

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FASULYE TOHUM BÖCEĞİN (*ACANTHOSCELIDES OBTECTUS* SAY)'DEN BAKTERİ
İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ekrem OKUTAN

**Temmuz 2019
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FASULYE TOHUM BÖCEĞİN (*ACANTHOSCELIDES OBTECTUS* SAY)'DEN BAKTERİ
İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**

Ekrem OKUTAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21 /05/2019
Tezin Savunma Tarihi : 11 /07/2019

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kazım SEZEN

Trabzon 2019

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalında
Ekrem OKUTAN Tarafından Hazırlanan**

**FASULYE TOHUM BÖCEĞİN (*ACANTHOSCELIDES OBTECTUS* SAY)'DEN BAKTERİ
İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 14 / 06 / 2019 gün ve 1807 sayılı

**kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan :

Üye :

Üye :

Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Fasulye Tohum Böceğın (*Acanthoscelides obtectus* Say)’den Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması” adlı 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 desteğı sağlayan ve değerli bilgilerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Kazım SEZEN’e, laboratuvarında maddi manevi imkanlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tez çalışmalarım sürecinde desteklerini esirgemeyen Dr. Zeynep BAYRAMOĞLU’na, Uzman İslam YILDIZ’a, Ebru GÜNEY’e ve Cihan GÖKÇE’ye teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım esnasında sevgi, ilgi, maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme, eşime ve kızıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmam süresince laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığına da teşekkür ederim.

Ekrem OKUTAN

Trabzon 2019

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Fasulye Tohum Böceğin (*Acanthoscelides obtectus* Say)’den Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Kazım SEZEN’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdığimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 21/05/2019

Ekrem OKUTAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	I V
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Kuru Fasulye ve Türkiye Ekonomisindeki Yeri	3
1.3. Ülkemizde Karşılaşılan Baklagil Zararlıları	5
1.4. Fasulye Tohum Böceği (<i>Acanthoscelides obtectus</i> (Say), Col: Bruchidae).....	6
1.4.1. Tanımı	6
1.4.2. Fasulye Tohum Böceğinin Biyolojisi ve Zararı.....	8
1.4.3. Ekonomik Önemi ve Yayılışı.....	9
1.5. Baklagil Tohum Zararlılarıyla Mücadele Yöntemleri.....	10
1.5.1. Entomopatojenik Bakteriler	12
1.5.2. Fasulye Tohum Böceği ile Mücadele Yöntemleri	13
1.4. Çalışmanın Amacı.....	14
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	15
2.1. <i>Acanthocelides obtectus</i> 'un Toplanması.....	15
2.2. Bakteri İzolasyonu ve Karakterizasyonu	15
2.2.1. Bakteri İzolasyonu	15
2.2.2. Bakterilerin Saf Kültür Haline Getirilmesi ve Stoklanması.....	15
2.2.3. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Tanımlanması	16
2.2.3.1. Gram Boyama	16
2.2.3.2. Endospor Boyama	16
2.2.4. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Olarak Tanımlanması	17
2.2.4.1. Katalaz Testi.....	17
2.2.4.2. Oksidaz Testi.....	17

2.2.4.3.	İndol Testi	17
2.2.4.4.	Voges-Proskauer Testi	18
2.2.4.5.	Sitrat Testi	18
2.2.4.6.	Üre Hidroliz Testi	19
2.2.4.7.	Hidrojen Sülfür Üretim Testi	19
2.2.4.8.	Nişasta Hidroliz Testi.....	19
2.2.4.9.	API 20E Panel Test Sistemi	20
2.2.4.10.	Bakteri İzolatlarının Seçici ve Ayırt Edici Besiyerlerinde Büyütülmesi	21
2.2.4.11.	Hareketlilik Testi.....	21
2.2.5.	Bakteri İzolatlarının Moleküler Özellikleri.....	22
2.2.5.1.	Genomik DNA İzolasyonu.....	22
2.2.5.2.	16S rDNA Geninin PCR ile Çoğaltılması.....	22
2.2.5.3.	16S rDNA Gen Bölgesinin Vektöre Klonlanması	23
2.3.	İnsektisidal Aktivite Testleri	24
2.3.1.	<i>Acanthoscelides obtectus</i> 'un Laboratuvarında Yetiştirilmesi.....	24
2.3.2.	Bakteri İzolatlarının Hazırlanışı.....	25
2.3.3.	Bakteriyel izolatların İnsektisidal Aktivite Çalışmaları	25
3.	BULGULAR	26
3.1.	Fasulye Tohum Böceğinden Bakteri İzolasyonu	26
3.2.	Bakteri İzolatlarının Karakterizasyonu	26
3.2.1.	Bakteriyel İzolatların Morfolojik Özellikleri	26
3.2.2.	Bakteriyel İzolatların Biyokimyasal Özellikleri	28
3.2.3.	Bakteri İzolatlarının Seçici ve Ayırt Edici Besiyerlerinde Büyüme Özellikleri.....	29
3.2.4.	API 20E Panel Test Sistemiyle Tespit Edilen Özellikler.....	30
3.2.5.	İzolatların Moleküler Karakterizasyonu	33
3.2.5.1.	İzolatların 16S rDNA Gen Sıraları.....	33
3.3.	İnsektisidal Aktivite Çalışmaları.....	36
4.	TARTIŞMA	37
5.	SONUÇLAR	42
6.	ÖNERİLER.....	43
7.	KAYNAKLAR	44
8.	EKLER.....	51

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans

ÖZET

FASULYE TOHUM BÖCEĞİN (*ACANTHOSCELIDES OBTECTUS* SAY)'DEN BAKTERİ
İZOLASYONU VE TANIMLANMASI

Ekrem OKUTAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Kazım SEZEN
2019, 50 Sayfa, 9 Sayfa Ek

Bu çalışmada, *Acanthoscelides obtectus*'a karşı etkili bir mikrobiyal mücadele etmeni geliştirebilmek için zararlıdan bakteri izolasyonu yapıldı, izolatların morfolojik biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonları gerçekleştirildi. *A. obtectus*'un bakteri izolasyonu ve tanımlanmasını belirlemek için yapılan çalışmada, 9 bakteriyel izolat elde edildi ve bunlar Ao1-9 olarak isimlendirildi. Bu izolatların ışık mikroskopisi ile morfolojileri, geleneksel mikrobiyolojik yöntemler ve API kitleri kullanılarak biyokimyasal özellikleri belirlendi. Moleküler tanımlamada 16S rDNA gen dizileri sekanslanarak GenBank verileriyle karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre bu izolatlardan 7 tanesi Gram (+) (Ao1, Ao2, Ao3, Ao4, Ao5, Ao8 ve Ao9), bunlardan 5'i sporlu (Ao3, Ao4, Ao5, Ao8 ve Ao9) bakteridir. İzolatlardan 2 tanesi Gram (-) (Ao6 ve Ao7) olarak belirlendi. Oksidaz enzim aktivitesi incelendiğinde 3 izolatta (Ao6, Ao7 ve Ao8) oksidaz testinin pozitif, diğer izolatlarda negatif olduğu tespit edildi. Katalaz enzim aktivitesi incelendiğinde ise, 6 izolatta (Ao1, Ao2, Ao4, Ao5, Ao8 ve Ao9) pozitif sonuç belirlendi. İzolatlardan 3'ünün de (Ao3, Ao6 Ao7) katalaz negatif olduğu anlaşıldı. 16S rDNA gen sekans analizlerinin sonuçlarına göre Ao5 izolatı *Bacillus thuringiensis* olarak tanımlandı. Şu ana kadar tamamlanan insektisidal aktivite testlerine göre Ao5 izolatı %80 ölüm oranı ile en etkili izolattır. *B. thuringiensis* Ao5 izolatının zararlının biyolojik mücadelesinde değerli olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Acanthoscelides obtectus*, Bakteriyel flora, Biyolojik mücadele

Master Thesis

SUMMARY

ISOLATION AND DETERMINATION BACTERIA FROM BEAN WEEVIL
(*ACANTHOSCELIDES OBTECTUS* SAY)

Ekrem OKUTAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Kazım SEZEN
2019, 50 Pages, 9 Pages Appendix

In this study, to develop an effective microbial control agent against *Acanthoscelides obtectus*, we isolated bacteria and characterized as morphological, physiological, biochemical and molecular. In the studies to determine the bacteria from *A. obtectus*, 9 bacterial isolates have been isolated and named as Ao1-9. They are determined as morphological using light microscopy, biochemical features using both conventional microbiological methods and API kits. For molecular characterization, analyzed the sequences of 16S rDNA gene and compared the isolates in GenBank. According to the obtained results, 7 of these isolates are Gram (+) (Ao1, 2, 3, 4, 5, 8 ve 9), 5 of them include spore form, (Ao3, Ao4, Ao5, Ao8 and Ao9), and 2 of isolates are Gram (-) (Ao6 ve Ao7). Oxidase enzyme activity was determined in 3 isolates (Ao6, Ao7 ve Ao8) as positive, other isolates were observed as oxidase negative. According to catalase enzyme activity test, 6 of isolates (Ao1, 2, 4, 5, 8 and 9) were observed as positive. And the rest of 3 isolates (Ao3, Ao6 and Ao7) were also observed as catalase negative. According to the results of 16S rDNA base sequence analysis, Ao5 isolate was identified as *Bacillus thuringiensis*. According to the insecticidal activity tests results, the most effective isolate was 80% for Ao5 isolate. *B. thuringiensis* isolate (Ao5) may be valuable as biological control agent against *A. obtectus*.

Key Words: *Acanthoscelides obtectus*, Bacterial isolation, Biological control

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Kuru fasulye tohumu.....	3
Şekil 2. Baklagil Tohum Böcekleri ve ürünlerdeki zararları	6
Şekil 3. Fasulye Tohum Böceğinin evreleri	7
Şekil 4. Fasulye Tohum Böceğinin hayat döngüsü	9
Şekil 5. Fasulye Tohum Böceğinin zararı	9
Şekil 6. Fasulye Tohum Böceğinin dünyada ve Türkiye’de yayılışı	10
Şekil 7. Fasulye Tohum Böceğinden izole edilen bakterilerin morfolojik görüntüleri.....	27
Şekil 8. Bakteriyel izolatlara ait Gram ve endospor boyama görüntüleri	28
Şekil 9. Seçici ve ayırt edici besiyerilerde bakterilerin görüntüsü.....	30
Şekil 10. İzolatların 16S rDNA dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı.....	35
Şekil 11. Bakteriyel izolatların <i>A. obtectus</i> erginleri üzerindeki insektisidal etkisi..	36

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Türkiye'deki yıllara göre kuru fasulye üretimi	4
Tablo 2. API 20E panel test sisteminde değerlendirilen testler.....	20
Tablo 3. Filogenetik analizde kullanılan referans türler	24
Tablo 4. İzolatların morfolojik özellikleri	28
Tablo 5. İzolatların biyokimyasal özellikleri.....	29
Tablo 6. İzolatların API 20E panel test sistemi ile belirlenen özellikleri	31
Tablo 7. İzolatların 16S rDNA sekanslarının gen bankasındaki sıralarla karşılaştırılması.....	33

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADH	: Arginin dehidrolaz
AMY	: Amigdalın
ARA	: Arabinoz
bp	: Baz çifti
CIT	: Sitrat
CFU	: Koloni oluşturabilen birim
DDT	: Dikloro-difenil-trikloroetan
DNA	: Deoksiribonukleik asit
GEL	: Jelatin
GLU	: Glikoz
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
ICP	: İnsektisidal kristal proteini
IND	: İndol
INO	: İnositol
LDC	: Lizin dekarboksilaz
MAN	: Mannitol
MEL	: Melibioz
NPV	: Nukleopolihedrovirüs
ODC	: Ornitin dekarboksilaz
PBS	: Fosfat tuzu tamponu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
RHA	: Rhamnoz
RNA	: Ribonükleik asit
SAC	: Sukroz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOR	: Sorbitol
TDA	: Triptofan deaminaz
URE	: Üre
VP	: Voges proskauer
μ l	: Mikrolitre
°C	: Santigrad derece

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Ülkemizde milli yemekler içerisinde önde gelen kuru fasulye en çok tüketilen baklagillerden birisidir. Baklagiller, protein ihtiyacını karşılaması özellikle tahıl proteininin bazı aminoasitleri sınırlı miktarda ihtiva etmesi ve hayvansal gıdaların maliyet bakımından daha masraflı olması ile karşılaştırıldığında oldukça önem arz etmektedir (Şehirali, 1988). Baklagillerin besin olarak kullanılmasının yanısıra, hayvan yetiştiriciliğinde, kağıt sanayi, ilaç endüstrisi, boya ve reçine yapımı, mobilya imalatı, kozmetik gibi diğer sektörlerde de kullanılmaktadır (Saraçoğlu ve Erkan, 2016). Ülkemizde 898.197 dekar alanda 235.000 ton fasulye (*Phaseolus vulgaris*) üretimi yapılmaktadır (Aydoğan vd., 2015).

Fasulye verim ve kalitesi üzerine sınırlayıcı etkiye sahip abiyotik ve biyotik faktörlerin içinde zararlı böceklerin varlığı ve yoğunluğu ciddi oranda dikkat çekmektedir. Bruchidae familyasında bulunan bireylerden *Acanthoscelides obtectus* (Say) yılda birden fazla döl verebilme yeteneği nedeniyle hem arazide hem de depoda ciddi problemlere sebep olmaktadır (Mbogo vd., 2009). Bu zararlının larvaları, fasulye bitkisi üzerinde beslendiğinden ürünün kalitede, tohumunun çimlenme kabiliyetinde hasara ve ürünün ağırlığında kaybına sebep olmaktadır. Bunun yanında, böcekler fasulye oyuklarında bıraktıkları dışkı ve vücut kalıntıları ile de danelerde kirliliğe yol açarlar. Gerek ülkemizde ve gerekse dünyada *A. obtectus*'un zararı ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Esin, 1971; Kalkan, 1972; Atak, 1975; Thiery, 1984; Yücel, 1985; Özer ve Yücel, 1989; Elmalı ve Toros, 1990; Yaşarakıncı, 1991; Brzostek ve Ignatowicz, 1992; Tamer, 1996; Özdem ve Kovancı, 1996; Dörtbudak ve ark., 1999).

Uzun zamandır kimyasal ilaçların tarımda kullanılması zararlılarla mücadelede kesin çözüm olarak düşünülmüştür. Kimyasal mücadele tarım zararlılarıyla mücadele ile özdeşleşmiş olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat kimyasal mücadele kapsamında ilaç kullanımı hızlı bir şekilde yayılarak ciddi sorunların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Özellikle pestisitlerin yaygınlaşarak yüksek dozlarda ve bilinçsizce kullanılması istenmeyen yan etkilerin meydana gelmesine zemin hazırlamıştır. Bu zararlı yan etkilerden sonra kimyasal pestisitlerin kullanımını azaltacak ya da hiç kullanımına gerek kalmayacak alternatif mücadele yöntemlerinin araştırmalarına hızlı bir şekilde başlanmıştır.

Günümüzde farklı mücadele yöntemleri kullanılmasına rağmen, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de zararlı böceklerin mücadelesinde çeşitli kimyasal ilaçlar etkin bir şekilde uygulanmaktadır. Bu kimyasalların ekolojik dengede meydana getirdiği zararlı etkilerle birlikte doğaya hasar vermesi, hedeflenen zararlılar dışında yararlı organizmalarda da olumsuz etki göstermesi ve insan sağlığını kötü yönde etkilemesi gibi sebeplerle yasaklanmış ve birçoğu da kullanımdan kaldırılmaya başlanmıştır. Bu durum, olumsuz etkilerinden dolayı kimyasal ürünlere alternatif mücadele yöntemlerinin araştırılmasına yol açmıştır.

Devam eden süreçte biyolojik mücadele ciddi bir önem kazanmış ve bu alandaki araştırmalar giderek artmıştır. Özellikle entegre mücadele programları kapsamında biyolojik mücadele alternatif yöntem arayışı içinde dikkat çekici bir konuma gelmiştir.

Biyolojik mücadele, en yalın şekliyle ‘bitkisel ürünlerde ciddi ekonomik zararlara neden olan zararlı böceklerin kontrol altına alınmasında aynı ortamda mevcut olan doğal etmenlerin kullanılması’ olarak tanımlanabilir. Diğer bir deyişle, bitkisel ürünlerde zarar oluşturan böceklerin eşik seviyede olacak şekilde doğal dengeyi bozmadan, düzenleyici ve destekleyici önlemlerin uygulanmasıdır. Biyolojik mücadelede yaygın olarak kullanılan doğal etmenler üç gruba ayrılmıştır; predatörler, parazitoidler ve patojenler. Zararlılarla doğrudan beslenerek etkili olan faydalı böceklerde biri predatörlerdir. Zararlıların farklı evrelerinde yumurtalarını zararlı üzerine bırakarak etkili olan diğer bir etmen ise parazitoidlerdir. Patojenler ise zararlılarda hastalık yapan etmenlerdir.

Biyolojik mücadelede kullanılan etmenler bakteriler, virüsler, funguslar, nematodlar, protozoonlar ve rekombinant tekniklerle geliştirilen organizmalardan oluşmaktadır (Peter, 1984). Belirtilen gruplara ait etmenler zararlı böceklerde değişik hastalıklar oluşturarak böcek popülasyonlarının dengede tutulmasını ve zararlıların en az seviyeye inmesini sağlayarak zararı minimum seviyede tutmaktadır. Bunların çoğu zararlı türe özgü olduğundan yalnızca mücadele edilecek zararlı türde etkilidir. Bu özellikleriyle mikrobiyal etmenler, faydalı organizmalar ve insanlar gibi hedef olmayan organizmalarda risk oluşturmaz. Bunlar, bitkisel ortamda doğal olarak bulunmalarından dolayı çevresel kirliliğe neden olmazlar. Bu nedenden dolayı, gelecekte biyolojik etmenler kimyasal pestisitlerin yerini alacaktır.

