

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇİZGİLİ YAPRAKKURDU
(*SPODOPTERA EXIGUA* HÜBNER, LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)'NA
KARŞI BAKTERİ ORJİNLİ BİYOPESTİSİT GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Ardahan ESKİ

**HAZİRAN 2018
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇİZGİLİ YAPRAKKURDU
(*SPODOPTERA EXIGUA* HÜBNER, LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)'NA
KARŞI BAKTERİ ORJİNLİ BİYOPESTİSİT GELİŞTİRİLMESİ

Ardahan ESKİ

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

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 08 / 05 /2018

Tezin Savunma Tarihi : 07 / 06 /2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail DEMİR

Trabzon 2018

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoloji Anabilim Dalında
Ardahan ESKİ Tarafından Hazırlanan

ÇİZGİLİ YAPRAKKURDU
(*SPODOPTERA EXIGUA* HUBNER, LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)'NA
KARŞI BAKTERİ ORJİNLI BİYOPESTİSİT GELİŞTİRİLMESİ

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 15 /05/2018 gün ve 1753 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

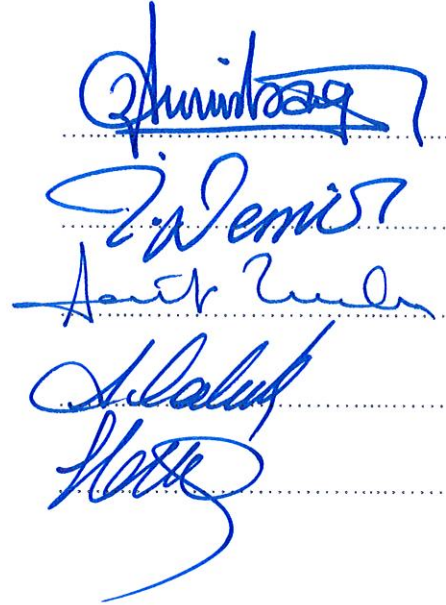
Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Üye : Prof. Dr. İsmail DEMİR

Üye : Prof. Dr. Ferit TURANLI

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇABUK

Üye : Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU

The image shows four handwritten signatures in blue ink, each written on a horizontal dotted line. The signatures are: 1. Zihni Demirbağ, 2. İsmail Demir, 3. Ferit Turanlı, and 4. Ahmet Çabuk. The signature of Hacer Muratoğlu is not visible in the image.

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Çizgili Yaprakkurdu (*Spodoptera exigua* Hübner, Lepidoptera: Noctuidae)’na Karşı Bakteri Orjinli Biyopestisit Geliştirilmesi” isimli bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmalarım sırasında beni yönlendiren, her türlü desteği ve imkanı sağlayarak değerli bilgilerinden yararlandırıan hocam Sayın Prof. Dr. İsmail DEMİR’e, laboratuvarında maddi manevi imkanlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, laboratuvar çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları ilgiden dolayı Sayın Prof. Dr. Kazım SEZEN, Sayın Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU, çalışmalarım ile yakından ilgilenen ve yardımlarda bulunan Sayın Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cihan İNAN’a ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca böcek örneklerinin temininde yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÜLLÜ’ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Bilal KUTRUP’a teşekkürlerimi sunarım.

Elektron mikroskopisi ve partikül boyut analizi çalışmalarına verdikleri katkılardan dolayı Karadeniz Teknik Üniversitesi, Malzeme ve Metalurji Bölümü’ne ve Sayın Öğr. Gör. Fatih ÖZKALAYCI’ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince destek sağlayan TÜBİTAK, Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı’na (2211-C) ve FHD-2017-5778 numaralı proje kapsamında destek sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

Maddi ve manevi her türlü desteğiyle daima yanımda olan aileme, desteğini ve güvenini her zaman hissettiren, eşim Duygu BEKİRCAN ESKİ’ye ve biricik kızım Ada’ya sonsuz minnet ve şükranlarımla teşekkür ederim.

Ardahan ESKİ
Trabzon 2018

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “izgili Yaprakkurdu (*Spodoptera exigua* Hübner, Lepidoptera: Noctuidae)’na Karşı Bakteri Orjinli Biyopestisit Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. İsmail DEMİR’in sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 07/06/2018

Ardahan ESKİ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ	XIII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XIV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Entegre Mücadele.....	5
1.3. Biyolojik Mücadele.....	6
1.3.1. Dünyada Biyolojik Mücadele	6
1.3.2. Ülkemizde Biyolojik Mücadele	7
1.4. Mikrobiyal Mücadele	8
1.5. <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
1.5.1. Tarihiçesi.....	11
1.5.2. İnspektisidal Kristal Proteinlerin Özellikleri	11
1.5.3. Etki Mekanizması.....	13
1.5.4. Diğer metabolitler	14
1.6. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Biyopestisit Olarak Geliştirilmesi.....	14
1.6.1. Fermentasyon	15
1.6.2. Formülasyon.....	17
1.7. Taguchi Metodu	19
1.8. Çizgili Yaprakkurdu, <i>Spodoptera exigua</i> Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)	22
1.8.1. Coğrafik Dağılım	22
1.8.2. Morfolojisi	22
1.8.3. Hayat Döngüsü.....	23
1.8.4. Ekonomik Önemi	23
1.8.5. Mücadelesi	24

1.9.	Çalışmanın Amacı.....	26
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	27
2.1.	Çizgili Yaprakkurdu (<i>Spodoptera exigua</i>)’nun Toplanması.....	27
2.2.	Çizgili Yaprakkurdu’ndan Kültüre Edilebilir Bakterilerin İzolasyonu.....	27
2.3.	Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması.....	27
2.4.	Bakteriyel İzolatların Fenotipik Özellikleri	28
2.4.1.	Makroskopik Özellikler	28
2.4.2.	Mikroskopik Özellikler.....	28
2.4.3.	Biyokimyasal Özellikler.	28
2.4.4.	Büyüme Özellikleri	29
2.5.	Bakteriyel İzolatların Genotipik Özellikleri.....	29
2.5.1.	Genomik DNA İzolasyonu.....	29
2.5.2.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile 16S rRNA Gen Bölgesinin Çoğaltılması	30
2.5.3.	16S rRNA Gen Bölgesinin pGEM-T Vektörüne Ligasyonu.....	30
2.5.4.	Kompotent Hücre Hazırlanması.....	30
2.5.5.	16S rRNA Gen Bölgelerinin Kompotent Hücreye Aktarımı.....	31
2.5.6.	Koloni PCR ile Transformasyonun Doğrulanması	31
2.5.7.	Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve DNA Dizi Analizi	31
2.5.8.	Elde Edilen Baz Dizilimlerinin İncelenmesi.....	32
2.6.	Bakteriyel İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.....	32
2.6.1.	Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması	32
2.6.2.	Tarama Testleri	33
2.6.3.	Doz Denemeleri	33
2.7.	<i>Bacillus thuringiensis</i> Se13 suşunun İnsektisidal Aktivite Özellikleri.....	33
2.7.1.	İnsektisidal Kristal Proteinlerin Mikroskopisi	33
2.7.2.	PCR ile Toksin Genlerinin Araştırılması	34
2.7.3.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	35
2.8.	Fermentasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	35
2.8.1.	Başlangıç Kültürünün Hazırlanması	35
2.8.2.	Deney Tasarımı-1	36
2.8.3.	Canlı Spor Sayısının Belirlenmesi	37
2.8.4.	Deney Tasarımı-2.....	37
2.8.5.	Canlı Spor Sayısının Belirlenmesi	39
2.8.6.	Doğrulama Deneyi	39

