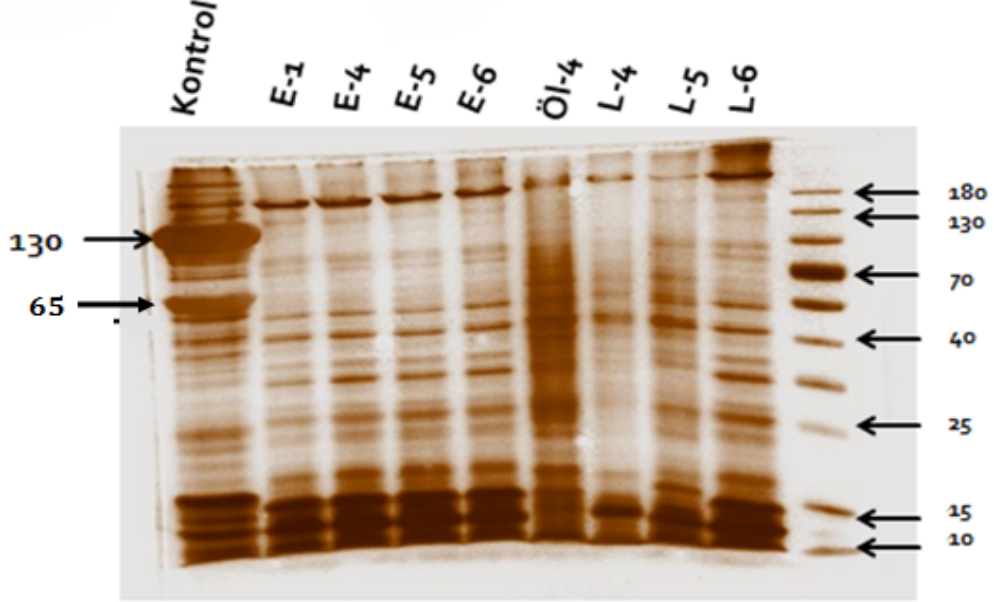
*Bacillus thuringiensis* olduğunu düşündüğümüz bazı izolatlara kristal proteinleri kodlayan *cry* genlerini belirleyebilmek için 4 çift genel primer (*cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*) kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltıldı. PCR sonucunda kılavuz suşlarla karşılaştırma yapılarak aynı büyüklükte hiçbir bant gözlemlenemedi.



Şekil 14. İzolatların PCR ile çoğaltılmış *cry1* ve *cry2* gen bölgelerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü (M: Marker (Promega 100 bp DNA Ladder), K: *Bacillus thuringiensis* BnBt suşu)

### 3.4.3. *Bacillus* Cinsi İzolatların Kristal Protein Profilleri

*B. thuringiensis* olarak düşünülen izolatlarının kristal proteinlerini tespit etmek için hazırlanan karışımları %10'luk SDS-PAGE'de analiz edildi (Şekil 15). Hiçbir izolatta kristal protein bandı gözlemlenemedi.



Şekil 15. İzolatların gümüş nitrat ile boyanmış protein profilleri (M: Marker, Kontrol: *Bacillus thuringiensis* BnBt suşu)

Ayrıca E-1, E-4, E-5, E-6, ÖL-4, L-2, L-4, L-5, L-6 numaralı izolatların kristal protein yapılarını gözlemleyebilmek için kristal boyama yapıldı. Işık mikroskopunda incelendi ve hiçbir izolatta kristal protein yapısı gözlemlenemedi.

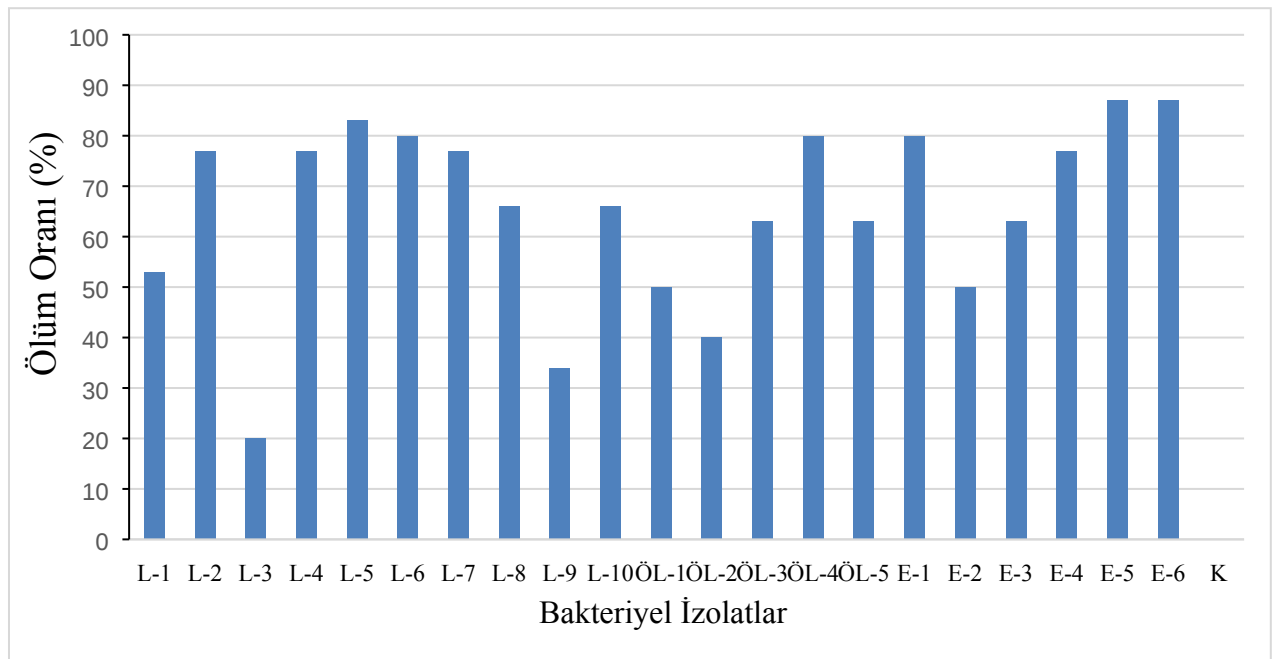
## 3.5. İsektisidal Aktivite Çalışmaları

### 3.5.1. İzolatların *Pyrrhalta luteola* (Karaağaç yaprak böceği) Üzerindeki İsektisidal Etkileri

İzolatların isektisidal etkilerinin belirlenebilmesi için laboratuvar ortamında Karaağaç yaprak böceği larvası (*Pyrrhalta luteola*)'nın 3. dönem larvaları kullanıldı. Denemelerde  $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml olacak şekilde hazırlanan süspansiyonlar karaağaç yapraklarına bulaştırılarak aç bırakılmış sağlıklı larvalara plastik bir kap içerisinde verildi.

Deney düzenekleri 28°C’de 12:12 ışık periyodunda ve %60 nem ortamında gerçekleştirildi. Denemeler 3 tekrarlı olarak yapıldı ve 15 gün boyunca günlük takip edilerek ölüm oranları kayıt edildi.

Şekil 16’de görüldüğü gibi E-5 ve E-6 numaralı izolatlarda %87’lik ölüm oranı ile en yüksek öldürücü etkiyi gösterdi. Bunu %83 ile L-5, %80 ile L-6, ÖL-4, E-1 , %77 ile L-2, E-4, L-4, L-7 numaralı izolatlarda takip etti. En düşük etki ise %20 ile L-3 numaralı izolatta görüldü. Geri kalan izolatlardan ÖL-2 %40 ölüm oranı, ÖL-1 ve E-2 %50 ölüm oranı, E-3, ÖL-3 ve ÖL-5 % 63 ölüm oranı, L-1 numaralı izolatta %53 ölüm oranı, L-10 ve L-8 %66 ölüm oranı ve L-9 numaralı izolat %34 ölüm oranı gözlemlendi.



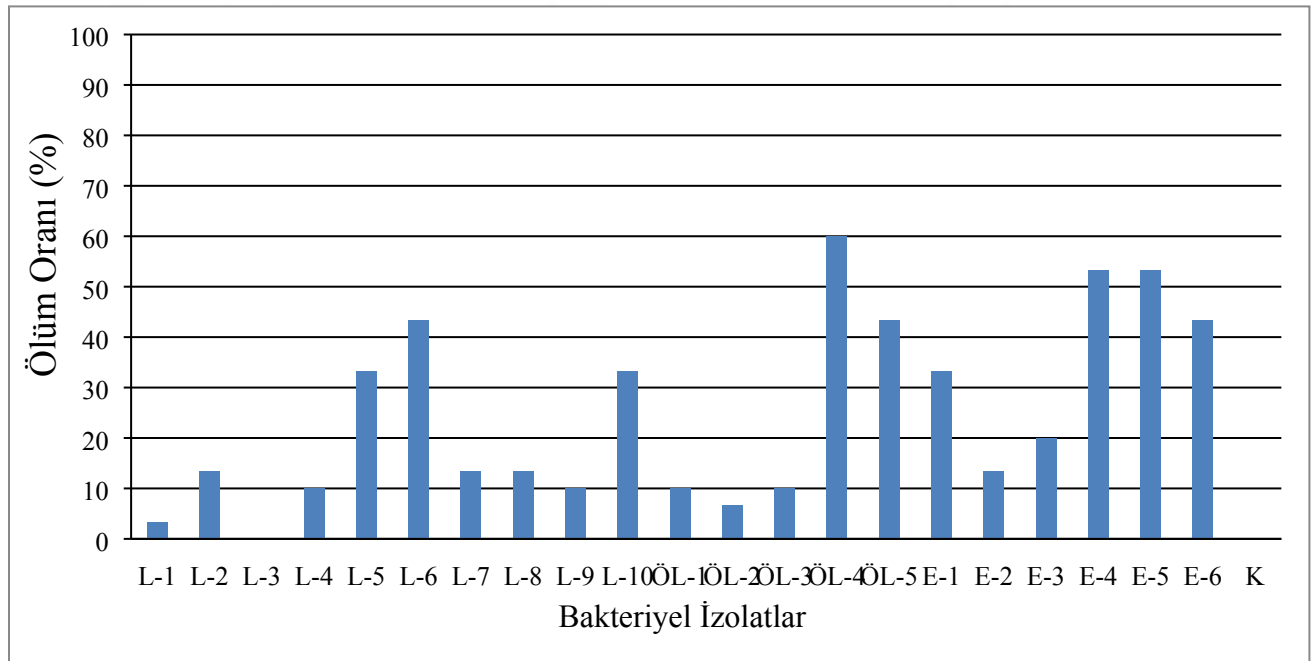
Şekil 16. *Capnodis tenebrionis*'ten izole edilen bakterilerin *Pyrrhalta luteola* (Karaağaç yaprak böceği) larvaları üzerindeki insektisidal aktiviteleri