Türkiye’de yıllık kişi başına düşen kuru fasulye tüketim oranının ortalama 3-4 kg olduğu dikkate alınır, yemeklik tane baklagillerden fasulye, ülkemiz bakımından oldukça önemlidir. Kuru fasulyenin depoda saklanması sürecinde *A. obtectus* tarafından meydana

getirilen zararı oldukça ciddi boyuttadır. Fasulye tanelerinde meydana gelen zarar kaliteyi düşürmektedir. Ülkemizde bu zamana kadar yapılan çalışmalara bakıldığında, *A. obtectus*'un biyolojisi, coğrafik yayılışı, konukçuları, zararı ve mücadele yolları üzerinde durulmuş, fakat biyolojik mücadele ile ilgili kayıtlara rastlanmamıştır. Ülkemizde önemli ekonomik kayıplara neden olan tohum zararlılarından biri olan *A. obtectus* ile etkili bir alternatif mücadelenin yapılabilmesi için entomopatojenik bakterilerin tespiti önemli bir adım olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada, *A. obtectus*'a karşı biyolojik mücadelede kullanılabilirliği amacıyla bu zararlının kültüre edilebilir bakteri florası belirlenerek zararlı üzerindeki biyolojik aktiviteleri belirlendi.

1.2. Kuru Fasulye ve Türkiye Ekonomisindeki Yeri

Baklagiller familyası içerisinde yer alan kuru fasulye, yılda bir kez meyve veren otsu bitkilerden biridir (Şekil 1). Kalsiyum ve vitamin bakımından oldukça zengin olan kuru fasulye B grubu vitaminleri, potasyum, demir, çinko ve lif açısından da çok zengin bir bakliyatır. Türk mutfağının geleneksel gıdaları arasında yer alması ve bitkisel protein kaynağı olması bakımından tüketiminin giderek artması beklenen bir durumdur. Ülkemizde kuru fasulye üretimi ağırlıklı olarak İç Anadolu'da yapılmaktadır.



Şekil 1. Kuru fasulye tohumu.

Türkiye'nin kuru fasulye üretimi 2017 yılında 239 bin ton olarak kaydedilmiştir. Yapılan tahminlerde kuru fasulye üretiminin ilerleyen yıllarda giderek artacağı, 2020 yılında üretilen miktarın 245 bin tona ulaşacağı ve tüketiminin de artan nüfusla birlikte aynı yönde artacağı düşünülmektedir (URL-1, 2019). Ülkemizde gelecek beş yıllık

dönemde tüketiminin artması sebebiyle ülke içi talebin fazla olması kuru fasulye ithalatının artmasına, ihracatının ise azalmasına neden olacaktır. 2020 yılında yaklaşık 60 bin ton kuru fasulyenin ihraç edileceği tahmin edilmektedir.

Kuru fasulye ekim alanlarının gelecek yıllarda azalacağı, 2017 yılından başlayarak yaklaşık 898 bin dekar olan ekim alanlarının %10 azalarak 2020 yılında 807 bin dekar alana düşeceği öngörülmektedir.

Yapılan çalışmalar sonucunda ülkemizde 2018 yılının sonu itibariyle kuru fasulye üretiminin yaklaşık 220 bin ton olacağı ve mevcut nüfusun ihtiyacının 30-60 ton arasında kuru fasulye ihracatı ile karşılanacağı tahmin edilmektedir (Tablo 1).

Tablo 1. Türkiye'deki yıllara göre kuru fasulye üretimi.

Yıl	Ekilen Alan (da)	Üretim (ton)	Verim (kg/da)
1961*	1.140.000	134.000	118
1970*	980.000	138.000	141
1980*	1.130.000	165.000	146
1990*	1.705.860	210.000	123
2000*	1.753.300	230.000	131
2001*	1.746.560	225.000	129
2002*	1.796.350	250.000	139
2003*	1.615.440	250.000	155
2004	1.550.000	250.000	161
2005	1.412.000	210.000	149
2006	1.290.515	195.970	152
2007	1.092.497	154.243	141
2008	982.326	154.630	157
2009	949.280	181.205	191
2010	1.033.811	212.758	206
2011	946.254	200.673	212
2012	931.740	200.000	215
2013	847.630	195.000	230
2014	911.103	215.000	236
2015	935.840	235.000	251
2016	898.197	235.000	262
2017	897.221	239.000	266
2018**	825.000	220.000	267

*FAOstat

**ZMO tahminidir

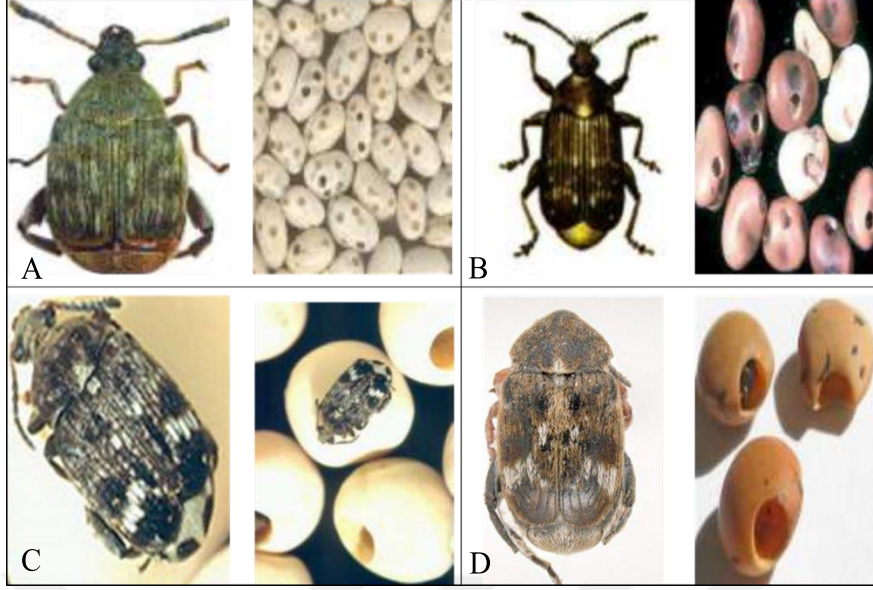
1.3. Ülkemizde Karşılaşılan Baklagil Zararlıları

İnsan ve hayvanların beslenmesinde önemli bir yer tutan baklagillerde, bahçeden saklandıkları ambarlara kadar bir çok aşamada ciddi zararlara neden olan birçok zararlı böcek türü bulunmaktadır. Bunlar arasında Bruchidae (Coleoptera) (Baklagil Tohum Böcekleri) familyasında bulunan böcek türleri, neden oldukları ağırlık, çimlenme ve özellikle kalite kayıpları sebebiyle ayrı bir yer tutmaktadır.

Bruchidae familyası içinde bulunan Baklagil Tohum Böceklerinin büyük bir kısmının esas konukçuları Leguminosae familyasına ait bitki türleridir. Bu bitki türleri arasında özellikle mercimek, bakla, nohut, bezelye, börülce ve fasulye gibi yemeklik bitkiler ile korunga ve yonca gibi yem bitkileri yer almaktadır (Lodos, 1998).

Bruchidae familyasına bağlı dünyada 1250 kadar tür bilinmekte, bunların da 250 kadarı Paleartik Bölge (Avrupa, Asya ve Kuzey Afrikayı içine alan)'de bulunmaktadır. Türkiye'nin Baklagil Tohum Böcekleri faunası oldukça zengindir (Decelle ve Lodos, 1989). Sadece Güneydoğu Anadolu bölgesinde yemeklik baklagil ve yemlik bitkilerde 19 Baklagil Tohum Böceği türü bulunmuştur (Özer ve Yücel, 1989).

Baklagil Tohum Böcekleri, baklagil tanelerinde meydana getirdikleri oyuklar nedeniyle fasulye tohumlarının ürün kalitesini düşürmelerinin yanında dışkı ve diğer böcek atıklarıyla kirlilik oluşturarak da zarar verirler. İç ve dış piyasada ciddi bir öneme sahip olan bu ürünlerin zarar görmesi, pazar değerinde azalmaya neden olur. Bu zararlılar, ülkemiz sınırları içerisinde baklagil ekimi yapılan tüm bölgelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Baklagil Tohum Böcekleri arasında en önemlileri, Bezelye Tohum Böceği (*Bruchus pisoru*), Bakla Tohum Böceği (*Bruchus rufimanus*), Mercimek Tohum Böceği (*Bruchus lentis*), Ortadoğu Mercimek Tohum Böceği (*Bruchus ervi*), Akdeniz Mercimek Tohum Böceği (*Bruchus signaticornis*), Börülce Tohum Böceği (*Callosobruchus maculatu*) ve Fasulye Tohum Böceği (*Acanthoscelides obtectus*) olarak bilinmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Baklagil Tohum Böcekleri ve ürünlerdeki zararları. A: Fasulye Tohum Böceği; B: Bakla Tohum Böceği; C: Bezelye Tohum Böceği; D: Mercimek Tohum Böceği.

1.4. Fasulye Tohum Böceği (*Acanthoscelides obtectus* (Say), Col: Bruchidae)

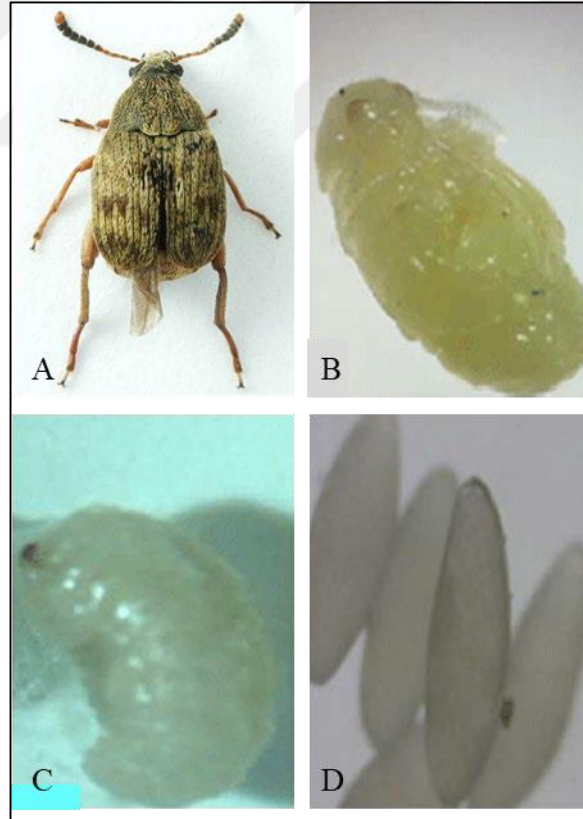
- Takım: Coleoptera
 - Familya: Bruchidae
 - Cins: *Acanthoscelides*
 - Tür: *Acanthoscelides obtectus* Say

Coleoptera takımına ait olan Fasulye Tohum Böceği, Bruchidae familyasında yer alan çok önemli bir depo zararlısıdır. Bahçede, sergide ve depodaki baklagil tohumlarıyla beslenirler. Fasulye Tohum Böceği başta fasulye olmak üzere, bakla, mercimek ve börülce ile beslenerek zarar yapmaktadır.

1.4.1. Morfolojik Tanımı

Fasulye Tohum Böceği 3-3.5 mm boyunda, kahverengi, vücudunda yanlamasına beyaz lekelerin varlığıyla karakterize edilir. Ön ve arka üyelerde dişli çıkıntılara sahiptir. Ön ve orta bacaklar yaklaşık aynı yapıda ve renktedir. Arka bacak koyu kahverengi, fakat tibia ve tarsi femura göre biraz açık renklidir. Kahverengi gövdenin birleştiği kısım öne doğru daralır. Vücudun ventrali kırmızı sarı tonlarındadır. Gözler, koyu renkli, yuvarlak, arka kenarında bir bant şeklinde, başın ön kısmına doğru yatık, sık ve açık sarı renkli kıllıdır.

Uzun ve Oval şekildeki yumurtanın, bir ucu sivri, diğeri yuvarlaktır. Yumurta yaklaşık 0.6-0.7 mm boyutundadır. Dişi bireyin bıraktığı yumurtaların rengi parlak beyaz iken sonradan matlaşarak süt beyaz rengini alır. Yumurtadan larvalar çıkmadan önce yuvarlak uçta baş kısmı belirginleşmeye başlar. Genç silindirik beyaz larvaların kılları ve üç çift bacağı vardır. Önden arkaya doğru vücut incelmektedir. Fasulye tohumunun içerisindeki larvaların şekli ise yay gibidir. Bu durumları ile birinci larva döneminden oldukça farklılık gösterir. Beyaz pupa yaklaşık 4 mm uzunluğundadır ve kışı genellikle depolarda ergin ya da larva aşamalarında geçirir (Şekil 3). Böcekler 12.5 °C sıcaklıkta ortaya çıkar, ancak 16 °C'deki sıcaklıkta aktif değildir. Böcekler 20 °C sıcaklıkta buldukları yerlerden tarlalara göç eder. İlk olarak fiğ, şeftali, acı bakla, yonca ve diğer baklagil fideleriyle beslenirler. Daha sonra fasulye çeşitleriyle beslenmeye başlarlar. Ayrıca zararlı tahıl tarlalarına da taşınır. Çiftleşme sonrasındaki günlerde dişi bireyler olgunlaşmış tohumu delerek içine ya da üzerine yumurtalarını koyar.



Şekil 3. Fasulye Tohum Böceğinin Evreleri. A: Ergin;
B: Pupa; C: Larva; D: Yumurta.

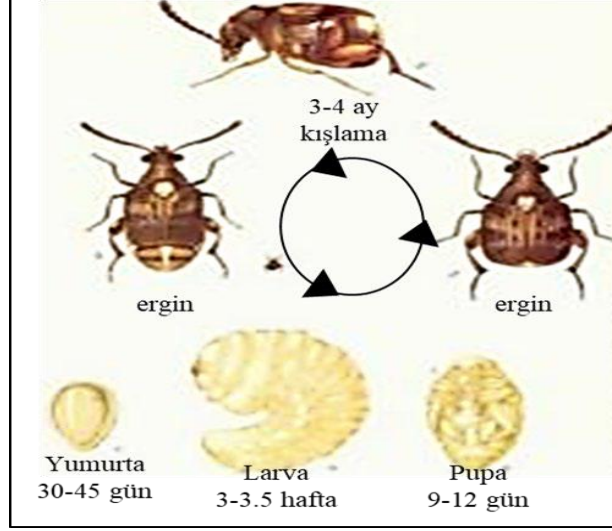
1.4.2. Fasulye Tohum Böceğinin Biyolojisi ve Zararı

Fasulye zararlısı kış dönemini depolardaki ürünlerde ya da doğal ortamda saklanabileceği yerlerde ergin olarak geçirir. Mayıs itibariyel bahçelerde görülmeye başlar. Dişi bireyler Temmuzun ortalarından sonra bahçelerdeki fasulye kapsülleri içerisine yumurtalarını bırakırlar. Yumurtalar tek ya da 4-20'li kümeler halinde bırakılır. Bir dişinin doğurganlığı yaklaşık 200 yumurtaya kadar ulaşabilir. Yumurtalar 30-45 gün boyunca gelişir.

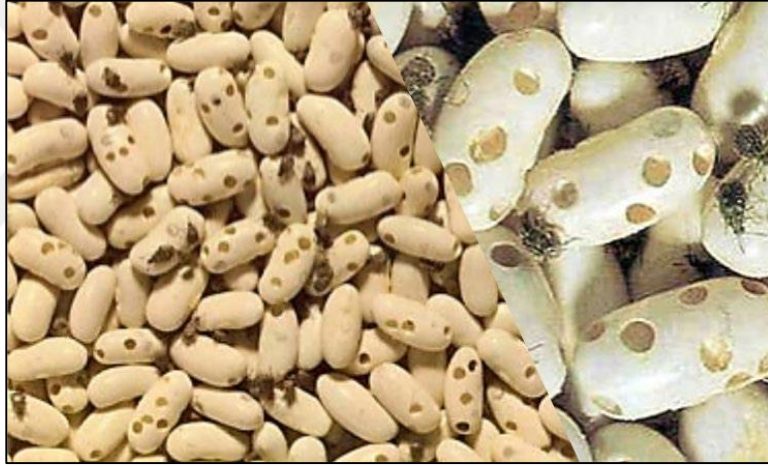
Yumurtadan çıkan larvalar tohum içeriğini tamamen yiyerek tahıllara nüfuz eder. Bu süreçte böcek, dışkılarını fasulye tohumu içerisindeki oyuklarda bırakır. Bu sırada çıkardığı pisliğini de dane içinde açmış olduğu galeride bırakır. Bir tane tohumda birkaç larva gelişebilir. Larval dönem yaklaşık 3-3.5 haftaya kadar sürmektedir.

Son dönemdeki larvalar fasulye tohumunun dışına yakın bir oyukta pupaya dönüşür. Pupa dönemi yaklaşık 9-12 günde tamamlanır. Bu süre sonrasında ergin bireyler tohumdan dışarıya çıkar. Yılda iklim koşullarına göre yaklaşık 5 döl vermektedir (Şekil 4). Bahçede 1-2. döl gözükürken depolarda ise sonraki dölleri döngülerini tamamlamaktadır. Bir neslin yaşam döngüsü 100-110 gün sürer. Zararlı kışa kadar geliştiği tohumda depoya ulaşır. Tarlada bulaşma oranı %74'e kadar çıkabilir.