2.9.	Fermentörde Üretim	39
2.10.	Enkapsülasyon Koşullarının Optimizasyonu	39
2.10.1.	Deney Tasarımı-3.....	40
2.10.2.	Formülasyonun Hazırlanışı	40
2.10.3.	Canlı Spor Sayımı	41
2.10.4.	Doğrulama Deneyi	41
2.11.	Üretilen Biyopestisitinin Özellikleri	41
2.11.1.	Elektron Mikroskopisi.....	41
2.11.2.	Partikül Analizi	42
2.11.3.	Islanabilirlik	42
2.11.4.	Süspansibilite	42
2.11.5.	Nem İçeriği.....	42
2.11.6.	Canlı Spor Sayımı	43
2.12.	Ürünün Entomopatojenitesi	43
2.12.1.	<i>Spodoptera exigua</i> Üzerindeki Etkinliği	43
2.12.2.	Konak Spektrumu	44
2.13.	Memeli Toksisitesi	44
3.	BULGULAR	47
3.1.	<i>Spodoptera exigua</i> Larvalarından Bakteri İzolasyonu.....	47
3.2.	İzolatların Fenotipik Özellikleri	47
3.2.1.	Makroskobik ve Mikroskobik Özellikleri.....	47
3.2.2.	Biyokimyasal Özellikleri	48
3.2.3.	Büyüme Özellikleri	51
3.3.	Genotipik Özellikler.....	53
3.4.	İzolatların İnsektisidal Aktiviteleri	56
3.4.1.	Tarama Testleri	56
3.4.2.	Doz Denemeleri	57
3.5.	<i>Bacillus thuringiensis</i> Se13 suşunun İnsektisidal Aktivite Özellikleri.....	57
3.6.	Fermentasyon Koşullarının Optimizasyonu	61
3.7.	Fermentörde Üretim	66
3.8.	Enkapsülasyon Koşullarının Optimizasyonu	66
3.9.	Optimum Şartlarda Üretilen Ürünün Özellikleri.....	68
3.9.1.	Elektron Mikroskopisi.....	68
3.9.2.	Partikül Boyut Analizi	68

3.9.3.	Islanabilirlik, Süspansibilite ve Nem İçeriği	69
3.10.	Ürünün Entomotoksitesisi	69
3.10.1.	<i>Spodoptera exigua</i> Üzerindeki Etkisi	69
3.10.2.	Konak Spektrumu	72
3.11.	Ürünün Memeli Toksisitesi	73
4.	TARTIŞMA	75
5.	SONUÇLAR	85
6.	ÖNERİLER	87
7.	KAYNAKLAR	88
8.	EKLER	100

ÖZGEÇMİŞ



Doktora Tezi

ÖZET

ÇİZGİLİ YAPRAKKURDU
(*SPODOPTERA EXIGUA* HÜBNER, LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)'NA
KARŞI BAKTERİ ORJİNLİ BİYOPESTİSİT GELİŞTİRİLMESİ

Ardahan ESKİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. İsmail DEMİR
2018, 99 Sayfa, 14 Sayfa Ek

Polifag bir zararlı olan çizgili yaprakkurdu bitkilerin yaprakları ve meyveleri ile beslenerek önemli ekonomik kayıplara neden olur. Entamopatojen bakterilerin zararlı ile mücadelede kullanılmasına yönelik yapılan bu çalışmada *S. exigua* larvalarından toplam 15 bakteriyel izolat elde edildi ve fenotipik ve genotipik özelliklerine göre karakterizasyonları yapıldı. İzolatların zararlı üzerindeki tarama testlerinde, %100 mortalite ile en etkili izolat olan *Bacillus thuringiensis* Se13 için LT_{50} değeri 1,59 gün olarak belirlendi. Bu izolat ile gerçekleştirilen doz denemeleri sonucunda LC_{50} değeri ise $7,4 \times 10^4$ cfu/ml olarak belirlendi. Maksimum spor-kristal üretimi için izolatın fermentasyon koşulları Taguchi metodu ile optimize edildi. Belirlenen optimum koşullar kullanılarak fermentörde spor-kristal üretimi gerçekleştirildi. Elde edilen spor ve kristallerin püskürterek kurutma yöntemi ile enkapsülasyonu gerçekleştirildi. Üretilen toz formülasyonun ıslanabilme süresi $25,22 \pm 1,75$ saniye, süspanse olma yüzdesi %77,66, nem içeriği $7,29 \pm 0,16$, ortalama partikül boyutu, $13,462 \mu m$ olarak belirlendi. Ürün, zararlı üzerinde 10^9 cfu/ml konsantrasyonda %100 ölüm meydana getirdi ve LT_{50} değeri 0,8 gün olarak belirlendi. LC_{50} değeri ise $1,6 \times 10^4$ cfu/ml olarak belirlendi. Ürünün toksisite/patojenite çalışmaları ile sıçanlar üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü. Çalışma sonucunda zararlının entegre mücadelesinde kullanılabilecek çevre dostu ve güvenilir bakteri kaynaklı bir biyopestisit üretildi.

Anahtar Kelimeler: *Spodoptera exigua*, *Bacillus thuringiensis*, Mikrobiyal mücadele, Biyopestisit, Taguchi metodu

PhD. Thesis

SUMMARY

DEVELOPMENT OF BACTERIAL BASED BIOPESTICIDE AGAINST
(*SPODOPTERA EXIGUA* HÜBNER, LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Ardahan ESKİ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. İsmail DEMİR
2018, 99 Pages, 14 Pages Appendix

The beet armyworm which is a polyphagous pest, feeds on the foliage and fruits of plants causing economically significant yield losses. In order to use the entamopathogenic bacteria against the pest, a total of 15 bacterial isolates were obtained from the *S. exigua* larvae, and their identifications were performed using phenotypic and genotyping characteristics. *Bacillus thuringiensis* Se13 caused the highest (100%) insecticidal activity in the screening test, and LT₅₀ was determined as 1,59 days. As a result of the dose experiments performed with Se13, the LC₅₀ value was determined as $7,4 \times 10^4$ cfu/ml. The fermentation conditions of the isolate were optimized by the Taguchi method for the maximum spore-crystal production. Spore-crystal production was carried out in the fermenter using the determined optimum conditions, and the obtained spores and crystals were encapsulated by spray drying. The wettability, suspensibility, moisture content, and particle size of the encapsulated product were determined as 25,22 s, 77,66%, 7,29% and 13,462 µm, respectively. The product showed 100% mortality at 10^9 cfu/ml concentration, and LT₅₀ value was determined as 0,8 days. LC₅₀ value of the product was determined as $1,6 \times 10^4$ cfu/ml. Toxicity and pathogenicity tests conducted with the rats showed that encapsulated product had not adverse effect on the mammals. As a result, an environmentally friendly and reliable bacterial biopesticide that can be used in the integrated management of *S. exigua* has been produced.

Key words: *Spodoptera exigua*, *Bacillus thuringiensis*, Microbial management, Biopesticide, Taguchi method

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Pestisitlerin doğadaki hareketi	3
Şekil 2.	Delta-endotoksinler ve etki ettikleri böcek grupları	12
Şekil 3.	İnsektisidal kristal proteinlerin 3 boyutlu yapısı	12
Şekil 4.	<i>B. thuringiensis</i> insektisidal kristallerinin etki mekanizması	13
Şekil 5.	Çizgili yaprakkurdunun dünyadaki coğrafik dağılımı	22
Şekil 6.	Çizgili yaprakkurdunun ergin (A), yumurta (B), larva (C) ve pupası (D).....	23
Şekil 7.	<i>Spodoptera exigua</i> 'nın zararı.....	24
Şekil 8.	Ürünün sıçanlar üzerinde patojenite toksisite testleri A. İntragastrik uygulama, B. Subkutan uygulama, C. İntranazal uygulama	45
Şekil 9.	Sıçanların barındırılması ve beslenmesi	46
Şekil 10.	İzolatların farklı besiyerilerindeki absorbans değerleri	51
Şekil 11.	İzolatların farklı sıcaklıklardaki absorbans değerleri.....	51
Şekil 12.	İzolatların farklı pH'daki absorbans değerleri	52
Şekil 13.	İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarındaki absorbans değerleri.....	52
Şekil 14.	İzolatların PCR ile çoğaltılmış 16S rRNA gen bölgelerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	53
Şekil 15.	İzolatların 16S rRNA bölgesine göre filogenetik ağacı	55
Şekil 16.	<i>B. thuringiensis</i> Se13'ün faz-kontrast mikroskopisi (A) ve elektron mikroskopisi (B).....	58
Şekil 17.	<i>B. thuringiensis</i> Se13'ün toksin genlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü	58
Şekil 18.	<i>Cry1</i> gen bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı	59
Şekil 19.	<i>Cry2</i> gen bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı	59
Şekil 20.	<i>Vip3</i> gen bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı.....	60
Şekil 21.	<i>B. thuringiensis</i> Se13 izolatının gümüş nitrat ile boyanmış protein profilleri....	60
Şekil 22.	<i>B. thuringiensis</i> Se13 suşunun bakteriyel büyüme eğrisi	61
Şekil 23.	Fermentasyon koşullarına etki eden faktörlerin sinyal gürültü oranı	62
Şekil 24.	Fermentasyon koşullarını etkileyen faktörlerin etki oranı	63
Şekil 25.	Fermentasyonda kullanılan M4 besiyeri içerisindeki maddelerin optimizasyonu sonucu elde edilen sinyal gürültü oranı.....	65
Şekil 26.	M4 besiyeri içerisindeki maddelerin spor sayısına etkisi	65