### 3.5.2. İzolatların *Galleria mellonella* (Petek Güvesi) Üzerindeki İnsektisidal Etkileri

İzolatların insektisidal etkilerinin belirlenebilmesi için laboratuvar ortamında Petek güvesi larvası (*Galleria mellonella*)'nın 2-3. dönem larvaları kullanıldı. Denemelerde  $1,8 \times 10^9$  bakteri/ml olacak şekilde hazırlanan süspansiyonlar özel hazırlanmış yarı sentetik besine emdirilerek aç bırakılmış sağlıklı larvalara plastik bir kap içerisinde verildi.

Deney düzenekleri 28°C’de 12:12 ışık periyodunda ve %60 nem ortamında gerçekleştirildi. Denemeler 3 tekrarlı olarak yapıldı ve 15 gün boyunca günlük takip edilerek ölüm oranları kayıt edildi.

Şekil 17’de görüldüğü gibi ÖL-4 numaralı izolat %60’lık ölüm oranı göstermiştir. Bunu %53 ile E-4 v4 E-5 numaralı izolatlar takip etti. L-3 numaralı izolatta ise herhangi bir insektisidal etki gözlemlenemedi. Geri kalan izolatlardan L-6, ÖL-5 ve E-6 numaralı izolatlarda %43 ölüm oranı, L-5, L-10 ve E-1 %33 ölüm oranı, E-3 numaralı izolatta %20 ölüm oranı, ÖL-1, ÖL-3, L-4 ve L-9’da % 10 ölüm oranı, L-2, L-7, L-8 ve E-2 numaralı izolatlarda %13 ölüm oranı, ÖL-2 numaralı izolatta %6 ölüm oranı, ve L-1 numaralı izolatta %3 ölüm oranı gözlemlendi.



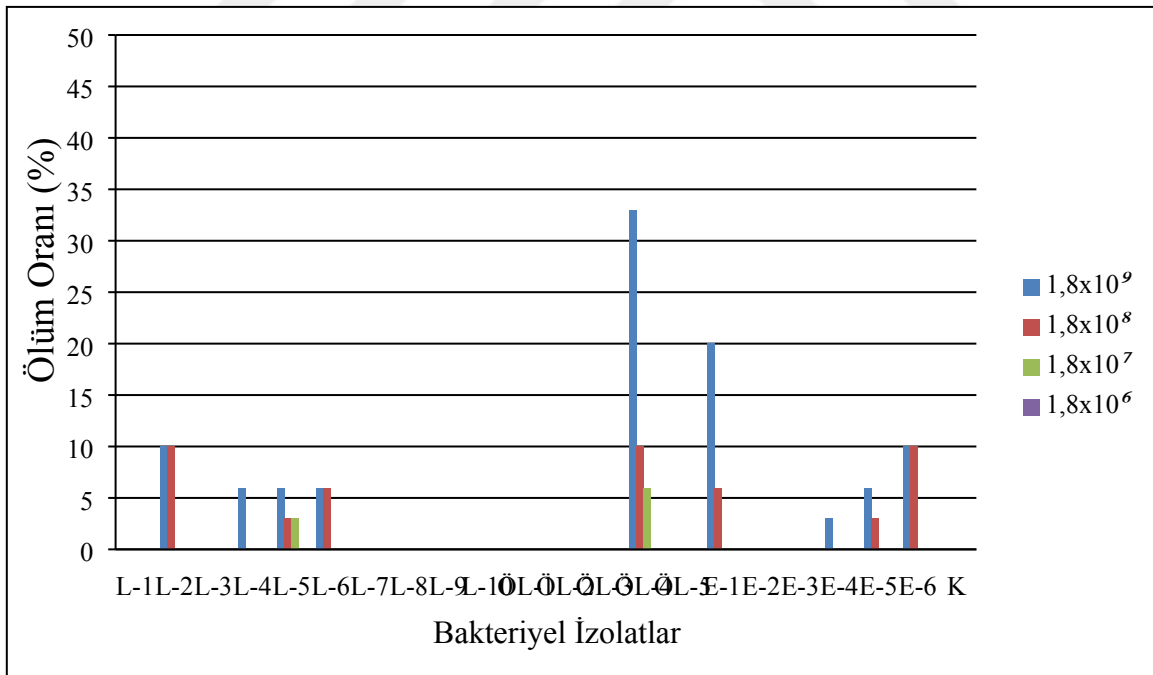
Şekil 17. *Capnodis tenebrionis*'ten izole edilen bakterilerin *Galleri mellonella* (Petek güvesi) larvaları üzerindeki insektisidal aktiviteleri

### 3.5.3. İzolatların *Tenebrio molitor* (Un Kurdu) Üzerindeki Doz Denemeleri

İzolatların insektisidal etkilerinin belirlenebilmesi için laboratuvar ortamında Un kurdu larvası (*Tenebrio molitor*)'nın 3. dönem larvaları kullanıldı. Denemelerde  $1,8 \times 10^9$ ,  $1,8 \times 10^8$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^6$  bakteri/ml olacak şekilde hazırlanan süspansiyonlar eşit miktarda kepeğe emdirildi ve aç bırakılmış sağlıklı larvalara plastik bir kap içerisinde verildi.

Deney düzenekleri 28°C’de 12:12 ışık periyodunda ve %60 nem ortamında gerçekleştirildi. Denemeler 3 tekrarlı olarak yapıldı ve 15 gün boyunca günlük takip edilerek ölüm oranları kayıt edildi.

Şekil 18’de görüldüğü gibi ÖL-4 numaralı izolat  $1,8 \times 10^9$  bakteri yoğunluğunda %33’lük  $1,8 \times 10^8$  bakteri yoğunluğunda %10 ve  $1,8 \times 10^7$  bakteri yoğunluğunda ise %6 ölüm oranıyla en yüksek öldürücü etkiyi göstermiştir. E-1 numaralı izolat ise  $1,8 \times 10^9$  bakteri yoğunluğunda %20,  $1,8 \times 10^8$  bakteri yoğunluğunda %6 ölüm oranı göstermiştir. Bunu  $1,8 \times 10^9$  ve  $1,8 \times 10^8$  bakteri yoğunluğundaki %10 ölüm oranıyla L-2 ve E-6 numaralı izolatlar takip etmiştir. L-6 numaralı izolat  $1,8 \times 10^9$  ve  $1,8 \times 10^8$  bakteri yoğunluğunda %6 ölüm oranı, L-5 numaralı izolat  $1,8 \times 10^9$  bakteri yoğunluğunda %6,  $1,8 \times 10^8$  ve  $1,8 \times 10^7$  bakteri yoğunluğunda %3 ölüm oranı göstermiştir. E-5 numaralı izolat  $1,8 \times 10^9$  bakteri yoğunluğunda %6 ölüm oranı ve  $1,8 \times 10^8$  bakteri yoğunluğunda ise %3 ölüm oranı göstermiştir. L-4 numaralı izolat  $1,8 \times 10^9$  bakteri yoğunluğunda %6, E-4 numaralı izolat ise  $1,8 \times 10^9$  bakteri yoğunluğunda %3 ölüm oranı göstermiştir. L-1, L-3, L-7, L-8, L-9, L-10, ÖL-1, ÖL-2, ÖL-3, ÖL-5, E-2, E-3 numaralı izolatlarda ise hiçbir insektisidal aktivite gözlemlenememiştir.



Şekil 18. *Capnodis tenebrionis*'ten izole edilen bakterilerin *Tenebrio molitor* (Un kurdu) larvaları üzerindeki doz denemeleri

#### 4. TARTIŞMA

İnsan nüfusunun sürekli artmasıyla tarımsal üretime olan ihtiyaç da aynı oranda artmaktadır. Bu da hiç şüphesiz tarımı en önemli sektörler arasına sokmaktadır. İklim özelliklerinden dolayı Türkiye meyve yetiştiriciliği ve ihracatı bakımından önemli bir ülke konumundadır. Bu yüzden kaliteli ve sürdürülebilir meyve yetiştiriciliği çok önemlidir. Bu gibi sebeplerden ötürü meyve yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayba yol açan zararlılarla en kısa sürede ve en etkili şekilde mücadele edilmesi gerekmektedir. Bitki üretiminin artması ve sürdürülebilirliği için bitkisel üretimde hastalık ve zararlılardan kaynaklanan %30-35 oranındaki kaybın azaltılması hayati bir değer taşımaktadır. Dolayısıyla da sürdürülebilir bitki koruma yapılması mecburidir. Sürdürülebilir bir tarım için ise en uygun mücadele şekli tüm bitki koruma yöntemlerinin bilimsel veriler ışığında beraber kullanıldığı, bir ekosistemdeki zararlıları tamamen yok etmek yerine ekonomik zarar eşiğinin altında tutma prensibine dayanan entegre mücadeledir.