Oligofag (bir kaç besinle beslenen) olan *A. obtectus* genellikle konukçu olarak fasulye, nohut, börülce, bakla ve soya fasulyesini tercih etmektedir. Hasat zamanı geçirilen ürünlerde zarar seviyesi daha fazladır. Zarara uğrayan fasulye tohumlarının değeri azalmakta ve kalitesi düşmektedir (Şekil 5). Tohumlarla, özellikle de fasulye ile beslenerek gelişen bu böcek, genellikle depolarda çoğalabildiğinden, çok zararlıdır. Fasulye, börülce, bakla ve mercimekte zararlı bir türdür.



Şekil 4. Fasulye Tohum Böceğinin Hayat Döngüsü.



Şekil 5. Fasulye Tohum Böceğinin Zararı (URL-2, 2019).

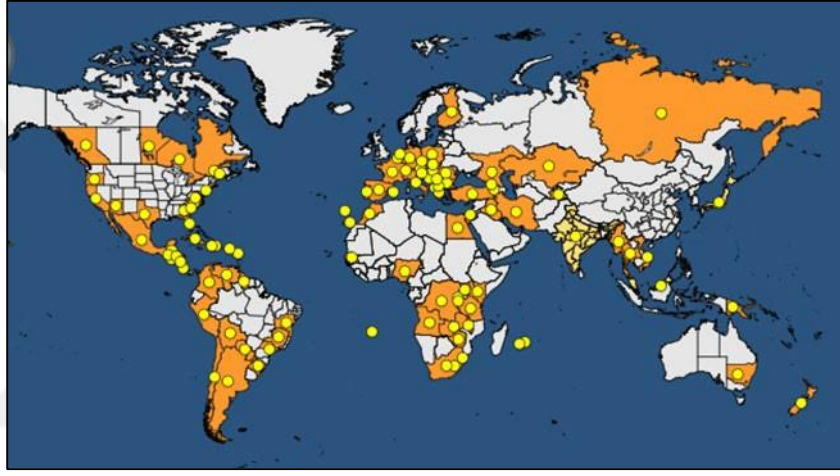
1.4.3. Ekonomik Önemi ve Yayılışı

Fasulye Tohum Böceği fasulyede önemli hasara neden olur. Larvalar genellikle bakla içeriğini tamamen yiyerek verimi %50-60 azaltır. Kısmen hasar görmüş tahıllar çimlenme gücünü ve lezzet kalitesini kaybeder. Zararlı hem tarlada hem de depoda tahıla zarar vererek ürünün kalitesini düşürür. Kontrol önlemleri arasında depolarda sıcaklığın eksi derecede tutulması, fümigasyon, tarlalarda böcek ilacı uygulamaları vardır.

Bu türün anavatanı Orta Amerika'dır. On dokuzuncu yüzyılın sonunda tahılla Avrupa'ya yerleşti ve 1920'lerde Kırım'da görüldü. Günümüzde, fasulye tohum böceği Avrupa, Asya, Kuzey ve Güney Amerika, Afrika, Avustralya, Havayi adaları ve diğer

bölgelere yayılmıştır. Şekil 6’da Eski Sovyetler Birliği sınırları içinde, böcek lekeli dağılımla işaretlenmiştir. Bölgenin kuzey sınırı, Litvanya, Beyaz Rusya, Tula ve Ryazan Bölgeleri, Tataristan'ın kuzey sınırları boyunca uzanmaktadır. Bazen Batı Sibirya'nın güney kesiminde de görülür. Ukrayna'nın bazı bölgelerinde, Krasnodar Bölgesi'nde bulunan Transkafkasya'da yüksek zarar aktivitesi olduğu bildirilmektedir (Şekil 6).

Marmara Bölgesi’nde yılda yaklaşık 5, Orta Anadolu’da 4-5, Ege ve Karadeniz Bölgesi’nde 3-5 ve Güneydoğu Anadolu’da 3-4 döl veren Fasulye Tohum Böceği Türkiye genelinde zararlı olan bir türdür (Şekil 6).



Şekil 6. Fasulye Tohum Böceğinin dünyada ve Türkiye’de yayılışı (URL-3, 2019).

1.5. Baklagil Tohum Zararlılarıyla Mücadele Yöntemleri

Bitkisel ürünün ve gıdanın zararlılardan korunması üretici, işletme ve ihracatçılar için oldukça önem taşımaktadır. Zararlı böceklerin depolanabilir tarım ürünlerine verdiği zararlar öncelikle bahçede başlar, kurutma ve depo aşamasında devam eder. Bu nedenle mücadele çalışmaları öncelikli olarak bahçede başlatılır. Bahçe temizliği, kuru dalların uzaklaştırılması, hasat zamanının geçirilmemesi gibi hususlara dikkat edilmesi zararlılarla mücadelede ilk adımı oluşturmaktadır. Buna ek olarak, ürünlerin saklanacağı depoların temiz, zararlıın kolayca girip çıkışına izin vermeyecek şekilde olması bulaşmanın önlenmesi bakımından önemlidir.

Kültürel önlemler özellikle ürünün bahçeden depoya doğru olan yolculuğunda zararlıdan koruma sağlayacak önlemlerin sağlanmasıdır. Baklagil tohum zararlıları ile

mücadelede ciddi hasar gözlemlenen bölgelerde ekim işleminin geç yapılması tavsiye edilir. Hasat ve harman işleminin geç kalınmadan gerçekleştirilerek ürünün, önceden temizlenmiş depolara aktarılmasına dikkat edilmelidir. Hasat işleminin akabinde bahçelerdeki ürün artıkları derine gömülerek ya da yakılarak imha edilmelidir. Kullanılan tohumlukların temiz olmasına dikkat edilmelidir. Bahçede korumaya alınan tarımsal ürünler uygun taşıma koşullarında, temiz olan, ilaçlama yapılmış, herhangi bir bulaşmanın olmayacağı şekilde önlemleri alınan depolara transfer edilir. Ayrıca depolarda eski kullanılmış malzemelerin olmamasına dikkat edilmelidir.

Baklagil tohum zararlıları ile kimyasal mücadelede ise hem bahçede hem de depoda olmak üzere iki ayrı ilaç uygulama yeri ve dönemi bulunmaktadır. Bahçede ilaçlama özellikle çok döl meydana getiren türlerden *A. obtectus*'un yayıldığı alanlarda fasulyenin çeşidi, gelişim durumu ve ekim zamanı dikkate alınarak önerilen ilaçlar kullanılarak, 10-14 gün arayla 2-3 kez ilaçlama yapılması ile zararlının yayılması önlenmeye çalışılır. Özellikle bitkinin hasadı ve harmanı arasındaki sürenin hesaplanması ve ilaç aralıklarının ona göre belirlenmesine önem gösterilmelidir. Ürün bulunmayan depoların ilaçlaması ise her zaman yapılabilmektedir. Fakat deponun boş olması ve ürün gelmeden 15-20 gün öncesinde ilaçlamanın yapılması önemlidir.

Fasulye Tohum Böceği gibi çok döl veren zararlı türlerin zararını gidermek için ürün depolara yerleştirilirken koruyucu ilaçlama yapılmaktadır. Bu ilaçlamada uygulanacak teknik, kullanılacak ilaçla depodaki ürünün iyice karışmasını sağlayacak şekilde yapılmalıdır. Bu uygulamada küçük miktarlardaki ürün için ilaçlama bidonları kullanılabilir. Bidonlara aktarılan ürün ve gerekli miktarda ilaç koyularak 4-5 dakika alt üst edilir. İyice karıştırılan ilaçlı ürün daha sonra depoya aktarılır. Ürün miktarının fazla olduğu durumlarda birer tonluk ürün kullanılarak ilaçlama yapılır. Uygun bir örtüye aktarılan ürün, yeterli miktardaki ilaç ile küreklenerak karıştırılır ve depoya yerleştirilir.

Bazı durumlarda, baklagil tohumları hasat edilmeden önce zararlı bulaştığı gözlenmişse hasat edildikten sonra çok döl meydana getiren tohum zararlılarına karşı ürünün fümige edilmesi en etkili yöntemdir. Ya da üründe zarar veya zararlı gözlemlendiği zaman hemen fümigasyon yapılmalıdır (URL-4, 2019).

Diğer mücadele yöntemlerinden biri de tuzaklar kullanılarak depolanabilir ürünlerde zararlılarla en sık, maliyetsiz ve kolay yapılan mücadeledir. Işık, yem, yapışkan feromon gibi tuzaklar bu tip mücadelenin en fazla kullanılanlarıdır.

Depolanmış ürünlerdeki böceklerle mücadelede, hem ülke sınırları içinde, hem de ülke sınırları dışında, ürünlerin transferi sırasında ürünün kontrol edilerek iç ve dış karantina, ambargo, muayene veya sertifika uygulamaları şeklinde mücadele yapılmaktadır.

Ülkemiz koşullarında depolarda bulunan ürünlerde düşük sıcaklık uygulaması da tercih edilen bir yöntemdir. Zararlı böcekler -10 ile -18 °C'de bir süre sonra donarak ölmektedir. Bu şekilde depodaki ürünlerin zararlılığının etkileneceği sıcaklıklarda bir süre muhafaza edilmesi ürünün korunmasını sağlayabilmektedir. Bunun yanısıra yüksek sıcaklık uygulamaları da depolarda kullanılarak mücadele yapılabilmektedir. Fakat sıcaklık ve uygulama yöntemi ürüne zarar vermeyecek şekilde düzenlenmelidir. Sıcaklık uygulaması, ülkemizde de bazı işletmelerde uygulanan bir metod olarak bilinmektedir (Sarıyörük ve Köseoglu, 1987; Bülbül, 1993; Ferizli vd. 2004).

Baklagil Tohum Böcekleri ile Biyolojik Mücadele çalışmalarının oldukça sınırlı sayıda oldukları dikkat çekmektedir. Sadece, bu zararlılar üzerinde etkili bir şekilde kullanılan predatör ve parazitoidlerin yanında patojenlerin de kullanıldığı araştırmalar mevcuttur (Ferron, 1997; Schmale vd., 2002; Dal Bello vd., 2006; Sevim vd., 2015).

1.5.1. Entomopatojenik Bakteriler

Entomopatojen Bakteriler, böceklerde kitle halinde ölümlere neden olduklarından dolayı günümüzde zararlı böceklere karşı en çok tercih edilen patojenlerdir. Bakteriler, sporlu ve sporsuz olarak iki gruba ayrılarak sınıflandırılır. Spor oluşturmeyen böcek patojeni bakteriler, Pseudomonaceae, Enterobacteriaceae ve Micrococcaceae familyalarına ait bakterilerdir. Yıllardan beri yapılan araştırmalarda, bu familyalara ait birçok bakteri türü böceklerden izole edilmiş ve bazılarının izole edildikleri böcekler üzerinde hastalık etmeni olduğu belirlenmiştir. Bunlar arasında en dikkat çekenini ise *Bacillus thuringiensis*'tir. Bu bakteri, Cry olarak isimlendirilen proteinlerinin varlığı nedeniyle birçok zararlıya karşı etkili olarak kullanılmaktadır (Sezen ve Demirbağ, 1999; Kuzina vd., 2002; Osborn vd., 2002; Demir vd., 2002).

Mikrobiyal insektisit, bir organizmanın ürettiği, belirli bir böcek türünü öldüren bir toksin olabileceği gibi, belirli bir böceği ölümcül olarak enfekte etme kabiliyetine sahip olan bir organizma da olabilir. En çok çalışılan, en etkili ve en sık yararlanılan mikrobiyal insektisitler *Bacillus thuringiensis* türleri tarafından üretilen kristal (Cry) proteinleridir (Kumar vd., 1996). Bu bakteri, belli böceklerde öldürücü etkiye sahip farklı toksinler

üreten suş ve alttürlerine sahiptir. *B. thuringiensis*'nin farklı suşları Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera takımı içerisinde bulunan zararlı böceklere karşı sınırlı ya da kapsamlı bir toksik etkiye sahiptir. Cry toksinlerinin etki mekanizması ile ilgili çalışmalar genellikle Lepidoptera takımına ait böcekler üzerinde çalışılmıştır (Bravo vd., 2007). Örneğin *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, Lepidoptera grubu larvaları (güve, kelebek, lahana kurtları, ladin tomurcuk kurtları) için öldürücü etkiye sahiptir (Held, 1982). *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ise Diptera grubu yani sivrisinek ve karasinekler üzerinde etkilidir (Liu, 1993).

1.5.2. Fasulye Tohum Böceği ile Mücadele Yöntemleri

Fasulye Tohum Böceğinin mücadelesinde kültürel, kimyasal yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kültürel önlem olarak, hasat işlemi yapıldıktan sonra bahçe sürülmeli ve bitkisel atıklar yok edilmelidir. Yabancı otlar iyi bir şekilde temizlenmelidir. Hastalıklı, zarar görmüş ürünler bahçeden uzaklaştırılarak yok edilmelidir.

Kimyasal mücadelede depoların ilaçlanması uygun miktarda ve koşullarda yapılmalıdır. Bahçeden alınan ürün depoya aktarıldıktan sonra zararlıların imha edilmesi için fumigasyon (gaz halinde ilaç) işlemi yapılmaktadır. Bahçede bitkinin alt kapsülleri kurumaya başladığında ilaçlama yapılarak zararlıların bulaşması önlenmelidir. İlaçlama 10-14 gün arayla tekrarlanmalıdır. Ayrıca, organofosfatlı pestisitler grubu gibi kimyasal böcek ilaçları, toplu olarak depolanan ürünleri korumak için depolama zararlılarına karşı kullanılmıştır (El-Aziz, 2011). Ancak, bu kimyasalların insan sağlığı ve çevreye istenmeyen etkileri vardır. Bu nedenle, bu böcek zararlılarının biyolojik kontrolü, geleneksel ve kimyasal kontrol yöntemlerine ilgi çekici bir alternatif olarak kabul edilir.

Bakteriler, mantarlar, nematodlar, virüsler ve protozoalar gibi entomopatojenik mikroorganizmalar hem tarımda hem de ormancılıkta çeşitli zararlı türlere karşı mikrobiyal mücadele etmenleri olarak kullanılmıştır (Khetan, 2001; Lacey vd., 2001). Fasulye tohum böceğinin biyolojik mücadele çalışmalarında parazitoid (Schmale vd., 2001, 2002, 2006), predatör (Berger vd., 2017), bakteri ve ağırlıklı olarak fungus (Rodrigues ve Pratisoli, 1999; Crespo vd., 2002; Dal Bello vd., 2006; Bensaci vd., 2013; Sevim vd., 2015; Ondrackova, 2015) öne çıkmaktadır. Türkiye'de fasulye tohum zararlısına karşı Sevim vd.

(2015)'nin yapmış olduğu çalışmada *A. obtectus*'a karşı bakteri ve fungus uygulanarak biyolojik mücadeledeki etkileri ortaya konmuştur.

1.6. Çalışmanın Amacı

Yukarıda belirtilen tüm çabalara rağmen, Fasulye Tohum Böceği (*Acanthoscelides obtectus*)'nin fasulye ve diğeri baklagil tohumlarındaki zararı ülkemizde ve tüm dünyada hala etkin bir şekilde devam etmektedir. Ciddi ürün kaybına neden olan bu zararlı ekonomik olarak da önemli kayıplara yol açmaktadır. Tarımın büyük bir öneme sahip olduğu ülkemiz için bu ekonomik kayıp oldukça dikkat çekicidir.

Fasulye Tohum Böceğinin meydana getirdiği zararı azaltacak ya da ortadan kaldıracak bir biyolojik etmenin tespiti oldukça önemlidir. Bu düşünceyle yola çıkılarak yapılan bu tez çalışmasının amacı, dünyada ve ülkemizde önemli bir tohum zararlısı olan *Acanthoscelides obtectus*'un kültüre edilebilir bakteriyel izolasyonunu ve tanımlamasını belirlemek ve bu izolatların Fasulye Tohum Böceği üzerindeki etkinliğinin test edilerek Biyolojik mücadelede kullanılma potansiyellerini ortaya koymaktır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. *Acanthocelides obtectus*'un Toplanması

Bu çalışmada *A. obtectus*'un bakteriyel izolasyonu ve tanımlamasını yapılması amacıyla canlı bireyler kullanıldı. Fasulyeler Rize ve Trabzon'un Of ilçesinden 2010-2011 yıllarında temin edildi. Fasulye Tohum Böcekleri, buldukları fasulye tanelerinde muhafaza edilerek laboratuvara getirildi. Laboratuvarda toplanan böceklerden canlı olanlar ayrıldı.

2.2. Bakteri İzolasyonu ve Karakterizasyonu

2.2.1. Bakteri İzolasyonu

Bakteri izolasyonu öncesinde, canlı 10 adet *A. obtectus* birey yüzey sterilizasyonu için %70'lik etil alkol içerisinde 5 dakika bekletildi. Bu işlemden sonra alkolden arındırmak için steril saf su içerisinde böcekler 2-3 kere yıkandı. Homojenizatör yardımıyla 1 ml nütrient sıvı besiyeri içerisinde böcekler iyice ezildi. Ezilen böcek karışımı tülbentten süzülerek böcek doku ve artıkları uzaklaştırıldı. Elde edilen süzüntüden 25 µl, 50 µl ve 100 µl kullanılarak besiyerine (nütrient agar) inokülasyon yapıldı. Kalan süzüntülerde çok düşük miktardaki mikroorganizmaların sayısını artırmak ve bunları tekrar ekim sonucunda tespit edebilmek amacıyla 30 °C'de 5-6 saat inkübasyona bırakıldı. Bunlardan da 25 µl ve 50 µl alarak aynı şekilde nütrient agara ekim yapıldı. Buna ek olarak, inkübe edilen süzüntü seyreltildi ve bu seyreltiklerden 25 µl, 50 µl ve 100 µl kullanılarak nütrient agar besiyerine ekim yapıldı (Sezen vd., 2007).