Şekil 27. Enkapsülasyonda kullanılan faktörlerin sinyal gürültü oranı	67
Şekil 28. Enkapsülasyona etki eden faktörlerin etki oranı.....	68
Şekil 29. Elde edilen biyopestisidin elektron mikroskopisi.....	69
Şekil 30. Optimum koşullarda üretilen ürünün partikül boyut analizi.....	69
Şekil 31. Saksı denemeleri.....	70
Şekil 32. Enkapsüle <i>Bt</i> -Se13'ün <i>H. cunea</i> ve <i>M. neustria</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi.....	72
Şekil 33. Akut oral toksisite/patojenite testi	73
Şekil 34. Akut subkutan toksisite/patojenite testi	74
Şekil 35. Akut pulmonar toksisite/patojenite testi	74



TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.	Ülkemizde kullanılan tarım ilaçlarının yıllara göre dağılımı	2
Tablo 2.	Türkiye'den AB ülkelerine gönderilen bitkisel ürün partilerine göre uygun bulunmayanların sayısı ve nedenleri	4
Tablo 3.	Ülkemizde ruhsatlı mikrobiyal mücadele etmenler.....	10
Tablo 4.	<i>Bt</i> içerikli bazı biyopestisitler ve üreticileri	15
Tablo 5.	Entomopatojenik bakterilerin likit formülasyonlarında kullanılan maddeler ..	18
Tablo 6.	Entomopatojenik bakterilerin katı formülasyonlarında kullanılan maddeler...	18
Tablo 7.	Taguchi orthagonal dizi seçim tablosu	20
Tablo 8.	Zararlının doğal düşmanları	25
Tablo 9.	16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PCR koşulları	30
Tablo 10.	Toksin genlerinin varlığını taramada kullanılan primerler.....	34
Tablo 11.	Optimizasyon çalışmalarında kullanılan besiyerileri ve içerikleri	36
Tablo 12.	Optimizasyonda kullanılan faktörler ve seviyeleri.....	36
Tablo 13.	L16 Taguchi Tasarımı	37
Tablo 14.	Besiyeri içeriğinin optimizasyonunda kullanılan faktörler ve seviyeleri	38
Tablo 15.	L27 Taguchi Tasarımı	38
Tablo 16.	Püskürterek kurutma yöntemine etki eden faktörler ve seviyeleri	40
Tablo 17.	L16 Taguchi Tasarımı	40
Tablo 18.	Uygulama yapılacak deney grupları ve sıçan sayıları	45
Tablo 19.	İzolatların fenotipik özellikleri	48
Tablo 20.	Gram pozitif <i>Bacillus</i> izolatların biyokimyasal özellikleri	49
Tablo 21.	Gram negatif (solda) ve gram pozitif sporsuz (sağda) izolatların biyokimyasal özellikleri	50
Tablo 22.	İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin NCBI veritabanındaki benzerlikleri...	54
Tablo 23.	Bakteriyel flora üyelerinin zararlı üzerindeki insektisidal etkileri	56
Tablo 24.	<i>Bacillus thuringiensis</i> Se13 izolatının zararlı üzerindeki doz denemeleri	57
Tablo 25.	Taguchi L16 ortagonal düzlemine göre spor sayısı.....	62
Tablo 26.	Fermentasyon koşullarına etki eden faktörlerin varyans analizi	63
Tablo 27.	Optimum tasarım için tahmin edilen ve belirlenen değerler	63
Tablo 28.	Taguchi L27 ortagonal düzlemine göre spor sayısı.....	64

Tablo 29.	M4 besiyeri içeriğinin optimizasyonu için varyans analizi.....	65
Tablo 30.	Optimum tasarım için tahmin edilen ve belirlenen değerler	66
Tablo 31.	Enkapsülasyona etki eden faktörler.....	67
Tablo 32.	Enkapsülasyona etki eden faktörlerin varyans analizi	67
Tablo 33.	Optimum tasarım için tahmin edilen ve belirlenen değerler	68
Tablo 34.	Ürünlerin laboratuvar ortamında 10^9 cfu/ml konsantrasyonda zararlı üzerindeki ölüm oranları ve medyan letal zamanları (LT_{50})	71
Tablo 35.	Ürünlerin laboratuvar ortamında zararlı üzerindeki medyan letal konsantrasyonu (LC_{50})	71
Tablo 36.	Ürünlerin saksı denemelerinde zararlı üzerindeki ölüm oranları ve medyan letal zamanları (LT_{50})	71
Tablo 37.	Enkapsüle <i>Bt</i> -Se13'ün <i>H. cunea</i> ve <i>M. neustria</i> larvaları üzerindeki medyan letal konsantrasyonu (LC_{50}).....	72

SEMBOLLER DİZİNİ

TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
AB	: Avrupa Birliği
RASSF	: Gıda ve Yemler için Hızlı Alarm Sistemi
FAO	: Birleşmiş Milletler Besin ve Tarım Organizasyonu
CEQ	: Çevresel Kalite Konseyi
IBMA	: Uluslararası Biyoajan Üreticileri Derneği
IOBC	: Uluslararası Biyolojik Mücadele Örgütü
EPA	: Çevre Koruma Ajansı
APN	: Aminopeptidaz N
ALP	: Alkalin fosfataz
GPI	: Glikozilposfatidil-inositol
Cry	: Kristal
Vip	: Vejetatif insektisit protein
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
bp	: Baz çifti
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
ng	: Nanogram
mM	: Milimolar
μ M	: Mikromolar
K_2HPO_4	: Potasyum hidrojen fosfat
KH_2PO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
$MgSO_4$: Magnezyum sülfat
$ZnSO_4$: Çinko sülfat
$FeSO_4$: Demir sülfat
$MnSO_4$: Mangan sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
X-gal	: 5-Bromo-4-kloro-3-indol- β -D-galaktopiranosid
IPTG	: İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İnsanoğlunun yeryüzündeki yaşamının sürekliliği için tarımsal üretim vazgeçilemez bir zorunluluktur. Bitkisel üretimin her aşamasında ürünlere zarar veren çok sayıda hastalık, yabancı ot ve zararlı böcek bulunmaktadır. Yirminci yüzyılın başından itibaren endüstriyel tarımın yaygınlaşmasıyla birlikte tarımsal üretimde ekonomik kayıplara neden olan zararlı organizmalarla yapılan mücadele faaliyetleri daha büyük bir önem kazanmıştır.