Entegre mücadelenin en sürdürülebilir unsuru ise canlı olması sebebiyle soyunu devam ettirmesi ve doğaya uyum sağladığında sürekli bir denge unsuru olması nedeniyle biyolojik mücadele ürünleridir.

Bu çalışma ile Türkiye'nin en geniş alanda tarımı gerçekleştirilen meyve bahçelerinin en önemli zararlılarından olan *Capnodis tenebrionis*'den izole edilen bakteriyel izolatlarla tarım zararlılarına karşı kullanılacak mikrobiyal bir etmen geliştirilebilir.

Mikrobiyal etmen geliştirmenin temelinde zararlı böcekleri zayıflatan veya öldüren mikroorganizmaların keşfedilmesi yatar. Bu amaç doğrultusunda yapılması gereken ilk iş, zararlıların bakteriyel floralarının taranarak öldürücü etkisi en yüksek izolatların belirlenmesidir. Birçok böcek türü bireysel ya da popülasyon seviyesinde bakterilerle çok yakından ilişki içindedir (Boursaux-Eude ve Gross, 2000). Bazı bakteriler böcekler için patojendir. Zararlı böceklerin patojenleri çalışılırken, bakteriler arasındaki zorunlu simbiyotik ilişkiler büyük önem taşımaktadır (Sezen vd., 2004; İnce vd., 2008; Sevim vd., 2010; Gökçe vd., 2010). Zararlı böceklerin biyolojik mücadelesinde bu organizmaların kullanılması birçok bilimsel araştırmaya da temel oluşturmuştur (Haiwen vd., 2005).



Böcekler, taşıyıcı vektörler olarak bünyelerinde birçok bakteri bulundurur. Bunların bir kısmı bitkiler ve insanlarda çeşitli hastalıklara neden olurken, bazıları ise böceklerde çeşitli sorunlar oluşturur.

Yapılan literatür araştırması sonucunda daha önce *Capnodis tenebrionis*'in bakteriyel florasıyla ilgili herhangi bir çalışma tespit edilememiştir. Dolayısıyla, bu çalışma, *C. tenebrionis*'in bakteriyel florası üzerine yapılan ilk çalışmadır.

*C. tenebrionis*'in hem larvası hem de ergini zararlıdır ve larvanın kök kabuğunun altında bulunmasından dolayı mücadelesi çok zordur. Şu ana kadar zararlıyla mücadele de erginlerin toplanarak öldürülmesi ile mekanik mücadele insektisitler ile de kimyasal mücadele uygulanmasına rağmen yeterli sonuç elde edilememiş, böcek kimyasal ilaçlara karşı direnç kazanmıştır.

Bu çalışmada zararlı ile mücadelede bakterilerin rolünü anlayabilmek için öncelikle toplanan larva ve erginlerden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. *C. tenebrionis*'ten 21 adet bakteriyel izolat elde edildi. İzolatların tür tayininde kullanılan morfolojik ve fizyolojik yöntemlerin yanı sıra tanımlamanın daha etkili bir şekilde yapılabilmesi için 16S rDNA analizi yapıldı. 16S rDNA genleri oldukça iyi korunmuş universal sıralara sahiptir (Woese, 1987). Bu genler bakteriler arasındaki akrabalıkları belirlemede hedef bir bölgedir ve bakterilerin tür veya cins seviyesinde tanımlamalarının yapılmasında son zamanlarda oldukça önemli bir araç haline gelmiştir (Sacchi vd., 2002). Ayrıca çalışmada 16S rDNA dizi analizi çalışmalarını desteklenmesi amacıyla API20E, API50CH ve VITEK-2 tanımlama sistemleri de kullanıldı. Bu sistemler sayesinde izolatların sahip olduğu metabolik aktiviteler ve biyokimyasal özellikleri hakkında geniş bilgi edinilerek tür tanımlamalarda kullanıldı. Rutin çalışmalarla elde edilen veriler tür tayini için yetmediği durumlarda bu test sistemlerinden elde edilen veriler kullanıldı.

21 bakteriyel izolatın yapılan çalışmalar sonucunda karar verilen tür bilgileri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 18).

Tablo 18. Bakteriyel izolatlar için kit ve 16S rDNA tanımlaması sonucunda elde edilen sonuçlar

Türler	API	VITEK-2	16S rDNA
E-1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	<i>Bacillus cereus</i>
E-2	<i>Raoultella planticola</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
E-3	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	Tanımlanamadı	<i>Bacillus safensis</i>
E-4	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	<i>Bacillus cereus</i>
E-5	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	<i>Bacillus cereus</i>
E-6	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	<i>Bacillus cereus</i>
ÖL-1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	<i>Bacillus mycoides</i>
ÖL-2	Tanımlanamadı	Tanımlanamadı	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
ÖL-3	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus aryabhatai</i>
ÖL-4	Tanımlanamadı	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
ÖL-5	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus smithii</i>	<i>Bacillus simplex</i>
L-1	<i>Raoultella terrigena</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	<i>Raoultella terrigena</i>
L-2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	<i>Bacillus cereus</i>
L-3	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
L-4	Tanımlanamadı	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycoides</i>	<i>Bacillus anthracis</i>

Tablo 18'in devamı

L-5	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycooides</i>	<i>Bacillus cereus</i>
L-6	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycooides</i>	<i>Bacillus cereus</i>
L-7	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
L-8	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Bacillus circulans/ Paenibacillus glucanolyticus</i>	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>
L-9	Tanımlanamadı	Tanımlanamadı	<i>Bacillus flexus</i>
L-10	<i>Bacillus subtilis</i>	Tanımlanamadı	<i>Bacillus simplex</i>

E-1, E-4, E-5, E-6, ÖL-4, L-2, L-5, L-6 numaralı izolatların 16S rDNA dizi analizi ve biyokimyasal testlere göre *B. thuringiensis*, *B. cereus* ve *B. toyonensis* ile %99 benzerlik gösterdiği belirlendi. Yapılan SDS jel elektroforezi ve kristal boyama sonucunda kristal protein ihtiva etmedikleri belirlendiğinden ve yapılan biyokimyasal çalışmaların sonucunda VP (Voges-Proskauer) testinin pozitif olması nedeniyle *Bacillus cereus* olduğuna karar verildi. *B. cereus* toprak kökenlidir ve bu yüzden tarım ürünlerinde dolayısıyla tarım zararlılarında bulunabilir. İnsektisidal aktivite testlerinde karaağaç yaprak böceği üzerinde en yüksek etkiyi %87 ile bu gruptan olan E-5 ve E-6 numaralı izolatların gösterdiği görüldü. ÖL-4 numaralı izolat ise E-1 numaralı izolat ile birlikte %80 ölüm oranı gösterdi. Petek güvesi üzerinde gerçekleştirilen aktivite testlerinde ÖL-4 numaralı izolat %60 ile en yüksek öldürücü etkiye sahipken E-4 ve E-5 numaralı izolat %53, E-6, ÖL-5 ve L-6 numaralı izolatlar ise %43 ölüm oranı gösterdi. Un kurdu üzerinde gerçekleştirilen aktivite testlerinde ise ÖL-4 numaralı izolat  $1,8 \times 10^9$  bakteri konsantrasyonunda %33 ile en yüksek ölüm oranına sahipken  $1,8 \times 10^8$  bakteri konsantrasyonunda %20,  $1,8 \times 10^7$  bakteri konsantrasyonunda ise %6 ölüm oranı meydana getirdiği gözlenmiştir. E-5 numaralı izolat  $1,8 \times 10^9$  bakteri konsantrasyonunda %6,  $1,8 \times 10^8$  bakteri konsantrasyonunda %3 ölüm oranı gözlenirken E-6 ve L-2 numaralı izolatlarda  $1,8 \times 10^9$  ve  $1,8 \times 10^8$  bakteri konsantrasyonlarında %10 ölüm oranı gözlenmiştir. Yapılan

tüm aktivite testleri dikkate alındığında ise en yüksek ölüm oranlarının bu gruptan olduğu görülmüştür. *B. cereus* değişen çevre koşullarına uyum sağlama yeteneğine sahiptir. *B. cereus* toprakta yaygın bir şekilde bulunur (Vilas-Boas, vd., 2002). Toprakta yaşayan böceklerin bağırsak floralarında gözlenmiştir (Masi, 1978). Bu tür sıklıkla aralarında *Prodenia eridania*, *Plodia interpunctella*, *Periplaneta americana* gibi türlerin bulunduğu birçok hasta böceklerden izole edilmiştir (Steinhaus, 1947).

ÖL-1 numaralı izolat 16S rDNA dizi analizi sonucunda *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus* ve *B. mycooides* ile %99 benzerlik göstermiştir. Rizoidli koloni yapısından, VP (Voges-Proskauer) pozitif ve hareketsiz olmasından ötürü *Bacillus mycooides* olduğuna karar verildi. *B. mycooides* toprakta yaygın bir şekilde bulunur (URL-16). Bu türün bir metabolit üreterek mısır kök kurdunu ve afitleri ya öldürdüğü ya da büyümesini durdurduğu belirlenmiştir (URL-18). İnsektisidal aktivite testlerinde bu izolat, *Pyrrhalta luteola* üzerinde %50, *G. mellonella* üzerinde %10 oranında aktivite gösterirken *T. molitor*'e karşı insektisidal etki gözstermemiştir.