2.2.2. Bakterilerin Saf Kültür Haline Getirilmesi ve Stoklanması

Besiyerinde büyüyen bakteri kolonileri binoküler mikroskop altında gözlemlendi ve şekil ve renk gibi farklı özelliklere sahip olan kolonilerden steril öze yardımıyla dikkatli bir şekilde alınarak nütrient agar üzerine çizgi ekim yapıldı. Bu ekimler sonucunda aynı özelliklere sahip kolonileri içeren saf kültürler elde edildi. Saf kültürler numaralandırılarak %20'lik gliserol içinde hazırlandı ve – 80 °C ve – 20 °C'de saklandı.

2.2.3. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Tanımlamaları

İlk olarak yapılan mikroskopik incelemelerde izolatların koloni rengi, morfolojisi, kolonilerin kenar görünüşü, Gram boyama ve spor boyama özellikleri belirlendi.

2.2.3.1. Gram Boyama

Gram boyama, yaygın olarak tercih edilen bir boyama yöntemi olup sınıflandırmada ve tanımlamada kullanılmaktadır. Böylece, bakterilerde hücre duvarı yapısının Gram pozitif (+) ya da Gram negatif (-) şeklinde belirlenmesini sağlar. Gram (-) olan bakterilerde hücre duvarında peptidoglikan tabaka, Gram (+) bakterilere göre daha incedir. Gram boyama için bakteri izolatları ayrı ayrı nütrient sıvı besiyerine ekildi ve 16-24 saat boyunca 30°C'de sallandı. Büyüyen bakteri kültürlerinden smear hazırlandı ve ateşten geçirilerek sabitlendi. Daha sonra hazırlanan bakteriyal smear sırasıyla;

- a) 1 dakika kristal viyolete boyasında bekletildi ve dH₂O ile yıkandı,
- b) 1 dakika Gram iyodu içinde bekletildi,
- c) Aseton-Alkol ile renk gidinceye kadar yıkandı ve ardından beklemeden dH₂O ile yıkandı,
- d) Safraninde 30-60 saniye bekletilerek tekrar dH₂O ile yıkandı,
- e) Bekletilerek kuruması sağlandıktan sonra mikroskopta inceleme yapıldı.

Gram boyama sonucunda mor renk görünen bakterilerin Gram (+), pembe renk görünen bakterilerin ise Gram (-) olduğu tespit edildi (Cappuccino ve Sherman, 1992).

2.2.3.2. Endospor Boyama

Endospor boyama, bakteri sınıflandırmasında sıkça tercih edilen ve bakteride endospor olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılan bir boyama tekniğidir. İzolatlar içerisinde Gram (+) olan bakteriler endospor boyamaya tabi tutuldu. Gram (+) izolatların nütrient sıvı besiyerinde 48-72 saat 30 °C'de büyümeleri sağlandıktan sonra bakteriyal smear hazırlandı. Smearlar alevden geçirilerek sabitlendi ve üzerleri filtre kağıdıyla kapatıldı. Kaynayan suyun buharı üzerinde malaşit yeşili ile 5 dakika boyunca boyandı. Bu süre sonunda dH₂O ile yıkanarak 30-60 saniye boyunca safranin içinde bekletildi. Tekrar dH₂O ile yıkandı ve bekletilerek kuruması sağlandı. Mikroskopta kırmızı renkli hücreler içinde yeşil renk

görünen sporların varlığı tespit edildi (Cappuccino ve Sherman, 1992).

2.2.4. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Olarak Tanımlanması

2.2.4.1. Katalaz Testi

Genellikle aerobik mikroorganizmaların oluşturduğu bir enzim olan katalaz, mevcut olan hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalar. Sıvı veya katı bakteri kültürlerine hidrojen peroksit (H_2O_2) ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenir hale gelmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını, dolayısıyla da katalazın varlığını gösterir. Bu testte izolatların katalaz aktivitesine sahip olup olmadıklarını belirlemek için triptik soy agar besiyerine ekimleri yapıldı. Ekim yapılan petripler 24-48 saat $30\text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekletildikten sonra üzerlerine %3'lük H_2O_2 damlatılarak gaz kabarcıklarının varlığı ile testin pozitif olduğu kaydedildi (Cappucino ve Sherman, 1992).

2.2.4.2. Oksidaz Testi

Oksidaz testi, bakteriyel sitokrom oksidaz enziminin gösterilmesi amacıyla kullanılır. Bakteriyel izolatların oksidaz aktivitesine sahip olup olmadıklarına bakmak için kullanılan bu testte triptik soy agar üzerine çizgi ekim yapıldı. Ekim yapılan petripler $30\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 24-48 saat boyunca inkübasyon edildikten sonra oksidaz testi ayıracı kullanıldı. Siyah renk oluşumuna bakılarak testin pozitif sonuç verdiği tespit edildi (Benson, 1985).

2.2.4.3. İndol Testi

Triptofan aminoasidi bazı bakteriler tarafından karbon, azot ve enerji kaynağı olarak kullanılırken, bazı bakteriler tarafından da maddelerin enzimatik yollarla oksidasyonlarını arttırmak amacıyla kullanılır. Bakteriler triptofan aminoasidi ihtiva eden besiyeri ortamında büyüdüğünde triptofanaz enzimi üretilir, triptofanı parçalayarak indol, pirüvik asit ve amonyum oluşumunu sağlarlar. Bakterilerin triptofanı kullanıp kullanmadıkları, ortamda indolün varlığı veya yokluğu ile anlaşılır. Bu test için triptofan sıvı besiyeri hazırlanarak steril tüplere 4 ml aktarıldı. Bakteri izolatları ayrı ayrı tüplere ekilerek 48 saat

boyunca 30 °C’de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra ayıraç olarak tüplere 1 ml kovack kimyasalı damlatıldı. Tüplerin üst kısımlarında kırmızı halka oluşumu pozitif, sarımsı halka oluşumu ise negatif sonucu gösterir.

2.2.4.4. Voges-Proskauer Testi

Voges-Proskauer (VP) testi, bakteri türlerinin tayininde kullanılan bir testtir. Bakterilerden bazıları, glikozun parçalanması ile asetil metil karbinol (aseton) olarak nötral bir ürün meydana getirir. Bu nötral ürün, ortama potasyum hidroksid (KOH) eklendiğinde oksitlenerek diasetil oluşturur. Diasetil ile alfa naftol (kreatin, arginin veya kreatinin) reaksiyonu sonucunda kırmızı renk gözlemlenir. Bu test fermentasyon esnasında glukozdan yüksek miktarda asit üreten bakterileri, nötral aseton üretenlerden ayırmak için yapılır. VP besiyeri, glukoz katkılı nutrient broth olup, VP testleri için kullanılmaktadır. Aseton üretimi α -naftol (VP-I kimyasalı) ve potasyum hidroksit (VP-II kimyasalı) ilavesi ile tespit edilir. Eğer ortamda aseton varsa kimyasallar eklendiğinde tüpün üst kısmı kırmızıya dönüşür. Aseton yoksa besiyerinin rengi açık kahverengine dönüşür.

Bu test için VP sıvı besiyeri deney tüplerine 4 ml olacak şekilde aktarıldı. Bakteri izolatları besiyerine ekildi ve 48 saat boyunca 30 °C’de inkübe edildi. Daha sonra tüplere 600 μ l VP-I kimyasalı ve 200 μ l VP-II kimyasalı damlatıldı. Tüplerin kapakları açık bir şekilde 15-20 dakika bekletildi. Pembe-kırmızı arası renk oluşumunun VP testi için pozitif, açık kahverengi renk oluşumunun negatif sonuç verdiği kaydedildi.

2.2.4.5. Sitrat Testi

Bazı bakteriler, eğer ortamda fermente edebilecekleri maddeler (glukoz, laktoz gibi) yoksa sitrati karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler. İzolatların sitrati fermente edip etmediklerinin belirlenmesi için, Simmon’s sitrat besiyeri kullanılarak slant hazırlandı. Bakteriyal izolatlardan slantlara ekim yapıldı ve 48-72 saat boyunca 30 °C’de, inkübe edildi. Daha sonar besiyerinde bulunan %0,2’lik Bromo timol mavisi sebebiyle besiyerinin renginin yeşilden maviye dönmesi pozitif sonuç olarak kaydedildi.

2.2.4.6. Üre Hidroliz Testi

Bu test, üreyi hidrolizleyen bakterilerin üreaz enzim varlığını tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Üreaz enzimine sahip olan bakteriler bu enzimi kullanarak üreyi parçaladığında karbondioksit ve amonyak oluşturur. Meydana gelen ürünler ortamı alkali yapar ve besiyerinin kırmızı olmasına neden olur. İzolatlar üre hidroliz besiyerine ekim yapılarak 48-72 saat boyunca 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. Eğer üreaz enzimi üretimi varsa oluşan alkali ortamdan dolayı besiyeri içindeki fenol kırmızısı besiyeri renginin koyu kırmızı olmasına neden olur. Kırmızı renk oluşumu pozitif, renk oluşmaması da negatif sonuç olarak değerlendirildi (Cappucino ve Sherman, 1992).

2.2.4.7. Hidrojen Sülfür Üretim Testi

Bu yöntem, bakterilerin tanımlanmasında hidrojen sülfür (H₂S) meydana getirip getirmediğini belirlemek için kullanılır. İzolatların H₂S üretme durumlarını gözlemlemek için Kligler Iron Agar (KIA) besiyeri ile hazırlanan slantlara ekim yapılarak 48-72 saat süresince 30 °C'de inkübasyon yapıldı. Eğer izolatlar sülfat kaynağı olarak besiyeri içersinde bulunan sodyum tiosülfattan H₂S üretirse, oluşan H₂S, yine besiyeri içersinde indikatör olarak bulunan demir sülfat ile reaksiyona girerek siyah bir çökelek oluşturur. İnkübasyonun sonucunda slantların alt kısmında oluşan siyahlık pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Benson, 1985).

2.2.4.8. Nişasta Hidroliz Testi

Bu test nişastanın mikroorganizmalar tarafından sentezlenen amilaz enzim aktivitesi ile parçalanmasını ortaya koymak için kullanılmaktadır. Bunun için nişasta agar besiyeri bulunan petrilere izolatlar ekilerek ve 3-7 gün boyunca 30 °C'deki inkübatörlerde bekletildi. Daha sonra petrilerin üzerinde lügol damlatılarak renk değişimleri gözlemlendi. Koyu kahverengi renk oluşumu testin pozitif, mavi renk oluşumu ise testin negatif olduğu şeklinde değerlendirildi (Benson, 1985).

2.2.4.9. API 20E Panel Test Sistemi

API 20E panel testi gram negatif bakterilerin tür seviyesinde tanımlamasında kullanılmaktadır. Bu test uygulanırken Triptik soy agar besiyerinde büyütülen bakteri kültürleri bir spatulayla alınarak API %0,85 NaCl solüsyonu içerisinde homojen bir şekilde karıştırıldı. Hazırlanan bu karışımlar API 20E panelindeki tüm kuyucuklara dolduruldu. Bu aşamada kuyucuk içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir. API panelleri 18-24 saat boyunca inkübe edildi. Panellerdeki sonuçlar Tablo 2’de açıklandığı gibi renk değişimi okuma tablosuna göre değerlendirildi. Son olarak elde edilen sonuçlar bilgisayarda API tanımlama programı kullanılarak elde edildi.

Tablo 2. API 20E panel test siteminde değerlendirilen testler.

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

2.2.4.10. Bakteri İzolatlarının Seçici ve Ayırt Edici Besiyerilerinde Büyütülmesi

MacConkey agar (MCA), mannitol salt agar (MSA) ve eozin metilen blue (EMB) gibi bazı besiyeriler hem seçici hem de ayırt edici maddeler içerdiklerinden her iki amaç için de kullanılabilir.

İzole edilen bakterilerin MCA besiyerine ekilerek laktoz fermentasyonu araştırıldı. Buna ek olarak bu besiyeride bulunan bile tuzu ve kristal viyoleto boyası Gram (+) bakterilerin büyümesini engellediği için izolatların gram özelliklerinin de kontrolü sağlanmış oldu. Besiyerindeki değişimler 24-48 saat sonunda gözlenerek kaydedildi. Kırmızı-pembe renkli koloniler pozitif sonuç olarak kabul edildi.

Mannitol salt agar, Stafilocok bakterilerinin tanımlanması için tercih edilen bir seçici besiyeridir. MSA besiyerine yapılan ekimlerde izolatların mannitol fermentasyonları ve tuz toleransları 24-48 saat sonunda incelenerek kaydedildi. Besiyeri bileşimindeki yüksek tuz konsantrasyonu diğer bakterilerin gelişimini baskılar. Test sonucunda ekim yapılan besiyerinde büyüyen bakterilerin çevresinde sarı bir zon görünümünde büyük parlak sarı koloniler stafilocok olarak kaydedilir.

EMB besiyeri içindeki boyalar, başta Gram (+) bakteriler olmak üzere diğer bakterilerin gelişimini baskılar. Test sonucunda yeşilimsi metalik parlak görülen koloniler *E. coli* 'yi, pembe-menekşe renkli, mukoid, gri kahverengi merkezli koloniler Enterobacter, *Klebsiella* ve diğer koliformları gösterir.

2.2.4.11. Hareketlilik Testi

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılan rutin testler arasında hareket testi de yer almaktadır. Bu test ampullerde API M Medium marka besiyerinde yapıldı. Ampuller sıcak suda bekletilerek besiyerinin sıvılaşması sağlandı. Daha sonra dik konumda oda sıcaklığında besiyerilerin donması için bekletildi. Bu şekilde besiyerilerin yüzeyi pürüz olmayacak şekilde elde edildi. İğne uçlu öze kullanılarak bakteriler besiyeriler üzerine ekildi ve 30 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hareketli izolatlar inoküle edildikleri bölgede hareket ettiği için besiyerinin bulanık hale gelmesine neden olduğundan pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.5. Bakteri İzolatlarının Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.5.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA'nın izolasyonu, Sambrook vd., (1989)'nin çalışmaları baz alınarak gerçekleştirildi. Bakteriler bir gün önceden 3 ml Leura-Bertani (LB)'ye ekim yapılarak 30 °C'de büyütüldükten sonra ependorf tüplere aktarılarak 13.000 rpm'de 3-4 dakika çöktürüldü. Santrifüjden sonra süpernatant atılarak pellet 500 µl TE tamponu ile çözüldü. Çözülen pellet üzerinde 10 mg lizozim ilave edilerek 37 °C'de 1 saat bekletildi. Tüplere 50 µl %10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenerek hücrelerdeki proteinlerin parçalanması için 37 °C'de 30 dakika bekletildi. Devamında hücrelerin parçalanması için tüplere 55 µl 3 M'lık sodyum asetat ilave edilerek 65 °C'de 30 dakika boyunca karıştırıldı. Sürenin sonunda tüplere 500 µl fenol-kloroform-izoamil alkol eklendi, alt üst edilerek karışması sağlandı ve 14.000 rpm'de 4 dakika çöktürme işlemi yapıldı. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan şeffaf kısım dikkatli bir şekilde alındı ve temiz tüplere aktarıldı. Bu tüplerin üzerine 500 µl kloroform aktarılarak tekrar alt üst edildi ve 14.000 rpm'de 4 dakika santrifüj yapıldı. Üst faz alınarak temiz tüplere aktarıldı ve üzerine 55 µl 3 M'lık sodyum asetat ve 1000 µl %96'luk etil alkol eklendi. Tüpler – 20 °C'de 45 dakika boyunca saklandı. Bu işlemden sonra 13.000 rpm'de 15 dakika boyunca çöktürme yapıldı ve süpernatant atıldı. Pellet 500 µl alkol ile çözülerek tekrar 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı. Üst faz uzaklaştırılarak pellet bulunan tüplerin kapakları açık şekilde kuruması sağlandı. Daha sonra 50-100 µl steril TE tamponunda çözülerek +4 °C'de kullanılmaya kadar saklandı.

2.2.5.2. 16S rDNA Geninin PCR ile Çoğaltılması

Her izolata ait genomik DNA'dan UNI16S-L (5'- ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') ileri ve UNI16S-R (5'ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3') geri primerleri ile 16S rRNA gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) hazırlanarak çoğaltıldı. Kullanılan PCR reaksiyonunda Go Taq Polimeraz enzimi (Promega) kullanıldı. Reaksiyon 50 µl son hacim olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı;

- 12 ng kalıp DNA,
- 5 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl),
- 1,5 mM MgCl₂,
- 0,5 u Taq DNA polimeraz,
- 0,25 mM ileri primeri,
- 0,25 mM geri primeri,
- 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP,
- Steril saf su ile 50 µl son hacim olacak şekilde reaksiyon karışımı elde edildi

Hazırlanan PCR karışımı 200 µl'lik tüplerde Bio-Rad Thermal Cycler cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyon şartları aşağıdaki gibi hazırlandı;

- 95 °C'de 2 dakika (başlangıç denatürasyon),
 - 94 °C'de 1 dakika (denatürasyon),
 - 56 °C'de 1 dakika (bağlanma),
 - 72 °C'de 2 dakika (uzama),
 - 72 °C'de 5 dakika (son uzama)
- } 36 döngü

PCR işlemi tamamlandıktan sonra, PCR ile çoğaltılan 16S rDNA ürünleri, %1'lik agaroz jelde uygun markır kullanılarak yürütüldü ve jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile DNA bantları gözlemlendi.