Yirminci yüzyıl içerisinde hızla artan dünya nüfusunun besleme ihtiyacını karşılayacak tarımsal üretimin sağlanmasında “Yeşil Devrim” olarak da adlandırılan gelişmelerin önemli etkisi olmuştur. Yirminci yüzyıl başlarından itibaren, genetik biliminde meydana gelen gelişmelerin bitki ve hayvan ıslahında yaygın olarak kullanılması yüksek verimli bitki çeşit ve hayvan ırklarının geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bunun yanında tarımda mekanizasyonun gelişmesi, kimyasal gübre kullanımının yaygınlaşması, hastalık ve zararlıların neden olduğu kayıpların kimyasal mücadele ile önlenmesi ya da en az düzeye indirilmesi, bitkisel üretimde sulama sistemlerinin yaygınlaştırılması ikinci dünya savaşından sonra bitkisel üretimde %100’ü aşan artışlara yol açmış, bunun sonucu özellikle gelişmiş ülkelerde üretim fazlası oluşmuştur. “Yeşil Devrim” sayesinde 1960’lı yıllardan itibaren, bu yeni çeşitler ile yeni tarım teknolojileri gelişmekte olan ülkelere kısa sürede girmiş ve gıda yetersizliğini önlemede önemli rol oynamıştır.

“Yeşil devrim” ülkemizde de tarımsal üretimde, özellikle 1960’lardan sonra etkili olmuştur. Üretim, birim alandan daha yüksek verim almayı hedefleyen entansif üretime kaymış ve yoğun kimyasal gübre ve ilaç kullanımına dayalı bir tarımsal üretim şekli ortaya çıkmıştır. Tarımsal ilaç kullanımının sınırlandırılması ve kontrollü uygulanması için 2001 yılında önlemler alınsa da günümüzde hala yoğun şekilde kullanımları söz konusudur (Tablo 1).

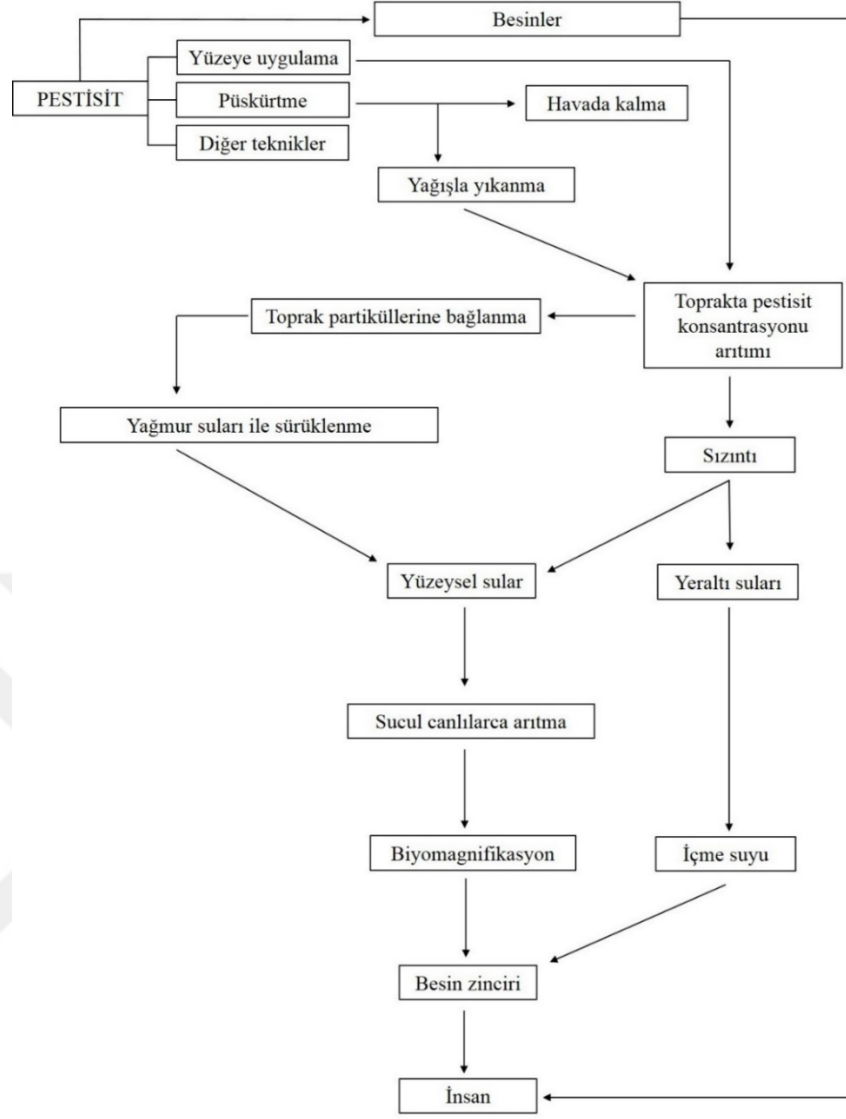
Tablo 1. Ülkemizde kullanılan tarım ilaçlarının yıllara göre dağılımı

Yıllar	Tarımsal ilaçlar						Toplam (Ton)
	İnsektisit	Fungusit	Herbisit	Akarisit	Rodentisit	Diğer	
2006	7.628	19.900	6.956	902	3	9.987	45.376
2007	21.046	16.707	6.669	966	51	3.277	48716
2008	9.251	16.707	6.177	737	351	5.613	38.836
2009	9.914	17.863	5.961	1.533	78	2.302	37.651
2010	7.176	17.396	7.452	1.040	147	5.344	38.555
2011	6.120	17.546	7.407	1.062	421	6.978	39.534
2012	7.264	18.124	7.351	859	247	8.766	42.611
2013	7.741	16.248	7.336	858	129	7.128	39.440
2014	7.586	16.674	7.794	1.513	149	6.007	39.723
2015	8.117	15.984	7.825	1.576	197	5.327	39.026
2016	10.425	20.485	10.025	2.025	259	6.835	50.054

Kaynak: TÜİK, 2017 (URL-1)

Yeşil devrimin uygulanmaya başlamasıyla birlikte tarımsal girdilerde büyük artışlar meydana gelmiş ve dünyada 1950 ile 2000 yılları arasında kimyasal gübre kullanımı 10 kat, pestisit kullanımı 32 kat artmıştır. Yirminci yüzyılın sonlarına gelindiğinde ise endüstriyel tarımda üretimi artırmak için kullanılan gübre ve zararlı organizmaları kontrol altına almak amacıyla kullanılan pestisitlerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki zararları görülmeye başlanmıştır.

Pestisitlerin uygulanması esnasında bir kısmı havaya karışırken, bir kısmı bitki ve toprak yüzeyinde kalır. Havaya karışan pestisitler havadaki toz partiküllerine bağlanarak kilometrelerce uzaklara sürüklenebilir. Ayrıca, havadaki diğer kimyasallarla birleşerek ikincil kirleticileri oluşturur. Bu durum, canlıların ve insanların etkilemesine neden olur. Toprak yüzeyinde kalan pestisitler ise, topraktan havaya buharlaşabilecekleri gibi yer altı sularına sızarak veya akarak da tehlike oluşturabilir. Sularda bakteriler ve planktonlarda tutunan insektisitler, besin zinciri yoluyla balıklardan insanlara kadar ulaşır (Şekil 1). Pestisit kalıntıları insanlarda dermatit, gözlerde tahriş, solunum yolu rahatsızlıkları, kasılma krizi vakaları, sperm gelişiminin etkilenmesi gibi sonuçlara yol açmaktadır. Kronik etkilerinin haricinde bazı pestisitlerin, insanlarda mutajenik, teratojenik ve kanserojenik etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla saptanmıştır (Alavanja vd., 2004; Nicolopoulou-Stamati vd., 2016).



Şekil 1. Pestisitlerin doğadaki hareketi (Güler ve Çobanoğlu, 1997)

Bunların yanında tehlikeli boyutlara varan pestisit kalıntısı nedeniyle ihracatı gerçekleştirilen birçok ürün ülkemize geri gönderilmektedir. Bu süreçte ülkemiz ekonomisi ve prestiji sarsılmaktadır.