L-9 ve ÖL-2 numaralı izolatlardan API ve VITEK-2 testleri ile sonuç alınamadı. Yapılan 16S rDNA analizine göre L-9 numaralı izolatın *Bacillus flexus*, *B. aryabhatai* ve *B. pumilus* olabileceği belirlendi. Biyokimyasal testler göz önüne alındığında ise jelatinaz testi, nitrat testi, oksidaz testi ve nişastayı hidroliz edebilme yeteneğinin pozitif olmasın dolayı bu izolatın *B. flexus* olduğuna karar verildi. *B. flexus* birçok kez çeşitli göllerden ve deniz yosunu (*Ulva lactula*)'ndan izole edilmiştir (Trivedi, vd., 2011; Wang ve Zhao, 2013). ÖL-2 numaralı izolatın ise 16S rDNA dizi analizine göre *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* ve *B. velezensis* olabileceği belirtildi. Bu sonuçlara göre biyokimyasal testlerin sonuçları incelediğinde, nişasta hidroliz testinin pozitif ve arginin hidroliz testinin negatif olmasından ötürü bu izolat *B. amyloliquefaciens* olarak tanımlandı. *B. amyloliquefaciens* patojen olmayan bir toprak bakterisidir ve bazı antifungal özellikleri gösterir (Calderia, 2007). Yapılan literatür sonuçlarına göre, şimdye kadar fındık ve tahıl ambarlarından ve *Simulium tuberosum*'dan izole edildiği belirlenmiştir (Demeli, 2014; Reeves ve Nayduch, 2002). ÖL-2'nin insektisidal aktivite testinde *P. luteola* üzerinde %40, *G. mellonella* üzerinde %6 oranında aktiviteye sahipken *T. molitor* üzerinde insektisidal etkisi gözlemlenememiştir. L-9 numaralı izolatın ise *P. luteola* üzerinde %67, *G. mellonella* üzerinde %10 oranında ölüm meydana getirdiği görüldü. *T. molitor* üzerinde ise aktivitesi tespit edilemedi.

ÖL-5 ve L-10 numaralı izolatların 16S rDNA analizi sonucuna göre *Bacillus simplex*, *Brevibacterium frigoritolerans* olabileceğine karar verildi. VITEK-2 test sisteminin biyokimyasal sonuçları dikkate alındığında ise bu izolatların katalaz pozitif, amygdalin, arabinoz ve üre testleri negatif olduğundan *B. simplex* oldukları belirlendi. *B. simplex*, daha önce yapılan çalışmalarda *Thaumetopoea pityocampa*'dan izole edilmiştir (İnce, vd., 2008). ÖL-5 numaralı izolat *P. luteola* üzerinde %63, *G. mellonella* üzerinde %43 aktivite göstermiştir. *T. molitor* üzerinde etkisi görülmemiştir. L-10 numaralı izolatta ise *P. luteola* üzerinde %66, *G. mellonella* üzerinde %33 aktivite gösterirken *T. molitor* üzerinde herhangi bir dozda ölüm gözlenmemiştir.

L-4 numaralı izolat 16S rDNA dizi analizi ve VITEK-2 sonucuna göre *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis* olabileceği belirlendi. Yapılan biyokimyasal testlerin sonucu dikkate alındığında H<sub>2</sub>S üretmediği, katalaz pozitif olduğu ve Maltoz ve glikozu parçaladığı için *B. anthracis* olduğuna karar verildi. *B. anthracis* kapsüllü ve şarbon hastalığına neden olan bir bakteri türüdür. Toprakta yaygın olarak bulunur (URL-17). Şarbon hastalığının etkeni olduğu belirlenmeden önce toprakla ilişkilendirilmiştir (Rayer, 1850; Davaine, 1863). İnsektisidal aktivite testlerinde L-4 numaralı izolatta *P. luteola*'ya karşı %77, *G. mellonella*'ya karşı %10 ve *T. molitor*'e karşı ise  $1,8 \times 10^9$  bakteri konsantrasyonunda %6 oranında etki göstermiştir.

L-7 numaralı izolatın hem 16S rDNA dizi analizi hem API sistemi hem de VITEK-2 test sisteminin sonucuna göre *Bacillus pumilus* olduğu belirlendi. Yapılan biyokimyasal testlerde inositol ve Methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside testinin negatif olması da bu izolatın *B. pumilus* olduğunu desteklemiştir. Bu tür daha önce *Diatraea saccharalis* gibi birçok böcek türünden izole edilmiştir (Dantur, vd., 2015). Bu izolatın insektisidal aktivitesi ise *P. luteola* üzerinde %77, *G. mellonella* üzerinde %13 olarak belirlenmiş olup *T. molitor* üzerinde herhangi bir etkisi belirlenmemiştir.

E-3 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizine göre *Bacillus stratosfericus*, *B. pumilus*, *B. safensis* ve *B. aerophilus* olabileceği, API sonucuna göre *Geobacillus thermoglucosidasius* olabileceği belirlendi. VITEK-2 panel sistemi bu izolatı tanımlayamadı. İzolatın biyokimyasal özelliklerinden olan inositol, maltozu parçalayabilmesi ve 50°C'de büyüebilmesinden dolayı *B. safensis* olduğuna karar verildi. İnsektisidal aktivitesi *P. luteola* üzerinde %63 olarak tespit edildi. *G. mellonella* üzerinde %20 ölüm oranı göstermiştir. *T. molitor* üzerinde ise herhangi etki belirlenmemiştir. Bu tür ilk defa uzaya gönderilen uzay aracından izole edilmiştir (Satomi vd., 2006). Daha

sonraları Tomova vd. (2013) tarafından Bulgaristan'da bir mağaradan izole edilmiştir. Yine daha önce yapılan çalışmalarda *Sesamia nonagrioides* larvalarından izole edilmiştir (Eski, 2015).

Ön bulgulara dikkate alındığında ÖL-3 numaralı izolatın 16S rDNA analizine göre *Bacillus aryabhatai* veya *B. megaterium* olabileceği, VITEK-2 ve API test sistemlerine göre ise *B. megaterium* olabileceği belirlendi. Ancak izolatın biyokimyasal özellikleri dikkate alındığında Jelatinaz, VP (Voges-Proskauer) ve nişasta hidroliz testi pozitif olduğundan *B. aryabhatai* olduğuna karar verildi. Bu tür daha önceki çalışmalarda *Oryctes rhinoceros*'dan izole edildiği görülmüştür (Sari vd., 2016). İnsektisidal aktivite testi sonucunda ise bu izolat *P. luteola* üzerinde %63, *G. mellonella* üzerinde ise %10 ölüm oranı gösterdi. *T. molitor* üzerinde aktivitesi görülmedi.

E-2 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi ve VITEK-2 sistemi sonucu %99 *Klebsiella oxytoca* ve *Raoultella terrigena* olabileceğini, API *Raoultella planticola* olabileceğini gösterdi. Bu izolatın hareket edebilme yeteneğinin bulunmaması ve katalaz, VP (Voges-Proskauer), sitrat test sonuçlarının pozitif olması sonucu *Klebsiella oxytoca* olduğuna karar verildi. Bu türün daha önce *Diatraea saccharalis*'den izole edilmiş olduğu görüldü (Dantur, vd., 2015). Karaağaç yaprak böceği larvası üzerinde bu izolatın insektisidal etkisi %50, petek güvesi larvası üzerinde %13 olarak tespit edildi. Un kurdu larvaları üzerinde bir etki gözlenmedi.

L-3 numaralı izolatın API ve VITEK-2 sonucuna göre %99 *Enterobacter cloacae* ve 16S rDNA dizi analizine göre ise %99 *E. cloacae* veya *E. ludwigii* olduğu belirlendi. VITEK-2 test sisteminin diğer biyokimyasal test sonuçlarıyla karşılaştırma yapıldığında ise katalaz testinin pozitif, oksidaz testinin negatif olması nedeniyle bu izolatın *E. cloacae* olduğuna karar verildi. Bu tür daha önce ipek böceği gibi birçok türün bağırsağında izole edilmiştir (Watanabe ve Sato, 1998). Karaağaç yaprak böceği larvası üzerinde insektisidal etkisi ise %20 olarak gözlemlendi. Petek güvesi ve un kurdu larvaları üzerinde ise herhangi insektisidal etkisi gözlenmedi.

L-8 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizine göre *Paenibacillus xylanilyticus*, *P. illinoisensis*, *P. pabuli* olabileceği, API sonucuna göre *P. polymyxa* ve VITEK-2 test sistemi sonucuna göre ise *P. glucanolyticus* olabileceği belirlendi. Biyokimyasal testler dikkate alındığında indol testinin negatif, inulin ve gliserol testlerinin ise pozitif sonuç vermesi bu izolatın *P. xylanilyticus* olduğunu gösterdi. *Paenibacillus* türleri toprakta, suda ve hasta böcek larvalarında bulunur (Daane et al., 2002). *Cryllotalpa gryllotalpa*'dan *P.*

*xylanilyticus* izole edilmiştir (Sezen, vd., 2013). İnsektisidal etkisi ise *P. luteola* üzerinde %66, *G. mellonella* üzerinde %13 olduğu gözlemlendi. *T. molitor*'e karşı bir aktivitesi gözlenmemiştir.

L-1 numaralı izolatın 16S rDNA dizi analizi sonucuna göre *Raoultella terrigena*, *R. variicola*, *R. ornithinolytica* ile, API sonucuna göre *R. terrigena* ile ve VITEK-2 sonucuna göre ise *R. ornithinolytica* ile benzerlik gösterdiği belirlendi. API ve VITEK-2 panel sistemleri bu izolatın *R. terrigena* olduğunu indol ve ornitin testinin negatif olması ve Voges-Proskauer testinin pozitif olması ile destekledi. Bu tür, *Dendroctonus rhizophagus* ve *D. valens*'den daha önce yapılmış çalışmalarda izole edildiği görülmüştür (Morales-Jiménez, vd., 2013). Bu izolatın insektisidal etkisi *P. luteola* üzerinde %53, *G. mellonella* üzerinde %3 olarak gözlemlendi. *T. molitor* larvaları üzerinde yapılan aktivite testlerinde ise ölüm gözlemlenmedi.