2.2.5.3. 16S rDNA Gen Bölgesinin Vektöre Klonlanması

Çoğaltılan 16S rDNA gen bölgeleri pGEM-T Easy Vector System (Promega) kullanılarak klonlandı. Klonlama doğrulandıktan sonra örneklerin DNA dizi analizi Macrogen (Hollanda) firması tarafından yapıldı. Gelen dizilerdeki vektöre ait nükleotidler primerlerden itibaren atıldı. Elde edilen temiz sekans verileri GenBank (NCBI) verileri ile karşılaştırılarak benzerlik oranları belirlendi. Daha sonra bu gen bölgesine ait filogenetik analiz BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999) ve MEGA 7 (Tamura vd., 2007) programları kullanılarak gerçekleştirildi. Filogenetik analiz, Gram (+) ve Gram (-) bakteriler için

GenBank (NCBI) verileri kullanılarak Neighbor Joining metodu ile 1000 tekrarlı olarak uygulandı. Filogenetik ağaç çiziminde kullanılan referans türler Tablo 3’te gösterildi.

Tablo 3. Filogenetik analizde kullanılan referans türler.

Bakteri Adı	Acc. No. 16S rDNA
<i>Staphylococcus xylosus</i>	MK015831
<i>Staphylococcus edaphicus</i>	MN061019
<i>Staphylococcus kloosii</i>	JQ660155
<i>Bacillus</i> sp.	JX067679
<i>Bacillus</i> sp.	MK120036
<i>Bacillus</i> sp.	MK758082
<i>Bacillus pumilus</i>	JN887464
<i>Bacillus pumilus</i>	MF692772
<i>Bacillus altitudinis</i>	KY820043
<i>Bacillus cereus</i>	MH475925
<i>Bacillus thuringiensis</i>	MG384803
<i>Pseudomonas putida</i>	MF838696
<i>Pseudomonas putida</i>	EF682071
<i>Pseudomonas monteilii</i>	NR_114224
<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ198147
<i>Streptococcus mitis</i>	AB68354

2.3. İnsektisidal Aktivite Testleri

2.3.1. *A. obtectus*'un Laboratuvarında Yetiştirilmesi

Bakteriyel izolatların *A. obtectus* erginleri üzerindeki biyolojik aktivitesinin belirlenmesi için laboratuvarında fasulye tohumları kullanılarak yetiştirilen *A. obtectus* böceği kullanıldı.

Fasulye Tohum Böceği laboratuvarında uygun koşullarda (25 ± 1 °C sıcaklık, %60 nem) fasulye tohumlarında yetiştirildi. Deneme öncesinde sağlıklı bireyler seçilerek uygun kaplarda muhafaza edildi.

2.3.2. Bakteri İzolatlarının Hazırlanışı

A. obtectus'tan izole edilen ve tanımlanan kültüre edilebilir bakteri izolatları 5 ml nütrient sıvı besiyerinde 24-48 saat, 30 °C'deki sallayıcı etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda bakterinin konsantrasyonunu belirlemek için spektrofotometre kullanılarak OD₆₀₀'de ölçüldü. Her bir izolat OD₆₀₀'de 1,89 ($1,8 \times 10^9$ bakteri/ml) yoğunluk elde edilecek şekilde seyreltilti. İstenilen yoğunlukta bakteriler elde edildikten sonra 3000 ×g'de 10 dakika santrifüj yapılarak hücrelerin çökmesi sağlandı. Pellet 5 ml steril PBS'de çözüldü (Ben-Dov vd., 1995).

2.3.3. Bakteriyel izolatların İnsektisidal Aktivite Çalışmaları

A. obtectus erginleri üzerinde test edilecek bakteriler OD₆₀₀'de 1,89 ($1,8 \times 10^9$ bakteri/ml) yoğunlukta olacak şekilde hazırlandıktan sonra bakteriyel süspansiyonlardan 100 µl alınarak 1 gr fasulye ununa emdirildi ve oda sıcaklığında kuruması sağlandı. Önceden aç bırakılmış 10 adet *A. obtectus* erginleri hazırlanan bakteri emdirilmiş un üzerine bırakıldı. Deney kapları 25 ± 1 °C'de %60 nem ortamında 10 gün boyunca muhafaza edildi. Kaplar günlük olarak kontrol edilerek ölü bireyler not edildi ve ölü böcekler kaplardan uzaklaştırıldı. İnsektisidal aktivite deneyleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Ayrıca insektisidal etki çalışmalarında, KTÜ Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen *B. thuringiensis* (Mm2) Suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı (Sezen vd., 2007).

Yapılan insektisidal aktivite testlerinin sonuçları, Abbott (1925) tarafından geliştirilen Abbott fomülüne göre hesaplandı. Yöntemin formülü aşağıdaki gibidir;

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

3. BULGULAR

Fasulye Tohum Böceğın'den bakteri izolasyonu ve tanımlanmasını belirlemek ve biyolojik mücadelede bu zararlı üzerinde etkili bir entomopatojen bakteri tespit etmek amacıyla yapılan bu tez çalışmasında *A. obtectus*'tan bakteri izolasyonu yapıldı. İzole edilen 9 izolatın morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu yapıldıktan sonra *A. obtectus* üzerindeki biyolojik aktivite testleri de gerçekleştirildi.

3.1. Fasulye Tohum Böceğinden Bakteri İzolasyonu

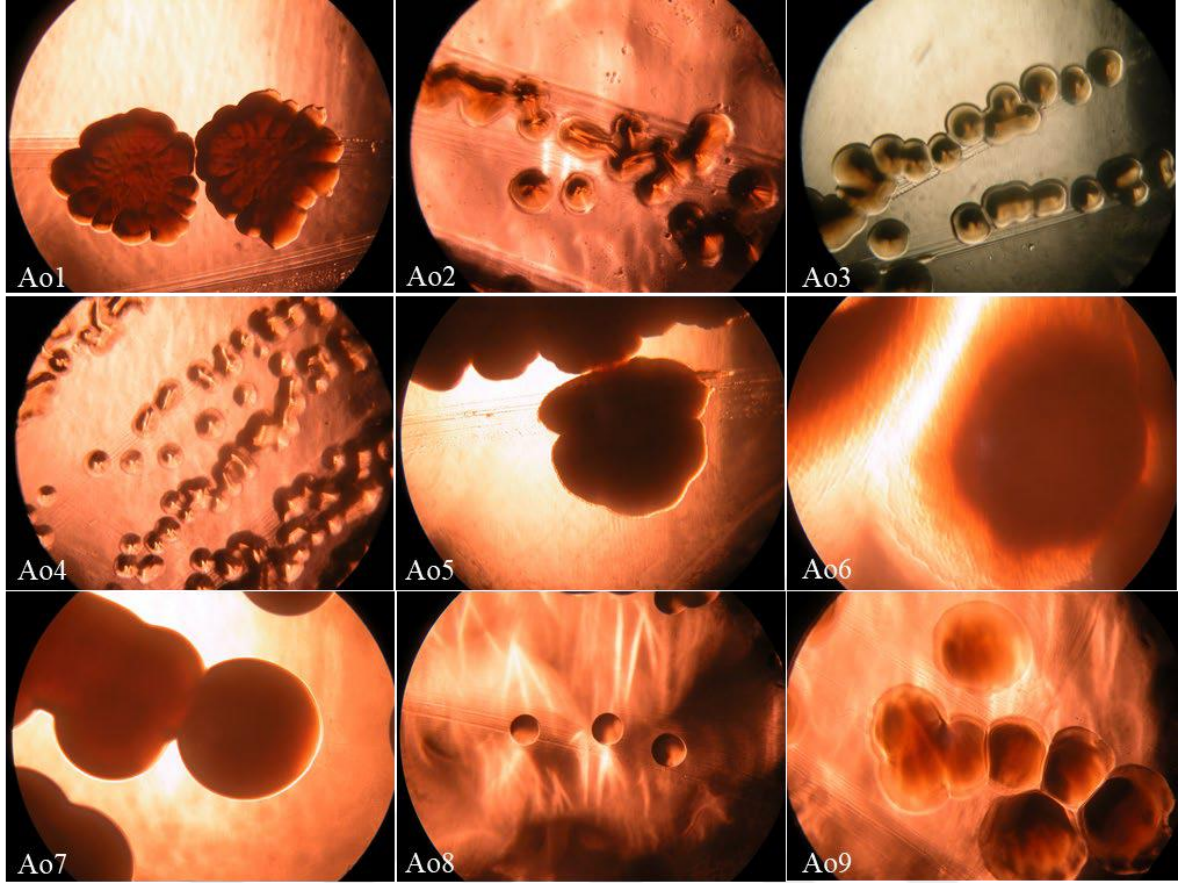
İzolasyon çalışmaları sonucunda fasulye tohum böceğinden koloni şekli, rengi ve büyüklüğü gibi farklı morfolojik özelliklerinden yararlanarak 9 tane kültüre edilebilir bakteriyel izolat elde edildi ve bu izolatlar Ao1-Ao9 şeklinde kodlandı.

3.2. Bakteri İzolatlarının Karakterizasyonu

3.2.1. Bakteriyel İzolatların Morfolojik Özellikleri

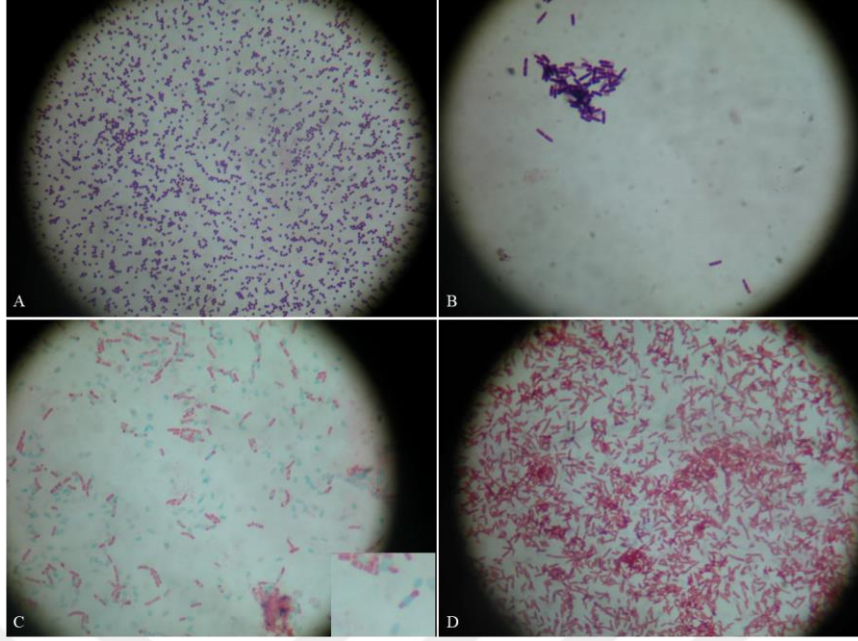
İzolatların koloni morfolojileri binoküler mikroskop altında görüntülenerek kaydedildi. Elde edilen bakteri kolonilerinin düz-yuvarlak, dalgalı-yuvarlak, girintili-çukuntılı ve dantel şeklinde, çoğunlukla krem renginde olduğu gözlemlendi. Sarı-yeşil renkte olan Ao1 izolatu dantel şeklinde koloni kenar yapısına sahipti. İzolatlardan Ao2, Ao3, Ao4, Ao7 ve Ao9'un düz- yuvarlak morfolojide olduğu belirlendi (Şekil 7) (Tablo 4).

Basit boyama sonucunda, Ao1 ve Ao2 numaralı izolatların kok, Ao3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9'un basil şeklinde olduğu belirlendi (Tablo 4).



Şekil 7. Fasulye Tohum Böceğinden izole edilen bakteri izolatlarının koloni morfolojisi görüntüleri.

Bakteri izolatlarının Gram boyama sonuçlarında Ao1, Ao2, Ao3, Ao4, Ao5, Ao8 ve Ao9'un Gram (+) olduğu, beş tanesinin spor içerdiği (Ao3, Ao4, Ao5, Ao8 ve Ao9) tespit edildi (Şekil 8) (Tablo 4). Ao6 ve Ao7 numaralı izolatların ise Gram (-) oldukları gözlemlendi. İzolatların hareket testlerine göre, Ao4, Ao6 ve Ao9 izolatları dışındaki bütün bakteriyel izolatların hareketli oldukları belirlendi.



Şekil 8. Bakteriyel izolatlara ait Gram ve endospor boyama görüntüleri. A: Gram (+) kok; B: Gram (+) basil; C: Endospor; D: Gram (-) basil.

Tablo 4. İzolatların morfolojik özellikleri.

İzolatlar	Koloni Rengi	Koloni Şekli	Gram Boyama	Spor Boyama	Hücre Şekli	Hareket
Ao1	Krem	Dal.-Gen.	+	-	Kok	+
Ao2	Krem	Düz.-Yuv.	+	-	Kok	+
Ao3	Krem	Düz.-Yuv.	+	+	Basil	+
Ao4	Krem	Düz.-Yuv.	+	+	Basil	-
Ao5	Krem	Dantel gibi	+	+	Basil	+
Ao6	Sarı-Yeşil	Düz.-Yuv.	-	-	Basil	-
Ao7	Krem	Düz.-Yuv.	-	-	Basil	+
Ao8	Krem	Düz.-Yuv.	+	+	Basil	+
Ao9	Krem	Düz.-Yuv.	+	+	Basil	-

Düz.: Düzgün, Yuv: Yuvarlak, Dal: Dalgalı,

3.2.2. Bakteriyel İzolatların Biyokimyasal Özellikleri

Bakteri sistematigi açısından önemli olan, bazı enzimlerin üretilip üretilmemesi ve bazı organik maddelerin fermente edilip edilmediği gibi birtakım özellikler bakterilerin tanımlanmasında tercih edilen özelliklerdir. Bu tez çalışmasında bakterilerin bu gibi özelliklere sahip olup olmadıklarını belirlemek için katalaz, oksidaz, indol, sitrat ve üre gibi testler yapıldı (Tablo 5).

Katalaz testi sonucunda Ao3, Ao6 ve Ao7 numaralı izolatların katalaz enzimi üretmediği, diğer izolatların ise bu enzimi ürettiği belirlendi (Tablo 5). Yapılan oksidaz testinde Ao6, Ao7 ve Ao8 izolatlarının pozitif sonuç verdiği gözlemlendi. İndol testi ve H₂S üretimi testleri sonucunda bütün izolatların negatif sonuç verdiği tespit edildi. Diğer biyokimyasal testler olan sitrat ve nişasta testinde ise sadece Ao6 izolatının pozitif sonuç verdiği belirlendi. Üre testinde ise Ao1, Ao2 ve Ao8 numaralı izolatların üreyi hidroliz edebildiği görüldü (Tablo 5).

İzolatların glukoz metabolizması sonucu ürettikleri son ürünlerin niteliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan VP testi sonucunda izolatlardan Ao2, Ao4, Ao5 ve Ao9'un yüksek miktarda organik asit ürettiği gözlemlendi (Tablo 5).

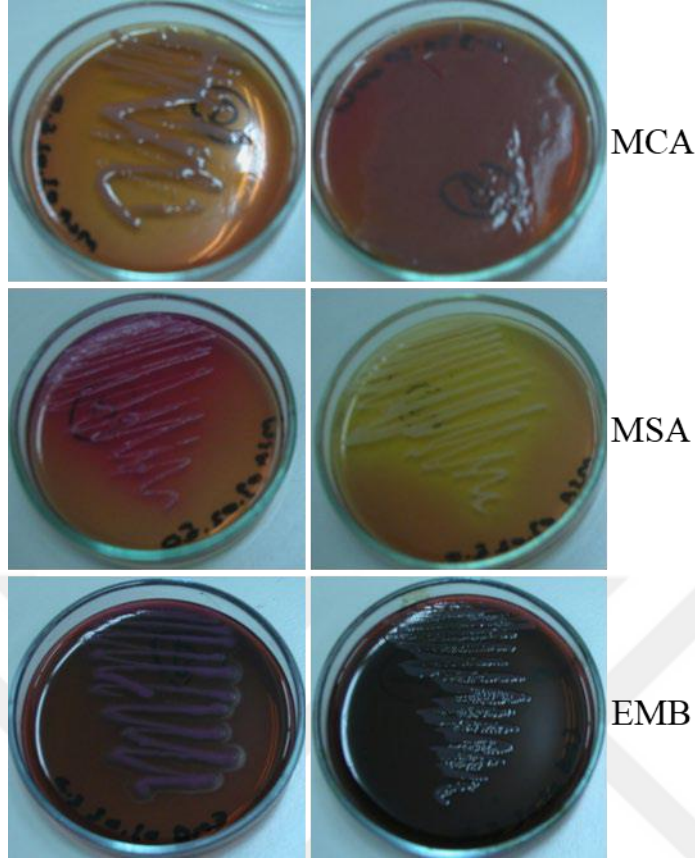
Tablo 5. İzolatların biyokimyasal özellikleri.

İzolatlar	Biyokimyasal Özellikler							
	Katalaz Testi	Oksidaz Testi	İndol Testi	VP Testi	Sitrat Testi	Üre Testi	H ₂ S Testi	Nişasta Testi
Ao1	+	-	-	-	-	+	-	-
Ao2	+	-	-	+	-	+	-	-
Ao3	-	-	-	-	-	-	-	-
Ao4	+	-	-	+	-	-	-	-
Ao5	+	-	-	+	-	-	-	-
Ao6	-	+	-	-	+	-	-	+
Ao7	-	+	-	-	-	-	-	-
Ao8	+	+	-	-	-	+	-	-
Ao9	+	-	-	+	-	-	-	-

+: pozitif sonuç, -: negatif sonuç

3.2.3. Bakteri İzolatlarının Seçici ve Ayırt Edici Besiyerlerinde Büyüme Özellikleri

Seçici ve ayırt edici besiyerler kullanılarak, izole edilen bakterilerin özelliklerinin belirlendiği bu çalışma ile yapılan diğer tanımlamalar desteklenmiş oldu. MCA besiyerinde Ao6, Ao7 ve Ao8'in pozitif sonuç verdiği tespit edildi (Şekil 9). MSA besiyerine yapılan ekim sonucunda Ao1 ve Ao2 numaralı izolatların koloni oluşturduğu ve EMB besiyerinde büyüyen Ao6 ve Ao7 izolatlarının ise renksiz koloni oluşturduğu görüldü.