Son on yılda AB üyesi ülkelere ihraç ettiğimiz 3192 parti bitkisel ürün uygun bulunmayarak ülkemize geri gönderilmiştir. Yapılan incelemelerde, 683 parti üründe pestisit kalıntısına, 49 parti ürün de ise böcek veya böcek kalıntılarına rastlanılmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Türkiye’den AB ülkelerine gönderilen bitkisel ürün partilerine göre uygun bulunmayanların sayısı ve nedenleri

Yıllar	Uygun Bulunmama Nedeni			Toplam
	Böcek veya Böcek Kalıntısı	Pestisit Kalıntısı	Diğer	
2007	7	27	267	301
2008	9	42	263	314
2009	3	29	249	281
2010	5	50	204	259
2011	5	118	212	335
2012	4	61	255	320
2013	2	39	199	240
2014	3	67	148	218
2015	4	88	198	290
2016	2	77	218	297
2017	3	85	249	337
Toplam	47	683	2462	3192

Kaynak: Gıda ve Yemler için Hızlı Alarm Sistemi (RASSF), 2017 (URL-2)

2017 yılında toplam 337 bildirim yapılmış ve bunların 85’i pestisit kalıntısı, 3’ü böcek veya böcek kalıntısı nedeniyle gerçekleşmiştir. Ülkemizden Norveç (Kuru üzüm), Danimarka (Organik nohut) ve İspanya’ya (Kuru incir) gönderilen ürünlerde böcek veya böcek kalıntısına rastlanılmıştır. Öte yandan Bulgaristan’a gönderilen biber, nar ve limonda, Romanya’ya gönderilen üzüm ve biberde, Hırvatistan’a gönderilen domateste, İsveç’e gönderilen asma yaprağında, Yunanistan’a gönderilen limonda, Avusturya’ya gönderilen bürülcede, Hollanda’ya gönderilen narda ve İsviçre’ye gönderilen biberde pestisit kalıntısı tespit edilmiştir.

Bu nedenlerden dolayı tarımda sürdürülebilirliği sağlamak amacıyla çevre dostu yöntemlerin geliştirilmesi ve kullanılması zorunlu bir hal almıştır. Bu nedenle tüm mücadele metotlarının zararlıları belirli bir seviyede tutmak için uyum içinde kullanıldığı entegre mücadele çalışmaları önem kazanmıştır.

1.2. Entegre Mücadele

Birleşmiş Milletler Besin ve Tarım Organizasyon (FAO)'una göre entegre zararlı mücadelesi, zararlıların popülasyon seviyelerini ekonomik zarar eşiği altında tutmak için birçok metodun uygun bir şekilde kullanılarak zararlıların popülasyon dinamiklerini, çevre ile ilişkili bileşenlerle bir arada değerlendiren bir zararlı yönetim sistemi olarak tanımlanmıştır. Çevresel Kalite Konseyi (CEQ) 1972 yılında entegre zararlı yönetimini, "Ürünleri tehdit eden potansiyel zararlıların geniş bir çeşidini kontrol eden tekniklerin kombine edildiği bir zararlı yönetim yaklaşımı" olarak tanımlanmıştır (Flint, 1981). Öncüer (2000), entegre zararlı yönetimini "Zararlı popülasyonlarını ekonomik zarar eşiği altında tutmak amacıyla bilinen mücadele yöntemlerinin bir arada düşünülerek, insan ve çevre sağlığına olumsuz etkileri en az olanlarının uygulanmasına yönelik çalışmalardır" diye tarif etmektedir. Entegre zararlı yönetimi; böcekler, hastalıklar ve yabancı otların yönetiminde biyolojik, kültürel, fiziksel, mekanik ve kimyasal araçların ekonomi, sağlık ve çevresel riskleri en aza indirecek kombinasyonlarla kullanımı şeklinde de tanımlanabilir. Entegre mücadele, entegre zararlı yönetimi veya entegre zararlı mücadelesi olarak da bilinen bu sistemin, sürdürülebilirlik, mevcut tüm olanakların kullanımı ve risklerin minimize edilmesi şeklinde üç ana teması vardır.

Entegre mücadelenin yararları,

- 1- Sürdürülebilir tarımsal üretimi ve kalkınmayı sağlar,
- 2- Kaliteli ve ilaç kalıntısı bulunmayan ürünler elde edilmesini sağlar,
- 3- Zararlı organizmaların kullanılan ilaçlara karşı direnç oluşturmasını geciktirir,
- 4- İnsan sağlığı ve çevrenin korunmasını sağlar,
- 5- Biyolojik çeşitliliğin ve canlılar arasındaki doğal dengenin korunmasını sağlar,
- 6- Zararlıların doğal düşmanlarının korunmasını sağlar ve salgın yapma riskini azaltır.
- 7- Gereksiz ilaçlamaların önlenmesiyle hem insan ve hayvanlarda oluşabilecek zehirlenme riski hem de mücadele masrafları azalır.

Ülkemizde de T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın 2012 yılında yaptığı 2013-2017 beş yıllık stratejik planında iyi tarım uygulamaları ve organik tarım çerçevesinde ülkemizde yürütülen bitki koruma faaliyetlerinin 2023 yılına kadar %50 oranında entegre zararlı yönetimi şeklinde yapılması, biyolojik mücadele ürünlerinin toplam bitki koruma ürünleri içindeki %1 olan pazar payının %25'e çıkarılması hedeflenmiştir. Entegre mücadele yönetimin en önemli parçası ve ülkemiz için en uygulanabilir metodu biyolojik mücadeledir.

1.3. Biyolojik Mücadele

“Biyolojik mücadele” sözcüğü ilk defa 1919 yılında Kalifornia Üniversitesi’nden Harry Smith tarafından böcek populasyonlarının doğal yollarla veya çeşitli uygulamalarla kontrol altına alınması için kullanılmıştır.

Biyolojik mücadele çalışmaları temelde üç ana başlıkta toplanmaktadır. Bunlar:

- 1- Klasik biyolojik mücadele: Faydalı organizmanın getirilerek doğaya salınması
- 2- Çoğaltma (Augmentasyon): Faydalı organizmanın üretilerek doğaya salınması
- 3- Koruma (Konservasyon): Doğada mevcut faydalı organizmanın korunması

1.3.1. Dünyada Biyolojik Mücadele

Avrupa’da biyolojik mücadele çalışmaları oldukça eskiye dayanmaktadır. Yunan bilim adamı Aristo *Historiae Animalium* adlı kitabında küçük bazı arıcıkların örümcekleri öldürdüğünü, bir kısmının da örümceklerin içerisine yumurta bıraktığını ve örümcekleri çoğalmak için kullandığını yazmıştır. Fakat, bu konuda en büyük buluş İtalyan entomolog Ulisse Aldrovandi (1522-1605) tarafından gerçekleştirilmiştir. Aldrovandi, *De Animalibus Insectis* adlı kitabında parazitizmi oldukça net bir şekilde açıklayarak modern biyolojik mücadeleye çok önemli bir katkıda bulunmuştur.

Biyolojik Mücadele’nin yaygınlaşmasında dönüm noktası 1888 yılında ABD’nin Kaliforniya eyaletinde turuncu alanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olan *Icerya purchasi* (Hemiptera: Monophlebidae)’e karşı, predatör böcek *Rodolia cardinalis* (Coleoptera: Coccinellidae) salınarak zararlının başarılı bir şekilde kontrolü sağlanmıştır.

Aynı dönemlerde Ukrayna’nın Odesa bölgesinde *Metarhizium anisopliae* kitlesele olarak üretilerek *Anisoplia* spp. (Coleoptera: Rutelidae)’e karşı başarılı bir şekilde kullanmıştır. Aynı yıllarda İngiltere ve Avusturalya *Coccinella undecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae)’yı zararlılara karşı predatör olarak kullanmıştır.

Faydalı böceklerin bulunduğu alandan alınarak zararlının olduğu alanlara salınması 1920 yılında *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)’nin kitlesele üretimi ile çok büyük bir değişim geçirmiş ve biyolojik mücadelede üretim-salım çalışmaları hızla artmıştır. *Trichogramma* bu amaçla en çok çalışılan etmen olup, 1977 yılında Rusya’da 10 milyon ha alana *Trichogramma* salımı yapılmıştır. Aynı dönemde Çin’de 1 milyon ha alanda *Trichogramma* ile biyolojik mücadele yapılmıştır. Bu konuda en çok çalışma yapılan

ülkelerden biri de Küba'dır. Küba yaklaşık 700 bin ha alanda *Trichogramma* salımı yapmakta olup, yaklaşık 516 bin ha alanda ise entomopatojenik fungus kullanılmaktadır. Kolombiya'da ise yaklaşık 550 bin hektarlık kahve üretim alanında *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* kullanılarak mücadele yapılmaktadır.