Yapılan insektisidal aktivite çalışmalarında özellikle izole edilen gram negatif, sporsuz bakterilerin düşük aktivite gösterdikleri tespit edildi.

Etkinlik denemelerinin sonuçlarına göre, Coleoptera takımından karaağaç yaprak böceği olan *P. luteola* zararlısı üzerinde E-5 ve E-6 numaralı izolatların (*Bacillus cereus*) yüksek öldürücü etkiye sahip (% 87) olduğu, Lepidoptera takımından *G. mellonella* ve Coleoptera takımından *T. molitor* üzerinde ise ÖL-4 numaralı izolatın diğer izolatlar arasında en yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu tespit edildi. Böylece bu izolatların *C. tenebrionis* ve diğer tarım zararlılarına karşı kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda, dünyada ve ülkemizde başta kiraz, kayısı, vişne, şeftali ağaçları olmak üzere birçok meyve ve orman ağacında ciddi zararlara yol açan *Capnodis tenebrionis*'den bakteri izolasyonu gerçekleştirildi ve izole edilen bakterilerin insektisidal etkileri belirlendi. Çalışmada ulaşılan sonuçlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- 1) *C. tenebrionis*'den 21 kültüredilebilir bakteriyel izolat elde edildi.
- 2) Bu izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerine göre karakterizasyonları yapıldı.
- 3) 21 izolattan 13'ünün farklı tür olduğu belirlendi.
- 4) *C. tenebrionis*'den ilk defa bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş oldu.
- 5) *C. tenebrionis*'izole edilen bakteriler; *Bacillus cereus* (E-1, E-4, E-5, E-6, ÖL-4, L-2, L-5, L-6) *Bacillus mycoides* (ÖL-1), *Bacillus pumilus* (L-7), *Paenibacillus xylanilyticus* (L-8), *Bacillus flexus* (L-9), *Bacillus simplex* (L-10, ÖL-5), *Raoultella terrigena* (L-1), *Enterobacter cloacae* (L-3), *Bacillus anthracis* (L-4) *Klebsiella oxytoca* (E-2), *Bacillus safensis* (E-3), *Bacillus amyloliquefaciens* (ÖL-2), *Bacillus aryabhatai* (ÖL-3) şeklinde belirlendi.
- 6) Bakteriyel izolatlardan ÖL-4, E-5 ve E-6 numaralı izolatların insektisidal aktivite testlerinde en yüksek öldürücü etkiye sahip oldukları belirlendi.



## 6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, *Capnodis tenebrionis*'ten 21 adet bakteri izolatu elde edildi. Ve bu izolatların karaağaç yaprak böceği, petek güvesi ve un kurdu larvaları üzerinde insektisidal etkileri araştırıldı. Çalışmada ulaşılan sonuçlar dikkate alındığında gelecek çalışmalara yönelik olarak aşağıdaki hususlar belirlenmiştir.

- 1) Elde edilen izolatların *Capnodis tenebrionis* ve coleopteran diğer meyve ağacı zararlıları üzerinde insektisidal aktiviteleri araştırılabilir.
- 2) İsektisidal aktivite testleri yapılırken tek bir izolatın değil, birden fazla izolatın etkisi aynı anda denenebilir.
- 3) Yüksek öldürücü etkiye sahip izolatların arazi uygulamaları yapılabilir.
- 4) Yüksek öldürücü etkiye sahip olan izolatların mikrobiyal mücadele preparatına dönüştürme çalışmaları başlatılabilir.

## KAYNAKLAR

- Abbott, W. S., 1925. A method of computing of effectiveness of on insecticide, Journal of Economic Entomology, 18, 265–267.
- Aoki, K. ve Chigasaki, Y., 1915. Ueber die Pathogenitat der Sog Sotto Bacillen (Ishawata) bei Seidenraupen, Mitt. Med. Fak Kais, Univ., Tokyo, 13, 419-440.
- Angus, T.A., 1954. A Bacterial Toxin Paralysing Silkworm Larvae, Nature, Londra, 173, 545-546.
- Angus, T.A., 1956. Association of Toxicity with Protein Crystalline Inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata, Canadian Journal of Microbiology, 2, 122-131.
- Anonim, 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları Cilt 2. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara, 104-107.
- Arif, B. ve Kurstak, E., 1991. Viruses of Invertebrates, Kurstak, E. (Ed.), Marcel Dekker.
- Demir, İ., 2004. *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs'ünün *Spodopteraa frugiperda* ve *Lymantria dispar* Hücre Kültürlerinde Replikasyonunun Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Beegle, C.C. ve Yamamoto, T., 1992. Invitation Paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research and Development, Canadian Entomologist, 124, 587- 616.
- Ben-Dov, E., Boussiba, S. ve Zaritsky, A., 1995. Mosquito Larvicidal Activity of *Escherichiacoli* with Combinations of Genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, Journal of Bacteriology, 2581-2587.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N. ve Margalith, Y., 1997. Extended Screening by PCR for Seven *cry*-Group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*, Applied and Environmental Microbiology, 63, 4883-4890.
- Benson, H. J., 1985. Microbiological Applications, a Laboratory Manuel in General Microbiology, Brock, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.
- Berliner, E., 1911. Uber die Schlauffsucht der Mehlmottenraupe, Z. Gesamte, Getreidewes, 3,63-70.
- Berliner, E., 1915. About the Sleep Sickness of the *Ephestia kuehniella Zell* and Its Vector *Bacillus thuringiensis*, Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie, 2, 29-56.

- Bernard, R. G., ve Jack J. P., 2003. Molecular Biotechnology - Principles and Applications of Recombinant DNA, Baskı: 3, Amer Society for Microbiology, New York.
- Boursaux-Eude, C. ve Gross, R., 2000. New insights into symbiotic associations between ants and bacteria, Research in Microbiology, 151, 513–519.
- Burges, H.D. ve Hussey, N.W., 1971. Microbial Control of Insects and Mites, Academic Press, London, New York.
- Burges, H.D. ve Hurst, J.A., 1977. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in Stroge Moths, Journal of Invertebrate Pathology, 30, 131-139.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Braxton, S. M., Onstad, D. W., Dockter, D. E., Giordano, R., Larsson, R. ve Humber, R. A., 2003. Description and Analysis of two Internet-Based Databases of Insect Pathogens: EWDIP and VIDIL, Journal of Invertebrate Pathology, 83, 185-195.
- Bronskill, J. K., 1961. A Cage of Simplify Rearing of the Greater Wax, *Galleria mellonella* (Pyralidae), Journal of Lepidopterists' Society, 102-104.
- Caldeira, A.T., Feio, S.S., Arteiro, J.M.S., Coelho, A.V., Roseiro, J.C., 2007. Environmental dynamics of *Bacillus amyloquefaciens* CCM1 1051 antifungal activity under different nitrogen patterns, Journal of Applied Microbiology, 104, 806-816.
- Cappuccino, J. G. ve Sherman, N., 1992. Microbiology, a Laboratory Manual, Third Edition, Rockland Community College, Suffern, New York.
- Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S. ve Koziel, M.G., 1991. Prediction of Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains by Polymerase Chain Reaction Product Profiles, Applied and Environmental Microbiology, 57, 3057-3061.
- Daane, L. L., Harjono, I., Barns, S. M., Launen, L. A., Palleroni, N. J. ve Ha'ggblom, M. M., 2002. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 131–139.
- Dantur, K. I., Enrique, R., Welin, B., ve Castagnaro, A. P., 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of diatraea saccharalis larvae and nevaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass, AMB Express 5, 15. doi: 10.1186/s13568-015-0101-z
- Davaine, C., 1863. Recherches sur les infuoirs du sangdans la maladie de la pustule maligne, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 60, 1296–1299.

- Deacon, J. W., 1983. *Microbial Control of Pests and Diseases*, New York., 31-41.
- Demeli, M., Demirbağ, Z. ve Sezen, K., 2014. "Isolation and Characterization of *Bacillus* from Some Warehouses in Trabzon", *Journal of Applied Biological Sciences* 8, 2, 69, 80.
- Denolf, P., Hendrickx, K., Vandamme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D. Ve Vanrie, J., 1997. Cloning and Characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* Midgut Aminopeptidase N Enzymes Related to *Bacillus thuringiensis* Toxin-Binding Proteins, *European Journal of Biochemistry*, 248, 748-761.
- Demir, İ., 2004. *Hyphantria cunea* nükleopolihedrovirüs'ünün *Spodopteraa frugiperda* ve *Lymantria dispar* Hücre Kültürlerinde Replikasyonunun Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Demirbağ, Z. ve Beldüz, A. O., 1997. Baculovirüs'ün Biyolojik Mücadeledeki Önemi, *Kükem Dergisi*, 20, 1, 49-58.
- Demirbağ, Z., Naçacıoğlu, R., Katı, H., Demir, İ., Sezen, K. ve Ertürk, Ö., 2008. Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele, Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon.
- Durmuşoğlu, E., Tiryaki, O. ve Canhilal, R., Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları, [http://ziraat.uludag.edu.tr/ureticiler/ENTOMOPATOJEN\\_NEMATODLAR.pdf](http://ziraat.uludag.edu.tr/ureticiler/ENTOMOPATOJEN_NEMATODLAR.pdf) 16.06.2013.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, 27, Samsun.
- Erbaş, Z., 2012. Trabzon Yöresinden Entomopatojen Nematodların İzolasyonu, Karakterizasyonu ve *Melolontha melolontha* Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Eski A., Özkan Çakıcı F., Güllü M., Muratoğlu H., Demirbağ Z., Demir İ., 2015. Identification and pathogenicity of bacteria in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae), *Turkish Journal of Biology*, 39, 31-48.
- Fao, Food and Agriculture Organization of the United Nation, <http://www.fao.org>, 2015.
- Faria, M. R. D. ve Wraight, S. P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types, *Biological Control*, 43, 237-256.
- Gokce, C., Sevim, A., Demirbag, Z. ve Demir, I., 2010. Isolation, characterization and pathogenicity of bacteria from *Rhynchites bacchus* (Coleoptera: Rhynchitidae), *Biocontrol Science and Technology*, 20, 9, 973-982.