Şekil 9. Seçici ve ayırt edici besiyerilerde bakterilerin görüntüsü.

3.2.4. API 20E Panel Test Sistemiyle Tespit Edilen Özellikler

Bakteri izolatlarının API 20E test panellerine yapılan ekimlerin sonuçlarına bakıldığında bazı test kuyucuklarında bariz bir şekilde renk değişimi gözlenirken, bazılarında ise ayıraç (TDA, JAMES, VP1-VP2, NIT1-NIT2) ilavesi ile renk değişimleri gözlemlendi (Tablo 6). Bakteri izolatları arasında Ao8'in yapılan API 20E testlerinde sonuç alınamadı. API 20E kapsamındaki testlerde beta-galaktosidaz Ao1, Ao4 ve Ao9 izolatlarında pozitif sonuç verirken, sitrat testinde Ao6 ve Ao7, üre testinde Ao1 ve Ao2, aseton aktivite testinde Ao2, Ao4, Ao5 ve Ao9'un pozitif sonuç verdiği görüldü. H₂S testinde ise tüm sonuçlar negatif olarak belirlendi. Fermentasyon/oksidasyon testlerine genel olarak bakıldığında Ao1, Ao3 ve Ao6'nın pozitif sonuçlarının diğerlerine göre daha fazla olduğu tespit edildi (Tablo 6).

Tablo 6. İzolatların API 20E panel test sistemi ile belirlenen özellikleri.

Testler	Substrat	Aktivite	Ao1	Ao2	Ao3	Ao4	Ao5	Ao6	Ao7	Ao8	Ao9
ONPG	ONPG	Beta-galaktosidaz	+	-	-	+	-	-	-	NA	+
ADH	Arginin	Arginin dihidrolaz	-	-	-	-	+	+	+	NA	-
LDC	Lizin	Lisin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	-	NA	-
ODC	Ornitin	Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	-	NA	-
CIT	Sitrat	Sitrat kullanımı	-	-	-	-	-	+	+	NA	-
H ₂ S	Na tiyosülfat	H ₂ S üretimi	-	-	-	-	-	-	-	NA	-
URE	Üre	Üre hidrolizi	+	+	-	-	-	-	-	NA	-
TDA	Triptofan	Deaminaz	-	-	-	-	-	-	-	NA	-
IND	Triptofan	İndol üretimi	-	-	-	-	-	-	-	NA	-
VP	Na pirüvat	Aseton üretimi	-	+	-	+	+	-	-	NA	+
GEL	Kömür jelatin	Jelatinaz	-	-	-	+	+	-	-	NA	+
GLU	Glukoz	Fermantasyon / oksidasyon	+	+	-	-	-	+	+	NA	-
MAN	Mannitol	Fermantasyon / oksidasyon	+	-	+	-	-	-	-	NA	+

Tablo 6'nın devamı

Testler	Substrat	Aktivite	Ao1	Ao2	Ao3	Ao4	Ao5	Ao6	Ao7	Ao8	Ao9
INO	İnositol	Fermantasyon / oksidasyon	+	-	+	-	-	+	-	NA	-
SOR	Sorbitol	Fermantasyon / oksidasyon	+	-	+	-	-	+	-	NA	-
RHA	Ramnoz	Fermantasyon / oksidasyon	+	-	+	-	-	+	+	NA	-
SAC	Sukroz	Fermantasyon / oksidasyon	+	-	+	-	-	-	-	NA	-
MEL	Melibioz	Fermantasyon / oksidasyon	+	-	+	-	-	+	-	NA	-
AMY	Amigdalın	Fermantasyon / oksidasyon	-	-	-	-	-	-	-	NA	-
ARA	Arabinoz	Fermantasyon / oksidasyon	+	-	+	-	-	+	+	NA	-
NO ₂	Potasyum nitrat	NO ₂ üretimi	+	-	+	+	+	-	-	NA	+
N ₂	Potasyum nitrat	N ₂ gazına indirgeme	NA	-	NA	NA	+	-	-	NA	+

+ : Pozitif sonuç, - : Negatif sonuç, NA :

3.2.5. İzolatların Moleküler Karakterizasyonu

3.2.5.1. İzolatların 16S rDNA Gen Sıraları

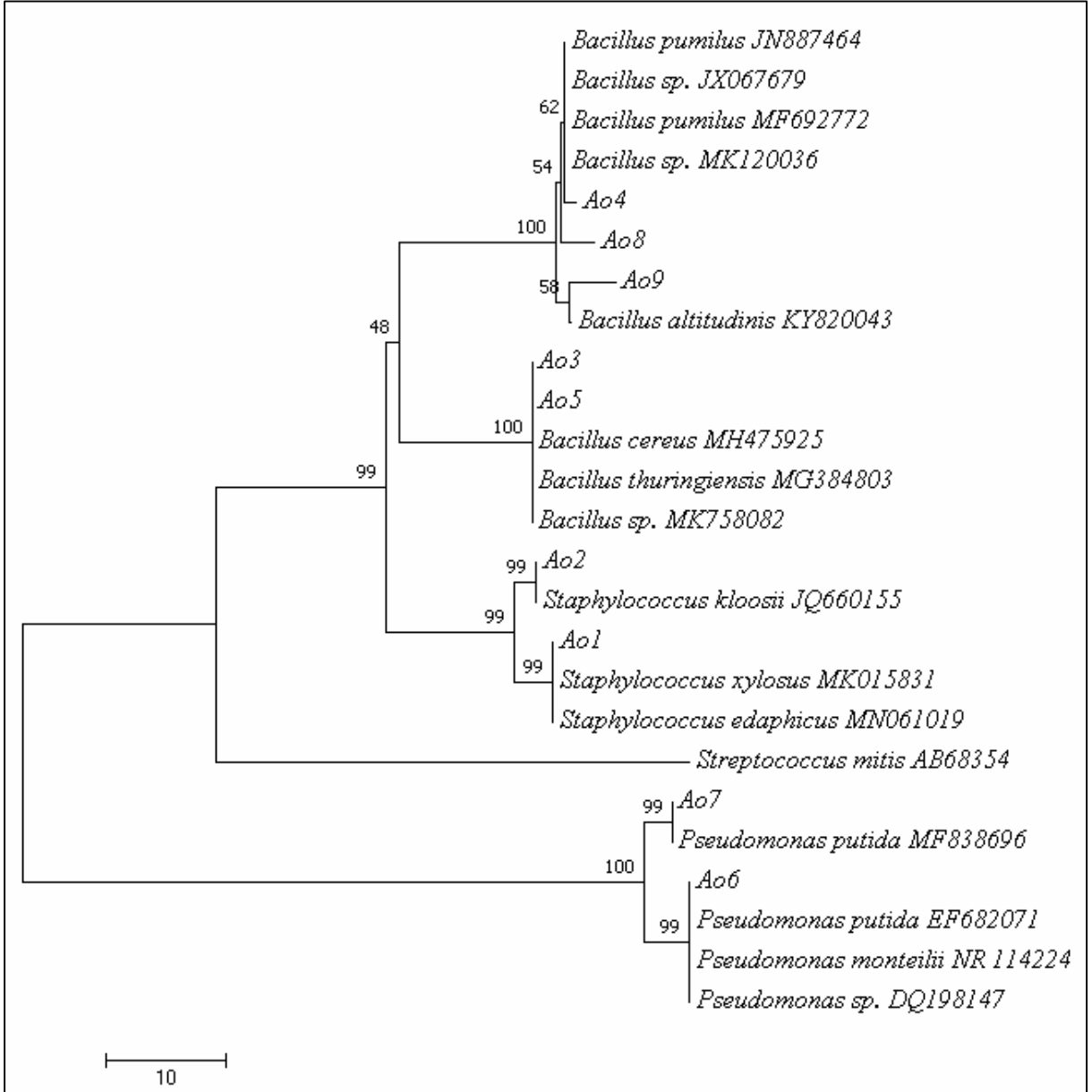
Bakteriyel sistematik çalışmalarında, 16S rDNA genlerine ait baz sıralarının belirlenmesi dikkat çeken moleküler çalışmalardan biridir. Bu doğrultuda öncelikli olarak morfolojik ve biyokimyasal testler sonucunda benzerlikleri olan bakteriler çalışmadan elendi. Geriye kalan birbirinden farklı oldukları düşünülen izolatların 16S rDNA gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldı ve klonlandı. Vektöre ait gereksiz sıralar ayıklandı ve sekans analizleri sonucunda elde edilen dizilerden GenBank (NCBI)'taki dizilerle karşılaştırılması sonucunda en yüksek benzerlik bulunan referans türler belirlendi (Tablo 7). Blast sonucunda benzer olan türler ve referans türlerin 16S rRNA dizileri alınarak yapılan filogenetik analizleri sonucunda Ao1 izolatının *S. xylosus*, Ao2'nin *S. kloosii* izolatlarına yakın dallanma gösterdiği görüldü (Şekil 10). Ao6 ve Ao7'nin *Pseudomonas* cinsleri ile yakın ilişkili olduğu tespit edildi. Ao5 izolatının *B. thuringiensis* ile ilişkili olduğu ve diğer izolatların ise *Bacillus* cinsine ait türlerle ilişkili olduğu belirlendi.

Tablo 7. İzolatların 16S rDNA sekanslarının gen bankasındaki sıralarla karşılaştırmaları.

İzolat	Tür ve Cinsler	Benzerlik Oranı (%)	Kayıt Numarası
Ao1	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.80	MF678916.1
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.80	MH394433.1
	<i>Staphylococcus edaphicus</i>	99.80	MN061019.1
Ao2	<i>Staphylococcus kloosii</i>	98.99	JQ660155.1
	<i>Staphylococcus kloosii</i>	98.99	CP027846.1
	<i>Staphylococcus kloosii</i>	98.99	JQ660231.1
Ao3	<i>Bacillus cereus</i>	99.31	CP029454.1
	<i>Bacillus sp.</i>	99.31	MK758082.1
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.31	MG384803.1
Ao4	<i>Bacillus sp.</i>	99.50	FJ227512.1
	<i>Bacillus sp.</i>	99.50	JX067679.1
	<i>Bacillus pumilus</i>	99.50	JN887464.1
Ao5	<i>Bacillus cereus</i>	99.36	MH475925.1
	<i>Bacillus cereus</i>	99.36	CP034551.1
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.36	MK517632.1

Tablo 7'nin devamı

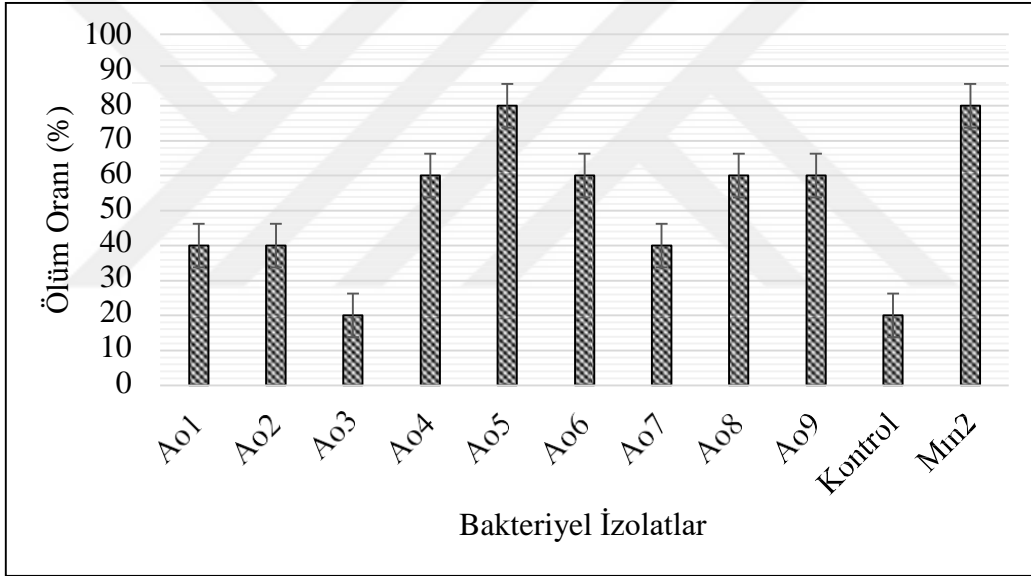
Ao6	<i>Pseudomonas putida</i>	99.69	EF682071.1
	<i>Pseudomonas sp.</i>	99.69	DQ198147.1
	<i>Pseudomonas monteilii</i>	99.59	NR_114224.1
Ao7	<i>Pseudomonas putida</i>	99.40	AP015029.1
	<i>Pseudomonas putida</i>	99.30	MF838696.1
	<i>Pseudomonas putida</i>	99.30	MF838695.1
Ao8	<i>Bacillus pumilus</i>	98.89	MF692772.1
	<i>Bacillus sp.</i>	98.89	HM152736.1
	<i>Bacillus safensis</i>	98.79	MK104520.1
Ao9	<i>Bacillus altitudinis</i>	99.48	KY820043.1
	<i>Bacillus pumilus</i>	99.37	MH590633.1
	<i>Bacillus altitudinis</i>	99.37	KR063198.1



Şekil 10. İzolatların 16S rDNA dizisine göre taksonomik pozisyonunu gösteren N-J ağacı.

3.3. İnektisidal Aktivite Çalışmaları

Biyolojik aktivite çalışmaları laboratuvar kültürü haline dönüştürülmüş *A. obtectus* erginleri üzerinde laboratuvar koşullarında test edildi. Test çalışmaları sonucunda *A. obtectus*'tan izole edilen izolatlardan *B. thuringiensis* Ao5 (%80) ve *P. putida* Ao6'nın (%60) yüksek etki gösterdiği belirlendi. Ayrıca, laboratuvarımızda daha önceden izole edilen *B. thuringiensis* Mm2 izolatının da %80 ölüm oranı ile *A. obtectus* üzerinde etkili olduğu gözlemlendi. En düşük ölüm oranının ise %20 ile *Bacillus* sp. Ao3 izolatına ait olduğu belirlendi. *Staphylococcus* cinsine ait Ao1 ve Ao2 izolatları ve *Pseudomonas putida* Ao7 izolatı da %40 ölüm oranında inektisidal etki gösterdi. Kontrollerde ise %20 ölüm oranı hesaplandı (Şekil 11).



Şekil 11. Bakteriyel izolatların *A. obtectus* erginleri üzerindeki inektisidal etkisi.

4. TARTIŞMA

Günümüzde açlıkla beraber, yetersiz ve dengesiz beslenme de dünya gündeminde olan önemli sorunlardan biridir. Hızla artış gösteren dünya nüfusu ile birlikte ortaya çıkan gıda arzının sağlanması, mevcut besin rezervinin korunması, olumsuz etkenlerin ve zararlıların etkilerini ortadan kaldırma çalışmalarıyla giderilmeye çalışılmıştır. Yeryüzünde insanlığın yaşamı için elzem olan protein gereksiniminin yaklaşık %70'i bitkisel ürünlerden elde edilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde ve ülkemizde ise bu ihtiyaç %90 olarak karşımıza çıkmaktadır (Sepetoğlu 1996).

Fasulye yeryüzünde ilk sıralarda yer alan ekim alanına ve üretimine sahip olan bir tarım ürünüdür. Ülkemizde nohut ve mercimekten sonra üçüncü sırada yer alan üretim alanına sahiptir. İhtiva ettiği protein miktarı oldukça fazla olan fasulye, yüksek kalori içermektedir. Fasulye, kalp ve kanser gibi hastalıklarda önleyici olan bol miktarda antioksidan içermektedir.

Baklagillerin tarla ve saklama aşamasında ciddi ürün zararı oluşturan çeşitli böcek zararlıları bulunmaktadır. Bruchidae familyasına mensup bu türler, neden oldukları kayıplarla oldukça dikkat çekmektedir.

Tarımsal ürünler tarladan pazara geçirdikleri süreçte birçok şekilde zarara uğrayarak kayıplar vermektedir. Bu kayıplara neden olan etmenlerden biri de zararlı böceklerdir. Bu zararlıların neden olduğu kayıpları önlemek veya azaltmak için dünyada birçok araştırma yapılmış ve hala bu araştırmalar hız kesmeden devam etmektedir. Ülkemizde depo, ambar ve fabrikalarda tahıl tohumları, un, kuru meyve ve tütünde ciddi zarara neden olan zararlı böcek türleri ile ilgili morfolojik, biyolojik özellikleri ve yayılışları ile ilgili çalışmaları ilk olarak Özer (1957) gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada Özer (1957) *A. obtectus* ergin, larva ve yumurtası ile ilgili bilgi vermekte ve aynı zamanda bu türün coğrafik dağılımı, biyolojisi ve zararı hakkında da açıklamalar yapmaktadır.

Ülkemizde Orta Anadolu Bölgesi'nde tohum böceklerinin dağılımı, beslendikleri ürünleri, neden oldukları kayıplar ve yayılışı hakkında Kalkan (1972)'in yaptığı çalışmada bu böceklerin oldukça yaygın olduğunu ve ekonomik zarara neden olduğunu belirtmiştir. Buna ek olarak Baklagil Tohum Böcekleri içerisinde 10 türün Orta Anadolu'daki varlığı ve konukçuları ortaya konmuştur. Belirtilen böcekler arasında yalnızca *A. obtectus*'un

depolarda da çoğalmayı sürdürdüğü ifade edilmiştir. Fasulye Tohum Böceğinin fasulyede çimlenme gücünü yaklaşık %28 ve ağırlığı ise ortalama %18 azaltarak zarar verdiği belirlenmiştir.