1.3.2. Ülkemizde Biyolojik Mücadele

Ülkemizde biyolojik mücadele çalışmaları Osmanlı dönemine kadar uzanır. Bu dönemde daha çok yurt dışından faydalı böcekler getirilerek sorun yaşanan yerlere salınması şeklinde çalışmalar yapılmıştır. İlk olarak 1910 yılında narenciye bahçelerinde ve bazı meyvelerde zararlı olan torbalı koşnil (*Icerya purchasi*) ile mücadele amacıyla Sakız Adası'ndan predatör gelin böceği (*Rodolia cardinalis*) getirilerek turunçgil bahçelerine salınmıştır. Daha sonra bu sorunun çözümü için 1922 yılında Fransa'dan *Rodolia cardinalis* getirilerek İstanbul'da bulunan Halkalı Ziraat Mektebinde üretilmiş ve zararlının görüldüğü bölgelerde kullanılmıştır. Benzer şekilde bir parazitoid olan *Aphelinus mali* (Hymenoptera: Aphelinidae) ise elma pamuklubitine karşı kullanılmak üzere Fransa'dan getirilip, Kuzeybatı Anadolu'da bazı yörelere salınmıştır.

1931 yılında Ege bölgesinde incirlerde zararlı incir kurduna karşı *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) adlı parazitoid getirilerek incir alanlarına salınmış ve günümüze kadar başarılı bir şekilde ekosistemde yerleşmesi sağlanmıştır. Yine daha önce ithal edilmiş olan *A. mali* 1931 ve 1934 yıllarında İsrail'den getirilerek bazı elma bölgelerimize salınmıştır. Yine daha önce Osmanlı döneminde getirilmiş olan *R. cardinalis* yurtdışından üçüncü defa 1933 yılında Mısır'dan ithal edilerek, Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsünde üretime alınıp salımı yapılmıştır. Daha sonra, Çukurova Bölgesine gönderilerek buraya yerleşmesi sağlanmıştır. Bu dönemde yine dut kabuklu bitine karşı *Prospaltella berlesei* (Chalcidoidea-Aphelinidae) ithal edilerek ülkemize yerleşmesi sağlanmıştır.

Uzun yıllar bu şekilde giden çalışmalar sonucunda biyolojik mücadelenin önemi fark edilmiş ve 1965 yılında Antalya'da "Biyolojik Mücadele Araştırma İstasyonu" kurulmuştur. Bu araştırma istasyonunda 1970'li yılların başında ABD'den *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) ve *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae) getirilerek önemli bir turunçgil zararlısı olan unlubitin mücadelesinde kullanılmak üzere üretimi yapılmış ve sorun olan bölgelere salınarak mücadelede kullanılmıştır. Bu dönemde

yapılan önemli çalışmalardan biri de Doğu Akdeniz Bölgesi'nde 1990'lı yıllarda önemli bir sorun haline gelen turuncgil beyazsineği (*Dialeurodes citri* Ashm.)'nin biyolojik mücadelesi amacıyla Türkiye'de ilk defa Doğu Karadeniz Bölgesi'nde tespit edilen avcı böcek *Serangium parcesetosum* (Coleoptera: Coccinellidae) Doğu Akdeniz Bölgesine getirilerek yerleştirilmesidir. Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde 1994 yılında polifag bir parazitoid olan *Trichogramma* spp. üretilerek başta mısırkurdu *Ostrinia nubilalis* ve elma içkurdu *Cydia pomonella* için başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Ülkemizde uzun yıllardır sorun olan süne için 2001 yılından itibaren Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünde parazitoid *Trissolcus* spp. (Hymenoptera: Scelionidae) üretimine başlanmış ve süne tehdidi altında olan alanlara salımı yapılmıştır. *Trissolcus* üretim çalışmaları sonraki yıllarda Konya ve Kırklareli illerinde de yapılarak 2012 yılı sonuna kadar doğaya yaklaşık 73 milyon adet *Trissolcus* spp. salımı yapılmıştır. Domates güvesinin (*Tuta absoluta*) biyolojik mücadelesinde kullanılmak üzere 2010 yılında özel sektöre kitlesel faydalı böcek üretimi için de bir ilk olarak destek verilmiştir. Biyolojik mücadelenin en başarılı ve yaygın bir şekilde kullanılacağı alanlardan biriside orman ekosistemleridir. Özellikle son yıllarda Türkiye ormanlarında büyük bir sorun haline gelen çam kese böceği mücadelesinde kullanılan *Calosoma sycophanta* (Coleoptera: Carabidae) yetiştirilmesi ve salım çalışmaları yapılmaktadır.

Biyolojik mücadele amacıyla kullanılan ürünlerin sayısı yaklaşık 1000 civarındadır. Bunlar 3 başlıkta sınıflandırılır;

- 1- Makrobiyaller: Predatör ve parazitoid böcekler ile nematodlar,
- 2- Mikrobiyaller: Entomopatojen veya antagonist fungus, virüs ve bakteriler,
- 3- Bitki ekstraktları: Bitkilerden elde edilen insektisit, fungusit veya repelentler.

1.4. Mikrobiyal Mücadele

Biyolojik mücadele yöntemleri arasında mikroorganizmaların kullanıldığı mikrobiyal mücadele yöntemleri son yıllarda tüm dünyada oldukça yaygın olarak uygulanmaktadır. Biyolojik mücadele kapsamında kullanılan mikroorganizmalar bakteriler, funguslar, virüsler, protozoalar ve nematodlardır. Mikrobiyal mücadelede kullanılan entomopatojenlerin büyük bir çoğunluğu konağa spesifik olduğu için sadece mücadelesi yapılmak istenilen organizma üzerinde etkili olur. Bu özelliği ile faydalı ve predatör böcekler, hayvanlar ve insanlar gibi hedef dışı organizmalar üzerinde herhangi bir risk

oluşturmazlar. Tamamen doğal olmaları sebebiyle ekosistemde herhangi bir kirliliğe yol açmazlar. Bu özellikleri, kimyasal insektisitlerin yerini bu biyolojik etmenlerin alacağını göstermektedir.

Uluslararası Biyoajan Üreticileri Derneği (IBMA) tarafından 2002 yılında yayınlanan rapora göre biyolojik mücadele ürünlerinin, toplam kullanımın kimyasal içerikli bitki koruma ürünlerinin ancak %1'i olduğu belirtilmiştir. Fakat bu oran 2010 yılında iki kat artarak toplam bitki koruma ürün pazarının %2'sine ulaşmıştır. Bu miktarın da %80'i tek başına *Bacillus thuringiensis* içerikli biyolojik ürünlere aittir. Bu veriler başarısı kanıtlanmış ve iyi pazarlanabilen bir ürünün ne kadar başarılı olacağını göstermektedir. Biyoajan üreticileri derneği raporunda biyolojik mücadele ürünlerinin pazar payının bitki koruma ürünleri pazarı içerisinde %20 olması gerektiğini bildirmiştir. Uluslararası Biyolojik Mücadele Örgütü (IOBC) tarafından yapılan tahminlerde ise 2050 yılında biyolojik mücadele ürünlerinin toplam bitki koruma ürün pazarı içerisindeki payının %30-35 olacağı tahmin edilmektedir.

Bugün için bitki sağlığında önemli sorunlara yol açan mikroorganizma ve böceklere karşı, ülkemizde ruhsatlandırılmış 30 tane mikrobiyal mücadele preparatı mevcuttur (Tablo 3).