- Granados, R. R. ve Federici, B. A., 1986. The Biology of Baculoviruses, 2, Practical Applications for Insect Control, Boca Raton, FL.
- Gröner, A., 1986. Specificity and Safety of Baculoviruses, In “The Biology of Baculoviruses, Practical Applications for Insect Control” (Granados, R. R. ve Federici, B. A., Eds.), 2, 177-202. Boca Raton, FL.
- Haiwen, Li., Freder, M., S., Bradleigh, V. ve Craig, J., 2005. Coates Isolation, characterization, and molecular identification of bacteria from the red imported fire ant (*Solenopsis invicta*) midgut, Journal of Invertebrate Pathology, 89, 203-209.
- Hajek, A. E., 1997. Ecology of Terrestrial Fungal Entomopathogens, In “Advanced in Microbial Ecology” (Jones, J. H., Ed.), 15, 193-249, Plenum Press, New York.
- Hannay, C.L. ve Fitz-James, P.C., 1955. The Protein Crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner, Canadian Journal of Microbiology, 1, 694.
- Hoffman, M. P. ve Frodsham, A. C., 1993. Naturel Enemies of Vegetable Insect Pests, Cooperative Extension, 63, Cornell University, Ithaca.
- Ishiwata, S., 1901. On a Kind of Severe Flacherie (sotto disease), Dainihon Sanshi Kaiho, 114, 1-5.
- ITC, International Trade Center, <http://www.intracen.org/> 10.08.2016
- İnce, İ. A., Katı, H., Yılmaz, H., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2008. Isolation and identification of bacteria from *Thaumetopoea pityocampa* Den. and Schiff. (Lep., Thaumetopoeidae) and determination of their biocontrol potential’, World Journal of Microbiology Biotechnology, 24, 3005-3015.
- Kaelin, P., Morel, P. ve Gadani, F., 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Stored Tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.), Applied Environmental Microbiology, 60, 19-25.
- Kaya, H. K. ve Stock, S. P., 1997. Techniques in Insect Nematology, In “Manuel of Techniques in Insect Pathology” (Lacey, L. A., Ed.), 281-324, Academic Press, London.
- Knowles, B. H., 1994. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal  $\delta$  endotoxin, In *Advances in Insect Physiology*, Evans, P.D. (ed.), Academic Press, London, 24, 275-308.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K. ve Vail, P., 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?, Biological Control, 21, 230-248.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.

- Lipa, J. J., 1975. An Outline of Insect Pathology, Warsaw, Poland.
- Liu, J., Pionar, G. O. ve Berry, R. E., 2000. Control of Insect Pests with Entomopathogenic Nematodes: The Impact of Molecular Biology and Phylogenetic Reconstruction, Annual Review of Entomology, 45, 287-306.
- Maddox, J. V., 1987. Protozoan Diseases, In “Epizootiology of Insect Diseases” (Fuxa, J. R. ve Tanada, Y., Eds.), 417-452, Wiley, New York.
- Marannino, P., de Lillo, E., 2007. The peach flatheaded rootborer, *Capnodis tenebrionis* (L.), and its enemies, Working Group Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, Proceedings X European Meeting, Locorotondo, Bari, IOBC/WPRS Bulletin, 197-200.
- Masi, R. J. 1978. Endogenous endophthalmitis associated with *Bacillus cereus* bacteremia in a cocaine addict. Annals of Ophthalmology, 10, 1367-1370.
- Mattes, O., 1927. Parasitare Krankheiten der Mehmotten Larven und Versuche uber ihre Verwendbarkeit als Biologisches Bekämpfungsmittel. Gesell. F. Beford., Ges. Naturw. Sitzber., Marburg, 62, 381-417.
- Morales-Jiménez, J., Vera-Ponce de León, A., García-Domínguez, A., 2013. Microbial Ecology, 66, 200, 10.1007/s00248-013-0206-3
- Morton, A., Garcí'a-del-Pino, F., 2008. Effectiveness of different species of entomopathogenic nematodes for biocontrol of the Mediterranean flatheaded rootborer, *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae) in potted peach tree. Journal of Invertebrate Pathology, 97, 128–133.
- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 8, Isparta
- Peter, G., 1984. Plant Pests and Their Control, Fenemore, London.
- Poinar, G. O., 1979. Nematodes for Biological Control of Insects, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Poinar, G. O., 1990. Taxonomy and Biology of Steinernematidae and Heterorhabtidae, In “Entomopathogenic Nematodes in Biological Control” (Gaugler, R. ve Kaya, H. K., Eds.), 23-61, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rayer, P., 1850. Inoculation du sang de rate, Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiale, 2, 141–144.
- Reeves, W. K. ve Nayduch, D., 2002. Pathogenic *Bacillus* from a Larva of the *Simulium tuberosum* Species Complex (Diptera: Simuliidae), Journal of Invertebrate Pathology, 79, 126.

- Sacchi, C. T., Whitney, A.M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R.S. ve Popovic, T., 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*, Emerging Infectious Diseases, 8, 1117–1123.
- Sari, S.L.A., Pangastuti, A., Susilowati, A., Purwoko, T.j., Mahajoeno, E., Hidayat, W., Mardhena, I., Panuntun, D.F., Kurniawati, D. ve Anitasari, R., 2016. Cellulolytic and hemicellulolytic bacteria from the gut of *Oryctes rhinoceros* larvae, Biodiversitas 17, 78-83.
- Satomi, M., La Duc, M. T. ve Venkateswaran, K., 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 1735–1740.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rien, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. ve Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 775–806.
- Sevim, A., Demirbağ, Z. ve Demir, İ., 2010. A new study on the bacteria of *Agrotis segetum* Schiff. (Lepidoptera: Noctuidae) and their insecticidal activities, Turkish Journal of Agriculture & Forestry, 34, 333-342.
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2004. Study of the bacterial flora as a biological control agent of *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae), Biologia, Bratislava, 59, 3, 327-331.
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2007. Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from common cockchafer, *Melolontha melolontha* L. (Col., Scarabaeidae), New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 35, 79-85.
- Sezen K., İşçi Ş., Muratoğlu H., İnan K. ve Demirbağ Z., 2013. Identification And Pathogenicity Of Bacteria From *Gryllotalpa Gryllotalpa* L. (Orthoptera: Gryllotalpidae) , Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi, 4, 2, 89-108.
- Sneath, A. P., 1968. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, Sneath, A. P., Mair, N.S., Sharge, M. S. ve Holt, J. G., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Steinhaus, E. A. 1947. "Insect Microbiology," 768, Comstock, Ithaca, New York.
- Steinhaus, E. A., 1949. Principles of Insect Pathology, McGraw-Hill, New York.
- Steinhaus, E. A., 1956. Microbial Control: The Emergence of an Idea, Journal of Agricultural Science, 26, 107-160.
- Strasser, H., Vey, A. ve Tariq, M. B., 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? Biocontrol Science and Technology, 10, 717-735.

- Tanada, Y. ve Kaya, H. K., 1993. *Insect Pathology*, Academic Press, New York.
- Tomova, I., Lazarkevich, I., Tomova, A., Kambourova, M. ve Tonkova, E. V., 2013. Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria, *International Journal of Speleology*, 42, 1, 65-67.
- Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K. ve Jha., B., 2011. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. *Carbohydrate Polymers*, 83, 891-897.
- TÜİK, Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı., <http://www.tuik.gov.tr>. 10.08.2016.
- URL-1, [http://www.tegim.com/egitim/dosyalar/szbolumler/ziraat/715Turkiyedealanlarinin\\_azalmasi.html](http://www.tegim.com/egitim/dosyalar/szbolumler/ziraat/715Turkiyedealanlarinin_azalmasi.html). 09.08.2016.
- URL-2, [http://www.tarimziraat.com/hastalik\\_ve\\_zararlilar/meyve\\_zararlilari/meyve\\_agaci\\_dip\\_kurtlari/](http://www.tarimziraat.com/hastalik_ve_zararlilar/meyve_zararlilari/meyve_agaci_dip_kurtlari/). 09.08. 2016.
- URL-3, <http://www.alamy.com/stock-photo/buprestid.html> 12.08. 2016
- URL-4, [http://www.floresalud.es/galeria\\_bichos/capnodistenebrionis\\_4.html](http://www.floresalud.es/galeria_bichos/capnodistenebrionis_4.html) 12.08.2016
- URL-5, [https://www.koppert.com/fileadmin/\\_migrated/Brochure\\_Biological\\_control\\_of\\_Capnodis\\_LR.pdf](https://www.koppert.com/fileadmin/_migrated/Brochure_Biological_control_of_Capnodis_LR.pdf) 12.08.2016.
- URL-6, <https://sites.google.com/site/coleoptera0001/buprestidae/capnodis-tenebrionis> 12.08.2016.
- URL-7, <http://www.biolib.cz/en/image/id81939/> 12.08.2016.
- URL-8, <http://www.agrozastita.rs/index.php/2-zilogriz-capnodis-tenebrionis> 12.08.2016
- URL-9, <http://kirazturk.com/kiraz-dip-kurtlari2/> 12.08.2016
- URL-10, <http://www.e-nema.de/professional-en/fruit-growing/stone-and-perenocarp-fruit/12.08.2016>.
- URL-11, <http://f.zira3a.net/t9396> 12.08.2016.
- URL-12, <http://www.pasarlascanutas.com/capnodis/capnodis0002.htm> 12.08.2016
- URL-13, <http://www.komunich.de/vincent-sanchis/france/bacillus-thuringiensis.htm> 12.08.2016.
- URL-14, [https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus\\_thuringiensis](https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_thuringiensis) 15.08.2016.
- URL-15, <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/135675/fig2/> 15.08.2016.