Türkiye'de, 1998 yılına ait resmi olmayan verilerde depolanmış ürün zararlılarının kontrolünde yaklaşık 297ton kimyasal-pestisit kullanıldığı belirtilmiştir (Emekci vd., 2000). Bu nedenle, depolanan ürün zararlılarıyla mücadelede daha güvenli ve daha etkili bir mücadele yöntemi bulmaya ihtiyaç vardır.

Tarımsal ürünlerde ciddi boyutlarda zarara neden olan *A. obtectus* ile kültürel, mekanik ve kimyasal mücadele çalışmaları yapılmıştır. Günümüzde dünyada, insana, çevreye ve diğer canlılara zarar vermeyen ekonomik, kolay uygulanabilir bir mücadele için çalışmalar yapılmaktadır.

Artık zararlı böceklerle mücadele çalışmalarında kimyasal ilaçlara alternatif olacak biyolojik etmenler çalışılmaya başlanmıştır. Biyolojik mücadele etmeni olarak *Bacillus thuringiensis* bakteri türleri en yaygın kullanılanlardan biridir. Zararlı ile mücadelede etkili ve güvenilir biyolojik mücadele için mevcut olan ve türe ait yeni izole edilen bakterilerin özelliklerinin tanımlanması gerekmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında Türkiye’de Fasulye Tohum Böceğine karşı mücadelede kullanılabilecek bir bakteriyel izolat ya da izolatları belirleyebilmek için *A. obtectus*’tan bakteri izolasyonu ve tanımlanması gerçekleştirildi. Bakterilerin tanımlanmasında morfolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar yapıldı. Böylece elde edilen bakteri izolatlarının bu zararlının mücadelesinde kullanılabilirliği test edilip mikrobiyal bir etmen geliştirilebilmesine olanak sağlanacaktır.

Literatürdeki bilgilere bakıldığında *A. obtectus*’un bakteriyel florası ile ilgili tanımlama çalışmalarına rastlanmamıştır. Bu tez çalışması ile *A. obtectus*’tan izole edilen bakterilerin morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri ilk kez ortaya konmuş oldu. Bu bakteriler, ciddi bir zararlı olan Fasulye Tohum Böceğinin biyolojik mücadelesinde önemli materyaller olarak ileriki çalışmalarda önem taşıyacaktır.

A. obtectus’tan izole edilen 9 adet bakteri büyüme, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerine bakılarak elde edildi. Bu tez çalışmasında, tanımlamada bakterilerin tür tayininde kullanılan klasik metodların yanında artık yaygın olarak tercih edilen 16S rDNA dizin analizi ve API 20E tanımlama sistemleri de kullanıldı. Bakterilerin tür tayinleri için Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology kitabından kaynak olarak

yararlanıldı ve yapılan tanımlamalar API 20E analiz sonuçlarıyla desteklendi (Halda-Alija, 2004; Lian, 2004). Bu test sistemleri klasik yöntemlere göre daha az masrafla ve daha kısa sürede daha fazla tanımlamanın yapılabilmesi bakımından avantajlara sahiptir.

Bakterilerde moleküler tanımlamalarda en çok tercih edilen 16S rDNA genleri yüksek derecede korunmuş universal diziler içermektedir (Woese, 1990). Bu genler kullanılarak bakteriler arasındaki yakınlık derecelerinin belirlenmesinde ve bakterilerin tür ya da cins düzeyinde tanımlanmasında son yıllarda oldukça önem kazanmıştır (Sacchi vd, 2002). Bütün bakterilerin tanımlanmasında 16S rDNA gen analizi kullanılacak önemli bir yöntemdir. Klasik yöntemlerin aksine hızlı ve tanımlama doğruluğunun yüksek olması bu tanımlama yönteminin önemli avantajlarıdır (Springer vd., 1996).

Yapılan morfolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar sonucunda Ao1 ve Ao2 izolatlarının *Staphylococcus* cinsine ait türler oldukları belirlendi. Ao1 izolatu *S. xylosus*, Ao2 izolatu ise *S. kloosii* olarak tanımlandı. Bu zamana kadar, *Staphylococcus* cinsinin farklı türleri, farklı takımlara ait (Coleoptera, Lepitoptera, Diptera ve Homoptera gibi) farklı böceklerden izole edilmiştir (Kuzina vd., 2001; Danışmazoğlu vd., 2012; Sevim vd., 2012; Özkan-Çakıcı vd., 2012; Demirci vd., 2013). Bununla birlikte, *Staphylococcus* türlerinin böcek patojenleri olduğuna dair bir çalışma yoktur.

Bacillus cinsine ait entomopatojen bakteriler, dünya çapında birçok böcek zararlılarının biyolojik mücadelesinde kullanılan doğal etmenlerdir (Hajek, 2004). Bu tez çalışmasında, *A. obtectus*'tan izole edilen 9 bakteriyel izolattan 5 tanesinin *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlendi. Bunlardan Ao3'in *B. cereus*, Ao5'in *B. thuringiensis*, Ao4'ün *Bacillus* sp., Ao8'in *B. pumilus* ve Ao9'un ise *B. altitudinis* olduğu tespit edildi.

Bu cins içinde, *B. pumilus* bir Gram pozitif, aerobik, toprakta yaygın olarak bulunabilen spor oluşturabilen basil formunda bir bakteridir (Priest, 1993). Bu bakteri aynı zamanda birçok böcek türünden izole edilmiştir ve böceklere karşı patojenik etkileri olduğu gösterilmiştir (Molina vd., 2010; Sreerag vd., 2014). Böceklerin doğal düşmanları düşünüldüğünde bütün mikroorganizmalar arasında, *B. thuringiensis* önemli bir yer tutmaktadır. *B. thuringiensis* Gram (+), spor oluşturan ve farklı habitatlarda yaşayabilen bir bakteridir (Heimpel, 1967; Goldberg ve Margalit, 1977; Martin ve Travers, 1989; Smith ve Couche, 1991; Meadows vd., 1992). Bu bakteri yakın ilişki içerisinde bulunduğu bakterilerden spor oluşumu esnasında ürettiği kristal yapıları sayesinde ayrılmaktadır. *B. thuringiensis* oldukça yaygın olan bir böcek patojenidir ve bu bakteri doğal mücadelede

oldukça önemli bir konumdadır (Lacey vd., 2001). Dünyadaki biyopestisit satışlarının %95'ini *B. thuringiensis* kökenli ürünler oluşturmaktadır (Gaugler, 1997).

Birçok bilim insanı, *Pseudomonas* cinsine ait bakterileri çeşitli böceklerden izole etmiştir (Lipa ve Wiland, 1972; Sezen ve Demirbağ, 1999; Sezen vd., 2004, 2005; Muratoğlu vd., 2011). *P. aeruginosa* çeşitli zararlılardan izole edilerek tanımlanmıştır (Osborn vd., 2002). *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* ve *P. chlororaphis* gibi bazı *Pseudomonas* türleri önemli böcek patojenleridir (Bucher, 1981, Sezen ve Demirbağ, 1999; Osborn vd., 2002). *P. putida* izolatlarının çoğu, bir böcek patojeni olarak önemsiz görünse de *P. putida*'nın patojenik olduğu çalışmalar da mevcuttur (Schneider ve Dorn, 2001; Muratoğlu vd., 2011). Tez çalışmamızda Ao6 ve Ao7 izolatlarının *Pseudomonas* cinsine ait olduğu tespit edildi. Bu izolatların morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri birlikte incelendiğinde *P. putida* olduğu belirlendi. *P. putida* dünyada toprak ve tatlı su ortamlarında yaşayan çok yaygın bir bakteri türüdür. Türler arasında farklı metabolik özelliklere sahip olan ve oldukça etkili enfeksiyonlara sebebiyet veren saprofitik bir toprak bakterisidir (Chen vd., 2005).

Depolanan ürün zararlılarının kontrolü, fiziksel, etkisiz toz, iyonize ışınlama, ışık ve ses, termal kontrol, ozonlama, fümigasyon, semiyokimyasallar ve bazı kovucular gibi birçok strateji kullanılarak gerçekleştirilmektedir (El-Aziz, 2011). Ayrıca, organofosfatlı pestisitler grubu gibi kimyasal böcek ilaçları, toplu olarak depolanan ürünleri korumak için depolama zararlılarına karşı kullanılmaktadır (Wakefield, 2006). Ancak, bu kimyasalların insan sağlığı ve çevreye istenmeyen etkileri vardır. Bu nedenle, bu böcek zararlılarının biyolojik kontrolü, geleneksel ve kimyasal kontrol yöntemlerine ilginç bir alternatif olarak kabul edilmektedir. Biyolojik mücadele çalışmalarında funguslar oldukça dikkat çekmektedir. Yapılan birçok araştırma fungusların *A. obtectus* üzerinde etkili olduğunu göstermiştir (Kuberappa ve Jayaramaiah, 1987; Rodrigues ve Pratissoli, 1990; Bello vd., 2006; Draganova ve Staneva, 2008; Sevim vd., 2015; Ondrackova, 2015). Fungus dışında bu zararlı üzerinde bakteri uygulanarak insektisidal aktivite çalışması ülkemizde yapılmıştır. Ülkemizde Sevim vd. (2015)'nin yaptığı çalışmada iki *Staphylococcus* türünün (*Staphylococcus* sp. Fbe-6 ve *Staphylococcus kloosii* Fbe-10) laboratuvar koşullarında *A. obtectus*'a karşı önemli derecede (%73) etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu, bazı *Staphylococcus* türlerinin entomopatojen olabileceğini düşündürse de bunu kanıtlamak için

kesinlikle daha ayrıntılı biyolojik tahlillere ihtiyaç duyulmaktadır (Sevim vd., 2015). Bu tez çalışmasında *S. xylosus* Ao1 ve *S. kloosii* Ao2 izolatları %40 ölüm oranı gösterirken, *B. thuringiensis* Ao5 izolatu ve Kontrol Mm2 izolatu %80 ölüm oranı gösterdi. Bu sonuç *A. obtectus*'un mücadelesinde *B. thuringiensis* bakteriyel suşlarının da etkili bir şekilde kullanılabileceğini göstermiş oldu.

Ek olarak, son zamanlarda bitki kaynaklı ürünlerle zararlılara karşı mücadele ile ilgili ülkemizde ve dünyada çalışmalar artmaktadır (Civelek ve Weintraub, 2004; Yanar ve Düzdemir, 2012; Bensaci vd., 2013; Civelek ve Kaban 2016),

Bu çalışma kapsamında *A. obtectus* zararlısı üzerinde yüksek öldürücü etkiye sahip olan *B. thuringiensis*'in bu zararlıya karşı kullanılabilme potansiyelinin olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda, dünyada ve ülkemizde fasulye tohumunda ciddi zararlara neden olan *Acanthoscelides obtectus*'dan 9 bakteriyel izolat elde edildi. Elde edilen bu izolatların morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlenerek *A. obtectus* üzerindeki biyolojik aktivite testleri gerçekleştirildi. Çalışmada elde edilen sonuçlar:

- 1) İzole edilen bakterilerin tanımlamaları sonucunda 2 tanesinin *Staphylococcus*, 2 tanesinin *Pseudomonas* ve 5'inin ise *Bacillus* cinsine ait olduğu tespit edildi.
- 2) Ao1'in *Staphylococcus xylosus*, Ao2'nin ise *S. kloosii* olduğu belirlendi.
- 3) Ao6 ve Ao7'nin ise *P. putida* olduğu tespit edildi.
- 4) *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenen Ao3 *B. cereus*, Ao5 *B. thuringiensis*, Ao4 *Bacillus* sp., Ao8 *B. pumilus* ve Ao9 ise *B. altitudinis* olarak değerlendirildi.
- 5) *A. obtectus* üzerinde *B. thuringiensis* Ao5 ve *B. thuringiensis* Mm2 izolatlarının yüksek etki gösterdiği belirlendi.
- 6) Bu çalışma ile literatürde *A. obtectus*'a ait bakteriyel izolasyonun belirlenmesi ve tanımlama çalışmaları ayrıntılı olarak gerçekleştirildi.
- 7) *B. thuringiensis*'in bu zararlının mücadelesinde önemli bir potansiyele sahip olabileceği ortaya kondu.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, *Acanthoscelides obtectus*'dan 9 bakteriyel izolat elde edildi ve bunların tanımlamaları yapıldı. Çalışmada ulaşılan sonuçlardan hareketle, gelecek çalışmalara yönelik olarak aşağıdaki hususlar belirlenmiştir.

- 1) Elde edilen izolatların, başka depolanabilir tarım ürünleri üzerinde zarar oluşturan böcekler üzerindeki insektisidal etkileri araştırılabilir.
- 2) Elde edilen *Bacillus thuringiensis* izolatlarının cry toksin protein içeriği belirlenebilir. *cry1*, *cry2*, *cry3* ve *cry4* genlerinin alt türleri tespit edilebilir.
- 3) İnsektisidal aktivite testleri yapılırken zararlı böcek larvalarına sadece tek bir doz uygulandı. Doz denemeleri yapılabilir.
- 4) Labaratuvar koşullarında sağlanan yüksek öldürme oranı, alan uygulamalarıyla depo koşullarında denenebilir.
- 5) Farklı özelliklerdeki mikrobiyal etmenlerin (virüs, fungus, protozoa ve nematod gibi) zararlı üzerindeki etkileri belirlenebilir.
- 6) Yüksek öldürücü etkiye sahip olan izolatların mikrobiyal mücadele preparatına dönüştürme çalışmaları başlatılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, W. S., 1925. A Method of Computing of Effectiveness of on Insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265–267.
- Atak, E.D., 1975. Fasulye tohum böceği (*Acanthoscelides obtectus* Say)'nin biyoekolojisi ve mücadelesi üzerinle araştırmalar. T.C. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai karantina Genel Müdürlüğü Araştırma Eserleri Serisi, Teknik Bülten 7, İstanbul, 64.
- Aydoğan, M., Demiryürek, K. ve Abac, N. İ., 2015. Türkiye’de Kuru Fasulye Üretimini Mevcut Durumu ve Gelecek Dönemler Üretimini Tahmin Edilmesi. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3, 12, 962-968.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Khameraev, 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*, Appl. Environ. Microbiol. 63, 4883-4890.
- Bensaci, O.A., Lombarkia, N. ve Laib, D.E., 2013. Initial evaluation of endophytic fungi, isolated from *Nerium oleander* L. for their biocontrol action against the bruchid *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) in Algeria, Editörler: Schneider, C., Leifert, C., Feldmann, F., Endophytes for plant protection: the state of the art, Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, 162-167.
- Benson, H.J., 1985. Microbiological Applications, a Laboratory Manuel in General Microbiology, Brock, Brown Publishers, Dubuque, Iowa.
- Berger, A., Degenkolb, T., Vilcinskas, A. ve Schöller, M. 2017. Evaluating the combination of a parasitoid and a predator for biological control of seed beetles (Chrysomelidae: Bruchinae) in stored beans, J. Stor. Pro. Res., 74, 22-26.
- Bravo, A., Gill, S.S. ve Soberon, M., 2007. Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt Toxins and Their Potential for Insect Control, Toxicon, 49, 423-435.
- Brzostek, G. ve Ignatuwicz, S., 1992. Oviposition preference of the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae), for varieties of the common bean, Ann. Warsaw Agri. Univer. SGGW AR, Horticulture, 16, 1, 65- 78.
- Bülbül, S., 1993. Researchs on the possibilities of the use of cooling technique for the controlling of the dried fig moth, (*Cadra cautella* Wlk. (Lepidoptera: Pyralidae) (in Turkish). Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi.
- Cappuccino, J.G. ve Sherman, N., 1992. Microbiology, a Laboratory Manual, Rockland Community College, Suffern, New York.

- Chen, C.H., Hsiu, R.H., Liu, C.E. ve Young, T.G., 2005. *Pseudomonas putida* bacteremia due to soft tissue infection contracted in a flooded area of central Taiwan: a case report, J. Microbiol. Immunol. Infect., 38, 293-295.
- Civelek, H.S., Weintraub, G.P., 2004. Effects of Two Plant Extracts on Larval Leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in Tomatoes, J. Econ. Entomol., 97, 5, 1581-1586.
- Civelek, H.S. ve Kaban, Ö., 2016. The Effects of Some Natural Substances on *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae), J. Inter. Sci. Pub. Agri. & Food, ISSN, 4, 1314-8591.
- Crespo, R., Juárez, M.P., Dal Bello, G.M., Padín, S., Calderón Fernández, G. ve Pedrini, N., 2002. Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*, Biocont., 47, 6, 685-696.
- Dal Bello, G., Padin, S., Juarez, P., Pedrini, N. ve De Giusto, M., 2006. Biocontrol of *Acanthoscelides obtectus* and *Sitophilus oryzae* with diatomaceous earth and *Beauveria bassiana* on stored grains, Biocont. Sci. and Technol., 16, 215- 220.
- Decelle, J. ve Lodos, N., 1989. Contribution to the study of legume weevils of Turkey (Coleoptera: Bruchidae), Bull. Ann. Soc. R. Ent., 125, 163-212.
- Dörtbudak, N., Erdoğan, P. ve Aydemir, M., 1999. Orta Anadolu Bölgesi'nde depolanan mercimek ve fasulyede zararlı olan Baklagil tohum böceklerinin yayılışı, bulaşma oranı, yoğunlukları ve meydana getirdikleri ürün kayıpları üzerinde araştırmalar, Bitki Koruma Bülteni, 39, 57-75.
- Draganova, S. ve Staneva, E., 2008. Virulence of isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin to adults of *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae), Integ. Pro. Stor. Pro. IOBC/wprs Bulletin, 40, 149-154.
- El-Aziz, S.E.A., 2011. Control Strategies of Stored Product Pests, J. Entomol., 8, 101-122.
- Ondráčková, E., 2015. The use of entomopathogenic fungi in biological control of pests, Acta Fytotechn. Zootechn., 18, 102-105.
- Elmalı, M. ve Toros, S., 1990. Değişik Fasulye Çeşitlerinin Denge Nem Oranları ve Bunun Fasulye Tohum Böceği (*Acanthoscelides obtectus* Say, Col, Bruchidae)'nin Gelişme ve Çoğalmasına Etkisi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 1195, Bilimsel Araştırma ve İncelemeler, 655 Ankara, 37 s.
- Emekci, M. ve Ferizli, A.G., 2000. Current Status of Stored Product Protection in Turkey. IOBC WPRS Bull., 23, 39-45.