Tablo 3. Ülkemizde ruhsatlı mikrobiyal mücadele etmenler

Adı	Mikrobiyal Etmen	Uygulanacak Zararlı	Firma
AGREE 50 WG	<i>Bacillus thuringiensis</i> spp.	Bağ salkım güvesi, Domateste yeşilkurt, Domates güvesi	Gennova
AQ10	<i>Ampelomyces quisqualis</i>	Bağda külleme, Domateste külleme	Boyut
Bio Act	<i>Paecilomyces lilacinus</i> WDG	Domates kök ur nematodu	Boyut
Bio Nematon	<i>Paecilomyces lilacinus</i> 1	Domates kök ur nematodu	Agrobest
Biobac-WP	<i>Bacillus subtilis</i>	Domateste kurşuni küf, Bağda kurşuni küf, Kiraz çiçek monilyası	Atlantik
Bio-T Plus	<i>Bacillus thuringiensis</i> spp.	Çam kese tırtılı, Sedir yaprak kelebeği	Bio-Tek
Blossom Protect	<i>Aureobasidium pullulans</i> WDG	Armut ateş yanıklığı	Astranova
Companion	<i>Bacillus subtilis</i>	Domates fide kök çürüklüğü	H.Sözmen
Dacron WP	<i>Bacillus thuringiensis</i> spp.	Domatesde yeşilkurt	Safa
Delfin WG	<i>Bacillus thuringiensis</i> spp.	Domatesde yeşilkurt, Domates güvesi, Elma içkurdu, Turunçgil ve nar harnup güvesi	Agrikem
Dipel DF	<i>Bacillus thuringiensis</i> spp.	Domatesde yeşilkurt, Domates güvesi, Pamuk yaprakkurdu, Bağ salkım güvesi,	Basf
Dopteril	<i>Beauveria bassiana</i> atcc.	Biber çiçek tripsi, Domates beyaz sinek, Kiraz sineği, Bağda iki noktali örümcek	Boyut
Florbac WG	<i>Bacillus thuringiensis</i> spp.	Bağ salkım güvesi	AMC-TR
Foray 76 B	<i>Bacillus thuringiensis</i> spp.	Çam kese tırtılı	Envirotek
IAB-BT	<i>Bacillus thuringiensis</i> spp.	Domatesde yeşilkurt	Nektar
İnferno	<i>Myrothecium verrucaria</i> strain	Domates kök ur nematodu	AMC-TR
Madex	<i>Cydia pomonella</i> granül virüsü	Elma içkurdu	Verim
Nibortem	<i>Verticillium lecani</i> strain V1-1	Hıyar beyaz sinek, Çiçek tripsi	Agrobest
Nogall	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Kiraz-şeftali kök kanseri	Bioglobal
Nostalgist BL	<i>Beauveria bassiana</i> strain Bb	Pamukta yeşilkurt	Agrobest
Priority	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> sl	Hıyar ve domateste iki noktali kırmızı örümcek, çilekte iki noktali kırmızı örümcek	Agrobest
Rapax	<i>Bacillus thuringiensis</i> spp.	Domates güvesi, Domates yeşilkurt, Bağ salkım güvesi	Boyut
REBOUND	<i>Bacillus thuringiensis</i> spp.	Bağ salkım güvesi	Hektaş
Remedier	<i>Trichoderma aspellerum</i>	Domates ve biberde kök çürüklüğü, Toprak kökenli hastalıklar.	Tancan
Ruotshield	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	Hıyarda toprak kökenli hastalıklar	Bioglobal
Serenade SC	<i>Bacillus subtilis</i> gst	Domates erken yanıklığı, Kurşuni küf, külleme, Elma karaleke, Patates kök boğazı nekrozu	Basf
Subtilex Foliar	%0,17 <i>Bacillus subtilis</i> MBI	Domates kurşuni küf, Bağ kurşuni küf	Bioglobal
T-22 Planter Box	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	Domates kök çürüklüğü, Domates kurşuni küf, Pamuk fide çürüklüğü	Bioglobal
Trichoflow	<i>Trichoderma harzianum</i> WP	Domates kök çürüklüğü	Enerji
Vertisol	<i>Reynoutria</i> spp	Domatesde kurşuni küf	Boyut

1.5. *Bacillus thuringiensis*

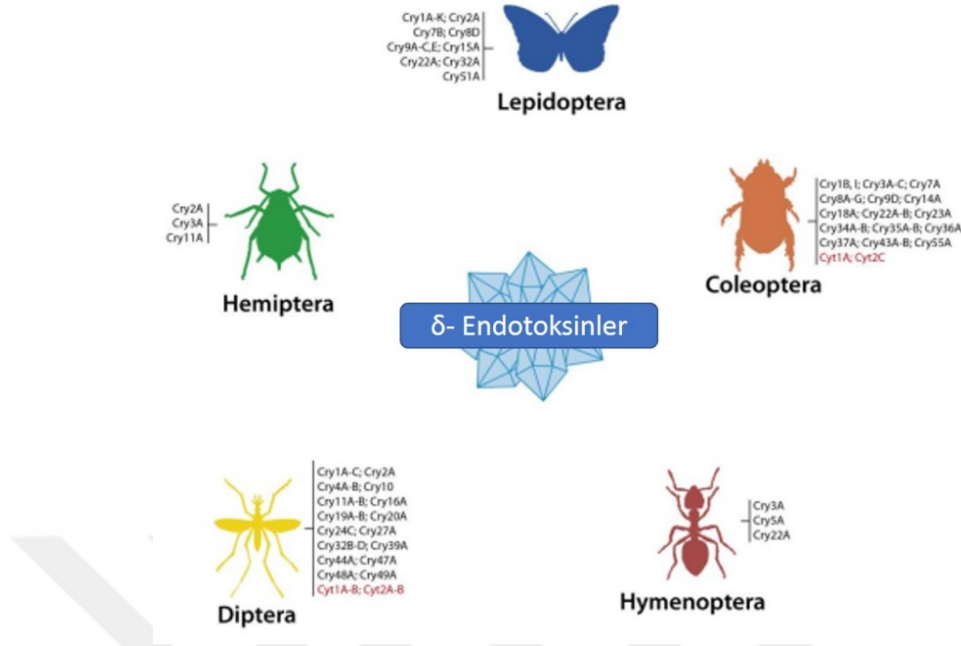
1.5.1. Tarihçesi

Bacillus thuringiensis 1901 yılında Japon bilim adamı Shigetane Ishiwata tarafından ipek böceğinde “sotto bacillus” hastalığının etkeni olarak keşfedilmiştir (Ishiwata, 1901). Alman bilim adamı Ernst Berliner, Thuringia eyaletinde bulunan un değirmenindeki ölü *Ephestia kuehniella* larvalarından bakteriyi izole etmiştir. Bu bakteriyi, bulunduğu eyalete atfen *Bacillus thuringiensis* olarak isimlendirmiştir (Berliner, 1911). Berliner yaptığı çalışmalarda endosporun yanında bulunan cisimcikleri gözlemlemiş ve “Restkorper” adını vermiştir (Berliner, 1915). Mattes isimli bilim adamı 1927 yılında yeniden aynı cisimcikleri incelemiş ve bunların insektisidal aktiviteye sahip parasporal kristaller olduğunu ortaya koymuştur. Bu cisimciklere parasporal kristaller adını 1953’de Christopher Hannay vermiştir. Philip Fitz-James ve Hannay ise 1955 yılında bu toksik parasporal kristallerin proteinlerden oluştuğunu keşfetmişlerdir.

B. thuringiensis, içerisinde *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* ve *Bacillus anthracis*’in de bulunduğu *Bacillus cereus* grubunun bir üyesidir. *B. thuringiensis* sporlanma esnasında sadece omurgasızlara karşı toksik etki gösteren kristal protein üretmesi ile grubun diğer üyelerinden ayırdedilir (Andrews vd., 1987).