URL-16, [https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus\\_mycooides](https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_mycooides) 15.08.2016.

URL-17, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433 CFF AAF6AA 849816B2EF907B2819D2941289> 15.08.2016.

URL-18, <https://www.google.ch/patents/US6210665>. 22.09.2016.

Ünal, G., 1998. Zirai Mücadele İlaçları Toksikolojisi ve Çevre, Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü Seminer Notları, Ankara.

Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. ve Van Mellaert, H., 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins: Importance of Specific Receptors on the Brush Border Membrane of the Mid-Gut of Target Insects, European Journal of Biochemistry, 186, 239-247.

Vilas-Boas, G., Sanchis, V., Lereclus, D., Lemos, M.V.F. ve Bourguet, D., 2002. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*, Applied and Environmental Microbiology 68, 1414–1424.

Vural, N., 1996. “Toksikoloji”, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi yayınları No 73, Ankara Üniversitesi Basımevi.

Wang, X. ve Zhao, H., 2013. Isolation and Characterization of a *Bacillus flexus* Strain Used in Alkaline Wastewater Treatment, Advanced Materials Research, 750-752, 1381-1384..

Watanabe, K. ve Sato, M., 1998. Plasmid-mediated gene transfer between insect-resident bacteria, *Enterobacter cloacae* and plant-epiphytic bacteria, *Erwinia herbicola* in guts of silkworm larvae, Current Microbiology, 37, 352-355.

Weiser, J., 1969. An Atlas of Insect Diseases, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.

Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution, Microbiological reviews, 51, 2, 221-271.

## 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 ddH<sub>2</sub>O'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

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 (NaHCO<sub>3</sub>) 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

### E-1:

AGAGAAAATGCATCCACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGC  
 GGCCGCGAATTCAGTAGTGATTATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAA  
 CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGC  
 TCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATA  
 AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGA  
 ACTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGACTGTCACCTTATGGATGGACCCGC  
 GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGC  
 CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT  
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGTCTGACGGAGC  
 AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTGGGGA  
 AGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAG  
 CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA  
 TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTG  
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGC  
 AGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGG  
 AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTA  
 ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  
 AAA  
 CGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGC  
 ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATT  
 GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG  
 AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCT  
 CCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG  
 AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATC  
 ATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG  
 GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
 ATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAA  
 CCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGC  
 TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC  
 ACCGCCCGTCACACACGGTACCATAATCGAATTC  
 CGCGGCCCGCCATGGCGGC  
 CGGAGCATGCGATTCTTCGC

### E-2:

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAG  
 AGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTG  
 CCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGC  
 CAAGACCAAAGAGGGGGACCTTNGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATG  
 GGATTAGCTTGTAGGTGAGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGG  
 TCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA  
 ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACG

GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT  
 GCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGA  
 AGGGAGTGAGGTTAATAACCTTATTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC  
 GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATTC  
 GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAAT  
 CCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTA  
 GAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA  
 ATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAA  
 AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGAT  
 GTCGACTTGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAA  
 GTCGACCGCCAGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACG  
 GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA  
 ACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAANTTAGCAGAGATGCTTTNGTGCCTTC  
 GGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATG  
 TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCC  
 GTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATG  
 ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGC  
 ATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGT  
 CGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGT  
 AATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG  
 CCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGG  
 GAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTTCATGACTGGGGTGAAG

**E-3:**

CGGGAAACCGGAGCTAATAACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGAT  
 GAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGT  
 TGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT  
 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
 GTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT  
 GATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAG  
 AGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG  
 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG  
 CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCA  
 ACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG  
 GAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG  
 CGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGA  
 GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG  
 TGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC  
 TGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCA  
 CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG  
 TCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAAATAGGGCTTTCCTTCGGGGACAGAGT  
 GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTTGAAATGTTGGGTTAGTCC

CGAACGAGCGCACCCCTTGTCTTAGTTGCAGCATTTAGTTTGGCATCTAAGGTGC  
 TGCCGGTGGAAAACCCGAGGAAGGTGGGGATAATTCAAATCATCATGCCCTT  
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGGCTGCGAGAC  
 CGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCA  
 ACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGG  
 TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTACCATAAT  
 CGAATTCCCGCGGCCCGCCATGGCGGGCCGGAGCATGCGACTGTATCA

**E-4:**

GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGC  
 CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT  
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC  
 AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGA  
 AGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCGAAAG  
 CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA  
 TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTG  
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGC  
 AGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGG  
 AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGC  
 GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA  
 CGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTCTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGC  
 ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATT  
 GACGGGGGCCCCGCACAAACGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG  
 AAGAACCTTACCAGGTTTTGACTCCTCTGAAACCCTAGAGATAGGCTTCTCCTT  
 CGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGAT  
 GTTGGGTTAATTCCCCAACGAGCGCACCCCTTGATCTAGTTGCATCATTAAATTGG  
 GCCTCTAAGTACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA  
 ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACA  
 AAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTC  
 GGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG  
 ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC  
 ACACGGTACCATAATCGAATTCCCGCGGCCCGCCATGGCGGGCCGGAGCATGCGA  
 CTCCGTACCC

**E-5:**

ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  
 TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG  
 CTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAA  
 GCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC  
 AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG

CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG  
 AGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCC  
 ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC  
 GACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG  
 GATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAG  
 GGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT  
 ACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT  
 TGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA  
 TCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGT  
 GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC  
 GACCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC  
 TGCCGGTGACAACCGGAAAGAGGTGGGGATAACTCCAATCATCATGCCCTTA  
 AGACCTGGGGTACAACGTGGTAAAATTGGAGGGTAAAAAAGTTGCCAAACCC  
 GACGGTGGGACTATTTCTAAAACCTGTTTCTTATTGAGGGGGCGACTGCC  
 ATGGAGTGGAAACCCTAAAACGCGAAAAGTCGCCGCTAAATTTTCGCGGTTTAC  
 GCGCGCCCAGGTGCGCTAACCGCCTCTCGGCCGCCGGAGTGAGCAACCAACCT  
 TGACCAGTTTTAACGAGACCGTTGGTAAGCGCGCCCGGATCACTCTCCTCCCC  
 AGGACGCCAGACCCGCGCCCTACGAGATCGGACTTTCAACTCGCCTACATGAA  
 GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG  
 GCCTTGACACACCGCCCGTCACACACGGTACCATAATCGAATTCCCGCGGCC  
 GCCATGGCGGCCGGAGCATGCGACCCGTACC

**E-6:**

GTGTAAGATTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATT  
 CTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGC  
 AAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGG  
 TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG  
 GGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGC  
 TTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA  
 CGGCTCACCAAGGCAACGATGGTAGCGGCCTGAGAGGTGATCGGCCACACTG  
 GACTGAGACACGGCCCAGATTCTACGGGAAGCAGCAGTAGGGATCTTCCGG  
 AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGG  
 GTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA  
 CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
 GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC  
 AGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA  
 TTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTA  
 GCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTC  
 TGGTCTGTAACCTAACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTC  
 CGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGC

CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC  
 ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT  
 GAAAGCCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCA  
 TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG  
 CAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCG  
 GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA  
 CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGT

**L-1:**

CGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACA  
 CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC  
 AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGT  
 ACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCGACAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTA  
 CTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA  
 GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTG  
 TCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTAACCTGGGAACTGCATCCGAAACTG  
 GCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATG  
 CGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGAC  
 TGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA  
 GTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTC  
 CGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA  
 ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
 CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGA  
 GATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA  
 GCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCT  
 TTGTTGCCAGCGATTCGGTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTG  
 GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA  
 CACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGG  
 ACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGA  
 AGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCG  
 GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTACCATAATCGAATTCCCGCGGC  
 CGCCATGGCGGCCGGAGCATGCGAGAGTTTCC

**L-2:**

GCGTTGACGAAATCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATT  
 ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATA  
 TGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGAC  
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAA  
 ACCGGGGCTAATACCGGATAATTTTTGAACTGCATGGTTCGAAATTGAAAGG  
 CGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGAG



GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC  
 CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA  
 ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG  
 GCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATA  
 AGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG  
 CAGACGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA  
 GCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTG  
 GAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTC  
 CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG  
 CGACTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA  
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGA  
 GGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA  
 GTACGGCCGCA

**L-3:**

GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC  
 AGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA  
 TTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAG  
 CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAAGCGGCCCCCT  
 GGACAAAGACTGACGCTCAGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT  
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGAGTTGTGCCCTTGAGCGTG  
 CTTCCGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA  
 AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA  
 TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTCCA  
 GAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTG  
 CAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAT  
 CCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAA  
 CTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCT  
 ACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAG  
 CGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA  
 TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTT  
 CCGGGCCTT

**L-4:**

CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
 CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG  
 CTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAA  
 GCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC  
 AGCCGCGGTAATACGCAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG  
 CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG  
 AGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCC  
 ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGC

GACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGG  
 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGG  
 GTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  
 CGGCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG  
 AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC  
 CTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGG  
 TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA  
 GCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG  
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA  
 TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCG  
 CGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAA  
 CTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT  
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTACCATAATC  
 GAATCCCGCGGCCCGCCATGGCGGCCGGAGCATGCGACGCCGTTACTC

**L-5:**

TCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCC  
 GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT  
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAACGGACGAAAGTCTGACGGAGC  
 AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGA  
 AGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG  
 CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA  
 TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTG  
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGC  
 AGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGG  
 AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGTGGCGC  
 GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  
 CGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGC  
 ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATT  
 GACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG  
 AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCT  
 CCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTG  
 AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTTGATCTTAGTTGCCATCA  
 TTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG  
 GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA  
 TGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAC  
 CGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCT  
 AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA  
 CCGCCCGTCACACACGGTACCATAATCGAATCCCGCGGCCCGCCATGGCGGCC  
 GGAGCATGCGACTCCGTATCCCAATGTTATCCGGGTATAGGCCCGGGTTTCCC  
 GGAATTATCCAAGTCTTATGGGCGAGGTTCCCCACGGGGTACTACCGGTGCG  
 CCGCGTAAATTTCTTGAGAGAAAGCTCCCACATCCC

**L-6:**

GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG  
CGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAA  
GTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAA  
TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGA  
GGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAAC  
ACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGC  
GTGGGGAGCAAACAGGATTGGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAGCGATGA  
GTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGC  
ACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAAC  
CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGG  
GAGCAGAGTGACAGGGGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGGAGATGT  
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTGATCTTAGTTTGCCATCATTAA  
AGTTGGGGCATTCTAAAGGTGACTGGCCGGTGACCAAACCGGAAGGAAGGTG  
GGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC  
AATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAA  
ACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATC  
GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGAC  
ACACCGCCCGTCACACACGGTACCATAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCG  
GCCCGGAGCATGCCACCCCGTTTACCCG

**L-7:**

GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC  
GGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG  
AAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT  
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG  
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG  
ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGA  
GTA ACTGCTTGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC  
GTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAA  
CCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG  
AATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC  
GAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAG  
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGT  
GTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT

GGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCAC  
 AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT  
 CTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGGCTTTCCTTCGGGGACAGAGT  
 GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTTGAGATGTTGGGTAAGTCC  
 CGCACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCCTCTAAG  
 GGGATGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAATCTTCATGC  
 CCCTTAGACCTGGGCTACAACCTGGTTCAATGGAAGAACAAGGGGTGCGAAACC  
 CCAAGGTTTAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA  
 CTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT  
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTACCATAATC  
 GAATCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGAGCATGCGACTCGCTAACCT

**L-8:**

TTGCTTTCTTCGCTGAAGGAAGCTGGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTGAG  
 GATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGA  
 CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG  
 GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAA  
 GCCTGACGGAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTC  
 TGTTGCCAGGGAAGAACGTCCTTGAGAGTAACTGCTCAAGGAGTGACGGTACC  
 TGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
 GGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCAATTT  
 AAGTCTGGTGTTTAATCCCGGGGCTCAACCCCGGATCGCACTGGAACTGGAT  
 GACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG  
 TAGATATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTAACTGA  
 CGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  
 CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGTTTTCGATACCCTTGGTGCC  
 GAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAAC  
 TCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCG  
 AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGGTACAGAG  
 ATGTACCTTTCCTTCGGGACAAAGGAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC  
 TCGTATCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCACCGAGCGCAACCCTTGATCTTA  
 GTTGCCAGCACTTCCGGTGGGGCATTCTAAGGTGACTGCCGGGTGACAAACCG  
 GAAGGAAGGTGGGAATGAACTCAAATCTCCTTGGCCCTTTAGGACCTGGGCTA  
 CACACGTACTACAATGGCCGGTACAACGGGCTGTGAAACCGCGAGGTGGAAC  
 GAATCCTAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAT  
 GAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC  
 CGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTACCATAATCGAATTCCCGCG  
 GCCGCCATGGCGGCCGGAGCATGCGAGCCGTCCCA

**L-9:**

GGGTAACGAATCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAT  
TCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG  
CAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGGAGAGCG  
GTTGATACACGGTGGCCACACTCCCTTTAAAGGTGGGATACTCCGGGGAACCG  
GGAGTTAAACCCGGGTACCATTTTTCTTTGCAAAGGAAAAATTGAAAGATGG  
TTCGGGTTTCAATTCAGAATGGGCCCCCGGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGTAA  
CGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA  
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAAGCAGCAGTAGGGATCTTC  
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTC  
GGGTCGTAAAAGTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGT  
ACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC  
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG  
CAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC  
ATTGGAACTGGGGAAGTGTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGT  
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTT  
TTGGTCTGTAAGTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTT  
CCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG  
TCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG  
CATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT  
CTGATAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGG  
TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA  
GCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCCTAAGGTGACTG  
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA  
TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCG  
CGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAA  
CTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT  
GAATACGTTCCCGG

**L-10:**

ACGTACAACCTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTATT  
CTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGC  
AAGTCGAGCGAATCGATGGGAGCTTGCTCCCTGAGATTAGCGGCGGACGGGTG  
AGTAACACGTGGGCAACCTGCCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGA  
GCTAATACCGGATACGTTCTTTTCTCGCATGAGAGAAGATGGAAAGACGGTTT  
ACGCTGTCACTTATAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAT  
GGCTCACCAAGGGGACGATGCGTAGCGGACCTGAGAAGGTGATCGGCCACAC  
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGATCTTCC  
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGAAGAAGGCCTTC  
GGGTCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCAGAGTAACTGCTGGT

ACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG  
 CAGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC  
 ATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCAAGTGT  
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT  
 CTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
 GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTT  
 CCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG  
 CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG  
 CATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT  
 CTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGG  
 TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA  
 GCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG  
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT

### ÖL-1:

GTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC  
 GAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT  
 AACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCT  
 AATACCGGATAACATTTTGCACCGCATGGTGCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGG  
 CTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC  
 TCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG  
 GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG  
 CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCG  
 GGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGC  
 ACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG  
 CAGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTC  
 ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGT  
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT  
 CTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
 GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTT  
 CCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG  
 CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG  
 CATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT  
 CTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG  
 CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG  
 CGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC  
 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT  
 GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCG  
 CGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAA

CTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT  
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTA  
 ACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACA  
 GATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

**ÖL-2:**

G TTCAGACATAAAAGGTGGCTTTGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGGCGC  
 A TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACC  
 T GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG  
 G AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG  
 C CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAA  
 C AAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC  
 G GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
 G AATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG  
 C CCCC GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGCAGA  
 A GAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG  
 A ACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAA  
 A GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT  
 G AGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTA  
 A GCACTCGGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGAC  
 G GGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAG  
 A ACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTT  
 C GGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT  
 G TTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCA  
 G TTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGAAGGAAGGTGGGGATA  
 A CTCCAATCTTCTTGCCCTTATGCCTGGGGTACCACTTGTTCAATGGGCAAACA  
 A AAGGACCGAACCGCGGGTTAACCATTCCCAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG  
 C AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC  
 A TGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGG  
 T ACCATAATCGAATTCCC GCGGCCCATGGCGGCCGGAGCATGCGACCGCTA  
 C C

**ÖL-3:**

CACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG  
 A CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC  
 A ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGG  
 G TCGTAAA ACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTAC  
 C TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG  
 T AATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCA  
 G GCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT

TGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAG  
 CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTG  
 GTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT  
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTCCG  
 CCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCG  
 CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT  
 GTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG  
 ACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCTTCGGGGGACAGATTGACAGGTGGTGC  
 ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC  
 GCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCC  
 GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG  
 ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCG  
 AGGTCAAGCCAATCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACT  
 CGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA  
 ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTACCATAATCGA  
 ATTCCCGCGGCCCGCCATGGCGGCCGGAGCATGCGAGAGTACGT

**ÖL-4:**

GGGTACGAGTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCCGGGGAATTCGATTATT  
 CTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGC  
 AAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGG  
 GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC  
 GGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGG  
 CTTTGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA  
 ACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC  
 ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC  
 TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCT  
 TTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAATAAGTGCTAGTTGAATAAGC  
 TGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG  
 CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG  
 CGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAG  
 GGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCAT  
 GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGA  
 CTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA  
 TTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGG  
 TTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC  
 GGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG  
 AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC  
 CTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGG  
 TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGT



**ÖL-5:**

TCGGTAGGGGGTTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATT  
ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACA  
TGCAAGTCGAGCGAATCGATGGGAGCTTGCTCCCTGAGATTAGCGGCGGACGG  
GTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACC  
GGAGCTAATACCGGATACGTTCTTTTCTCGCATGAGAGAAGATGGAAAGACGG  
TTTACGCTGTCACTTATAGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA  
ATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC  
TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGAAGAAGGC  
CTTCGGGTTCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCAGAGTACTGCT  
GGTACCTGACGGTACCTACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG  
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC  
GCAGGTGGTTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGG  
TCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCAAGT  
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT  
TTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTT  
TCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG  
GCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC  
TCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCC

## ÖZGEÇMİŞ

30.06.1990'da Kadıköy'de doğdu. İlkokul eğitimini Kocaeli'nin Darıca ilçesine bağlı Darıca İlköğretim Okulu'nda, liseyi ise Darıca Lisesi'nden tamamladı. 2008-2009 Eğitim-Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliğine Bölümüne başladı. 2013 yılında bu bölümden tezsiz yüksek lisans derecesiyle mezun olduktan sonra aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalında tezli yüksek lisans eğitimine başladı.