- Esin, T., 1971. Hububat ve Ambar Zararlıları Mücadele Talimatı. T.C. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Mesleki Kitaplar Serisi Ankara, 145 s.
- Ferizli, A.G., Emekci, M., Tütüncü, S., ve Navarro, S., 2004. The efficacy of phosphine fumigation against dried fruit pests in Turkey. *IOBC WPRS (OILB SROP) Integ. Pro. Stor. Pro.*, 27(9) 265-269.
- Ferron, P., 1997. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi Imperfecti, Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides obtectus* (Col.: Bruchidae), *BioCont.*, 22, 393-396.
- Gaugler, R., 1997. Alternative Paradigms for Commercializing Biopesticides, *Phytoparasitica*, 25, 179-182.
- Goldberg, L.J. ve Margalit, J., 1977. A Bacterial Spore Demonstrating Rapid Larvicidal Activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens.*, *Mosq. News*, 37, 355-358.
- Muratoğlu, H., Demirbağ, Z. ve Sezen, K., 2011. An entomopathogenic bacterium, *Pseudomonas putida*, from *Leptinotarsa decemlineata*, *Turk. J. Biol.*, 35, 275-282.
- Hajek, A., 2004. Natural enemies: An introduction to biological control. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Halda-Alija, L., 2004. Incidence of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* species in freshwater wetlands, *Lett. in Appl. Microbiol.*, 39, 445-450.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95- 98.
- Heimpel, A.M., 1967. A Taxonomic Key Proposed for the Species of “Crystalliferous” Bacteria. *J. Invertebr. Pathol.*, 9, 364-375.
- Held, G.A., Bulla, L.A., Ferrari, E., Hoch, J.A., Aronson, A.I. ve Minnich, S.A., 1982. Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 19, 6065-6069.
- Kalkan, M., 1972. Orta Anadolu Bölgesi'nde bakliyata zarar veren Baklagil tohum böceklerinin tür, yayılış ve zarar oranları üzerinde araştırmalar, *Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı*, 6, 64.
- Khetan, S.K., 2001. *Microbial Pest Control*. Marcel Dekker, New York, USA.

- Kuberappa, G.C. ve Jayaramaiah, M., 1987. Influence of temperature and humidity on the growth and development of the fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a strain on the silkworm, *Bombyx mori* L, Mysore J. Agri. Sci., 21, 184-188.
- Kumar, P.A., Sharma, R.P., Malik, V.S., 1996. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*, Adv. Appl. Microbiol., 42, 1-43.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K. ve Vail, P., 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?, Biol. Cont., 21, 230-248.
- Lian, C., Zhao, J., Zhang, Z. ve Liu, W., 2004. Genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis, Mycoses, 47, 495-502.
- Lipa, J.J. ve Wiland, E., 1972. Bacteria Isolated from Cutworms and their Infectivity to *Agrotis* sp., Acta Microbiologica, Polonica, Series B 4, 127-140.
- Lodos, N., 1998. Türkiye Entomolojisi VI (Genel, Uygulamalı ve Faunistik), Yardımcı Ders Kitabı (I. Baskı), E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, No, 529.
- Martin, P.A.W. ve Travers, R.S., 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates, Appl. Environ. Microbiol., 55, 2437-2442.
- Mbogo, K.P, Davis, J. ve Myers, J.R., 2009. Transfer of the arcelin-phytohaemagglutinin-a amylase inhibitor seed protein locus from tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) to common bean (*P. vulgaris* L.), Biotechnol., 8, 285-295.
- Meadows, M.P., Ellis, D.J., Butt, J., Jarrett, P. ve Burges, H.D., 1992. Distribution, Frequency, and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill, Appl. Environ. Microbiol., 58, 1344-1350.
- Molina, C.A., Cana-Roca, J.F., Osuna, A. ve Vilchez, S., 2010. Selection of a *Bacillus pumilus* Strain Highly Active against *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) Larvae, Appl. Environ. Microbiol., 76, 5, 1320-1327.
- Ondrackova, E., 2015. The use of entomopathogenic fungi in biological control of pests, Acta Fytotechn. Zootechn., 18, 102-105.
- Özdem, A. ve Kovancı, B., 1996. Eskişehir ilinde Fasulye Tohum Böceği *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera, Bruchidae)'nin değişik tarihlerde ekimi yapılan fasulye çeşitlerindeki zarar oranı üzerinde araştırmalar, Türkiye III. Entomoloji Kongresi Bildirileri, 251-258.
- Özer, M., 1957. Türkiye'de depo, ambar, fabrika ve silolarda muhtelif hububat taneleri, un ve mamulleri ile kuru meyveler ve tütünlere önemli zarar yapan böcek türlerinin morfolojileri, kısa biyolojileri ve yayılışları üzerinde araştırmalar, A.Ü.Z.F. Yayınları, 125, Çalışmalar, 75, 108-111.

- Özer, M. ve Yücel, A., 1989. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde baklagillerde zararlı Baklagil tohum böcekleri, yayılışları, en önemli türün biyoeKOlojisi ve savaş yöntemleri, Doğa, 13, 2, 361- 381.
- Priest, F.G., 1993. Systematics and Ecology of *Bacillus*. Editörler: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. ve Losick, R., *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics, ASM Press, Washington DC, 3- 16.
- Rodrigues, C. ve Pratisoli, D., 1990. Patogenicidade de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e seu efeito sobre o gorgulho do milho e aruncho do feijão, Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 19, 301-306.
- Sacchi, C.T., Whitney, A.M., Mayer, L.W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R.S. ve Popovic, T., 2002. Sequencing of 6S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*, Emerg. Infect. Dis., 8, 1117-1123.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Saraçoğlu, K. ve Erkan, S., 2016. Fasulye Tohumlarındaki Viral Etmenlerin Saptanmasında Tanı Yöntemlerinin Duyarlılıklarının İncelenmesi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 53, 3, 309-315.
- Sarıyörük, N. ve Köseoğlu, A., 1987. Effect of freezing methods to the fig insects in the natural dried figs. Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü.
- Schmale, I., Wackers, F. L., Cardona, C. ve Dorn, S. 2001. Control Potential of Three Hymenopteran Parasitoid Species against the Bean Weevil in Stored Beans: The Effect of Adult Parasitoid Nutrition on Longevity and Progeny Production, Biological Control, 21, 2, 134-139.
- Schmale, I., Wackers, F. L., Cardona, C. ve Dorn, S. 2002. Field Infestation of *Phaseolus vulgaris* by *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae), Parasitoid Abundance, and Consequences for Storage Pest Control, Environ. Entomol, 31, 5, 859-863.
- Schmale, I., Wackers, F.L., Cardona, C. ve Dorn, S., 2006. Biological control of the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Col.: Bruchidae), by the native parasitoid *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hym.: Pteromalidae) on small-scale farms in Colombia, J. Stor. Pro. Res., 42, 1, 31-41.
- Sepetoğlu, H., 1996, Yemeklik Dane Baklagiller, E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders Notları. 24/3, 262 s.
- Sevim, A., Sevim, E. ve Demirci, M., 2015. Virulence of Entomopathogenic Fungi and Bacteria Against Stored Product Pests, CBÜ Fen Bil. Dergi., 11, 2, 79-87.

- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 1999. Isolation and Insecticidal Activity of Some Bacteria from the Hazelnut Beetle (*Balaninus nucum* L.), Appl. Entomol. Zool., 34, 85-89.
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2004. Studies of the bacterial flora as a biological control agent of the *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae), Biologia, 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 J. Crop and Horti. Sci., 35, 79-85.
- Sezen, K., Demir, İ., Katı, H. and Demirbağ, Z., 2005. Investigations on bacteria as a potential biological control agent of summer chafer, *Amphimallon solstitiale* L. (Coleoptera: Scarabaeidae), J. Microbiol., 43, 5, 463-468.
- Smith, R.A. ve Couche, G.A., 1991. The Phyllophane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants, Appl. Environ. Microbiol., 57, 311-315.
- Sreerag, R.S., Jayaprakas, C.A., Ragesh, L. ve Kumar, S.N., 2014. Endosymbiotic Bacteria Associated with the Mealy Bug, *Rhizoecus amorphophalli* (Hemiptera: Pseudococcidae), Int. Sch. Res., 268491.
- Tamer, A., 1996. *Acanthoscelides obtectus* (Say) ve *Callosobruchus maculatus* F.'un gelişme süresi üzerine sıcaklığın ve besinin etkilerinin araştırılması, Türkiye 3. Entomoloji Kongresi, 24- 28 Eylül 1996, Ankara.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, N. ve Kumar, S., 2007. MEGA4: Evolutionary genetic analysis (MEGA) software version 4.0, Mol. Biol. and Evol., 24, 1596- 1599.
- Thiery, D., 1984. Hardness of some fabaceous seed coats in relation to larva 1 penetration by *Acanthoscelides obtectus* Say (Col., Bruchidae), J. Stor. Pro. Res., 204, 4, 177-181.
- URL-1 http://www.agri.huji.ac.il/mepests/pest/Acanthocelides_obtectus/03/05/2019
- URL-2 <http://www.agaclar.net/forum/sebzelerde-hastalik-ve-zararlilar/36702.htm>
[03/05/2019](http://www.agaclar.net/forum/sebzelerde-hastalik-ve-zararlilar/36702.htm)
- URL-3 <https://gd.eppo.int/taxon/ACANOB/distribution> 07/05/2019
- URL-4 <http://defteriniz.com/fasulyeye-uygulanan-kulturel-islemler-sebze-yetistirme/21792/> 07/05/2019
- Wakefield, M.E., 2006. In Factors affecting storage insect susceptibility to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection, Campinas, São Paulo, Brazil, Oct. 15-18.

- Woese, C., 1990. Prokaryote Systematics: The Evolution of a Science, Prokaryotes., 3-18.
- Yanar, D., Düzdemir, O., 2012. Effects of Some Plant Extracts and Plant Originated Pesticides to Bean Weevil (*Acanthoscelides obtectus* (Say)), Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 6, 1, 36-40.
- Yaşarakıncı, N., 1991. Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Mercimek ve Nohut Alanlarında Zararlı Olan *Heliiothis* Ochs. (Lep: Noctuidae), Türleri ve Yayılış Alanları; Nohut yeşilkurdu [*Heliiothis viriplaca* (Humagel)]'nın Biyolojisi, Konukçuları ve Doğal Düşmanları, Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitü Müdürlüğü, Araştırma Eserleri Serisi, 8, Ankara.
- Yücel, A., 1985. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde baklagillerde zararlı Baklagil tohum böcekleri, yayılışları, en önemli türün biyo-ekolojisi ve savaş yöntemleri. Doktora Tezi. Diyarbakır Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, Diyarbakır.

8. EKLER

Ek 1., Elde Edilen İzolatların 16S rDNA Gen Sıraları

Ao1

TTAGGGAAGAACAAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTAATCA
 GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
 GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATG
 TGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTG
 CAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGG
 AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCG
 AAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
 TGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
 GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
 GGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
 TTACCAAATCTTGACATCCTTTGAAAACCTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGG
 GGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTG
 GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGG
 GCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
 ATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATAAAA
 GGGCAGCTAAACCGCGAGGTCATGCAAATCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGA
 TTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAG
 CACGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACG

Ao2

TTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGT
 CAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATG
 CGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTT
 ACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGCTTTCGCACAT
 CAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCT
 CTGCGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCT
 CCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGGCTTTCACATCAGACTTA
 GAAACCGCCTACGGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCCGGATAACGCTTGGCCAC
 CCTACGTATTAACCGCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCCTGATTAG
 GTACCGTCAAGGTGCGCACAGTTACTTACGCACTTGTTCTTCCCTAATAACAGAG
 CTTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCG
 CCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCATAGGAGTCTGGACCGTGTCTC
 AGTTCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGCTACGTATCGTTGCCTTGGTA
 AGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATACGGCGCGGGTCCATCTATAAGTGATAGC
 AAGGCCATCTTTCCTACTGTAGAACCATGCGGTTCTACATGTTATCCGGCATTAGCT
 TCGGTTTCCCGAAGTTATTCCAGTCTTATAGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACC
 CGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAGCAAGCTCCTTATCTGTTTCGCTCGACTTGCAT
 GTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCT

Ao3

GCGTATGGATACAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCCGGACGGGTGAGTAAC
 ACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATA
 CCGGATAATATTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCA
 CTTATGGATGGACCCGCGTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
 GGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
 AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTC
 TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACC
 TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
 GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAG
 TCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGAC
 TTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
 ATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGA
 GCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGT
 AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACG
 CATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATT
 GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAA
 GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTT
 CGGGAGCAGACTGACAGGGTGGTGCAGGTTGTCGTCAGCTCGTGTTG

Ao4

GTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACC
 GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCC
 AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGTTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAAC
 ACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCT
 CCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCAC
 TGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCC
 TCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGG
 CTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCAATAATTCCG
 GACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGG
 CCTTCTGGNTAAGGTACCGTCAAGGTGCGAGCAGTTACTCTCGCACTTGTTCTT
 CCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCT
 CCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
 CTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCCGGCTACGCA
 TCGTCGCCTTGGTAAGCCATTACCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCAT
 CTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCATGCGGTTCAAGGAAC
 TATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCAGGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTAC
 CCACGTGTTACTACCCGTCCGCGCTAACATCCGGGAGCAAGCTCCCTTCTGTC
 CGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCATGATCA
 AACTCT

Ao5

GGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGA
 GTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCA
 CTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGC
 TTTCGCGCCTCAGTGTACAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTC
 CTCCATATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCACACTTTCCCTCTTCTGC
 ACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACA
 TCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCGGGATAACGC
 TTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGG
 TTAGTACCGTCAAGGTGCCAGCTNNTCAACTAGCACTTGTTCCTTCCCTAACAAACA
 GAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCGTCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTACAGACTT
 TCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGT
 CTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTG
 GTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGA
 CAGCCGAAGCCGCCTTTCAATTTCAACCATGCGGTTCAAAATGTTATCCGGTAT
 TAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACGGGCAGGTTACCCACGTGTTA
 CTCACCCGTCCGCCGCTAACTTCATAAGAGCAAGCTCTCAATCCATTCGCTCGAC
 TTGCATGTATTAGGCACGCCGCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCATGATCAAACCTCT

Ao6

TTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGAC
 AGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCA
 AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTAAAGTTG
 GATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAG
 AGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA
 GGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGT
 GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 CGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATT
 AAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACG
 GGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
 TTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGA
 ACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
 TAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACATAATGGTGGG
 CACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
 GTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGA
 GGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAACCAATCGTAGTCCGGA
 TCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCA
 GAACGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACAC

Ao7

CTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACAT
 GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCC
 GTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGA
 TTCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
 GTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTTCGCTT
 CGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCC
 ACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCCAGGTTGAG
 CCCGGGGCTTTCACATCCAACCTTAACAAACCACCTACGCGCGGCTTTACGCCAG
 TAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGGCTGCTGGGCACAGAG
 TTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGGTAACGTTCAAAACACTAACGGTATTAGGGTTA
 ATGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACAC
 GCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTTCCCCTGCTGCCT
 CCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGA
 CCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCACCTAGCTAATCCGA
 CCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCCTAGGA
 CGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTCGAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGATT
 CCTAGGCATTACTACCCGTCCGCCGCTGAATTGAAGAGCAAGCTCTTCTCATCC
 GCTCGACTTGATGTGTTAGGCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAA
 ACTCT

Ao8

TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTAC
 CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAA
 GTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAAA
 CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTG
 AGGAGCGAAAGCGTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
 CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGCTAGGGGGTTTCCCGCCCCTTAGTGCTGCAGC
 TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAAGTACGGTCGCAAGAACTGAAACTC
 AAAAGGAAATTGACGGGGGCCCGCATAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTGATTGCA
 AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATA
 GGGCTTTCCTTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
 GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGC
 CAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
 GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA
 ATGGACAGAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCT
 GTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAG
 TAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
 CCGTCACACCAG

Ao9

CAAGAGTAACTGCTTGCGCCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCA
ACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG
AATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAG
GGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCCGCTGGGGGAG
TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC
CTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGT
GCATGGTTGTTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCG
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGGCTGCGAGACCGCAAGG
TTAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT
GCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACG

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Trabzon'un Of ilçesinde doğdu. İlkokulu ve Ortaokulu Trabzon'un Of ilçesi Bölümlü Beldesinde (Şimdi mahalle) ve Liseyi Trabzon Affan Kitapçıoğlu Lisesi'nde tamamladı. 1995-1997 yıllarında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Tıbbi Laboratuvar Bölümünü bitirdi. 1999 yılında başladığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümündeki lisans öğrenimini 2004 yılında tamamladı ve Biyolog ünvanıyla mezun oldu. Bu sırada 2001 yılı temmuz ayında Laboratuvar teknikeri olarak memuriyete başladı. Mezun olduktan sonra 2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2010 yılında Biyolog ünvanıyla ataması yapıldı. Daha sonra Sağlık Bakanlığı bünyesinde değişik hastanelerde idarecilik yaptı. Halen Trabzon İl Sağlık Müdürlüğü bünyesinde idarecilik görevi yürütmektedir. Evli ve 1 kız çocuk babasıdır. Orta derecede İngilizce bilmektedir.