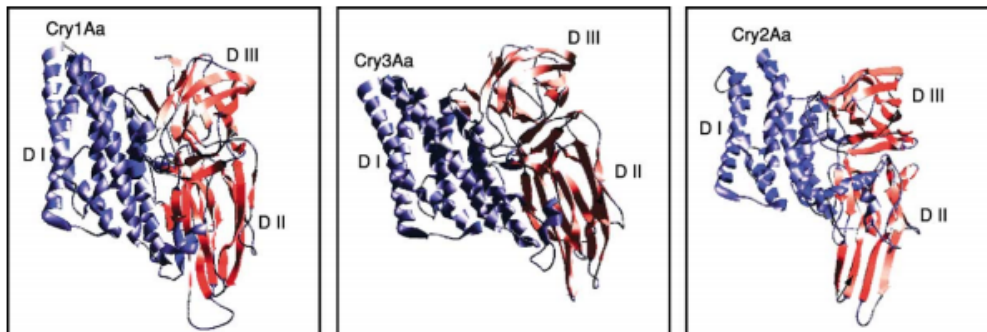
1.5.2. İsektisidal Kristal Proteinlerin Özellikleri

Delta-endotoksin olarak da adlandırılır ve inaktif protoksinlerdir. Delta endotoksinler genellikle plazmitler üzerinde bulunan “*cry*” genleri tarafından kodlanmaktadır. Bir alttür birden fazla kristal proteini sentezleyebilir. Kristal proteinlerinin bipiramidal, kübik, düz romboid, küresel ve kompozit tipte şekilleri bulunabilir. Bu kristal (*cry*) genleri Lepidoptera (*cry1*), Diptera ve Lepidoptera (*cry2*), Coleoptera (*cry3*), Diptera (*cry4*) ve Coleoptera ve Lepidoptera (*cry5*) grubundaki böceklere karşı etkilidir (Şekil 2).



Şekil 2. Delta-endotoksinler ve etki ettikleri böcek grupları (Palma vd., 2014)

Kristal proteinlerin yapısı genellikle X-ışınları kristalografisi ile belirlenmektedir. Cry toksinlerinde üç önemli bölge bulunmaktadır (Şekil 3). Bölge I, böcek bağırsağına tutunma ve delik oluşumundan sorumludur (Li vd., 1991). Bölge II, böcek bağırsağının epitel hücrelerinin reseptörlerine bağlanma ile ilgili fonksiyonu sağlar (Bravo, 1997). Bölge III'ün fonksiyonu hakkında net bir bilgi mevcut olmamasına rağmen Cry toksininin bağırsak proteazları tarafından sindirilmesini önlediği, bir görüşe göre de iyon kanallarının oluşumundan, reseptör bağlanmasından ve böcek özgünlüğünden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (De Maagd vd., 2001).

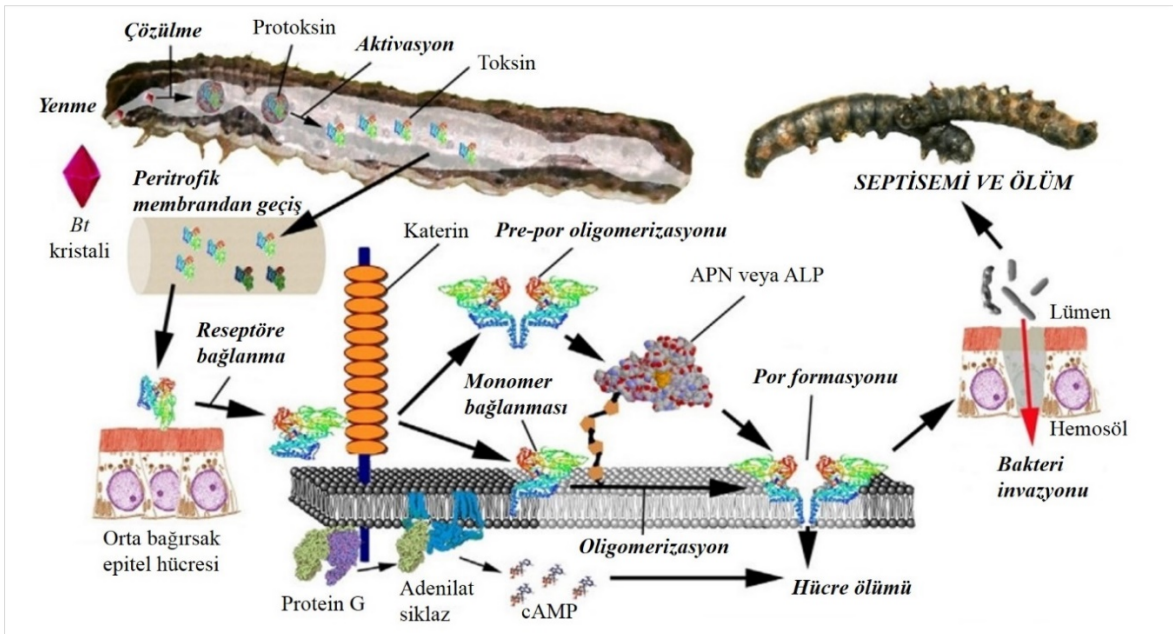


Şekil 3. İnsektisidal kristal proteinlerin 3 boyutlu yapısı (Bravo vd., 2005)

1.5.3. Etki Mekanizması

Cry toksinlerinin etki mekanizması iki model ile açıklanabilir. Birincisi por formasyon modeli (Bravo vd., 2004), ikincisi ise sinyal iletim modelidir (Zhang vd., 2006).

Por formasyon modeline göre inaktif haldeki cry toksini zararlı tarafından yendikten sonra bağırsak lümeninde yüksek pH'da çözünür. Çözünmeden sonra protoksinler orta bağırsaktaki proteazlarca N ve C terminallerinden kesilerek aktif toksin haline gelirler. Aktif toksin primer reseptör olan katerin reseptörüne bağlanır. Bağlanma sonrası toksin konformasyonel değişikliğe uğrayarak, proteinden heliks α -1 bölgesi çıkarılır. Bu değişiklik toksinin oligomerik formlarının oluşmasını indükler. Sekonder reseptörlere bağlanma ilgisi yüksek olan bu oligomerik formlar glikozilfosfatidil-inositol (GPI) bağlı proteinler olan aminopeptidaz N (APN) ve alkalın fosfataz (ALP) reseptörlerine bağlanır. Oligomerlerin sekonder reseptöre bağlanmasından sonra membran mikrodomanlerine girişi gerçekleşir. Bunun sonucunda orta bağırsak apikal membranında porlar oluşur ve böceğin ölümü gerçekleşir. Sinyal iletim modeline göre ise aktif toksin katerin reseptörlerine spesifik olarak bağlanır. Bağlanma sonucu bir dizi moleküler sinyal iletimi gerçekleşir ve cAMP seviyesinin artışı ile Mg^{+2} bağımlı adenil siklaz ve G proteininin artışı sağlanır. cAMP, protein kinaz A'yı aktive ederek iyon değişimleri ile hücre iskeleti yeniden düzenlenir. Sonuçta nekrotik hücre ölümü gerçekleşir (Şekil 4).



Şekil 4. *B. thuringiensis* insektisidal kristallerinin etki mekanizması (Adang vd. 2014)

1.5.6. Diğer metabolitler

B. thuringiensis alttürleri vejetatif büyüme ve sporlanma sırasında hedef olan ve olmayan organizmalara karşı toksik etki gösteren çeşitli sayıda antibiyotik, enzim, metabolit ve toksin üretebilirler.

Bazı alttürleri adenin, glikoz ve allarik asitten oluşan yüksek sıcaklıklara dayanıklı beta-ekzotoksinler üretirler. Bunlar ATP ile yarışarak RNA sentezinde görevli RNA polimeraz enzimini inhibe eder. Bu nedenle beta ekzotoksinler bütün canlılar için toksik etki gösterir (Farkaš vd., 1977). Damgaard (1995) ticari *B. thuringiensis* ürünlerindeki spordan elde edilen vejetatif hücrelerin ishale neden olan enterotoksin ürettiğini belirtmiştir. Bazı *B. thuringiensis* suşlarının vejetatif insektisidal kristal protein (vip) ürettiği bilinmektedir (Estruch vd., 1996). Ayrıca fosfolipaz (Damgaard vd., 1996), sfingomiyelinaz (Gilmore vd., 1989), proteaz (Hotha ve Banik, 1997), kitinaz (Sampson ve Gooday, 1998) ve hemolizin (Baida ve Kuzmin, 1995) gibi çeşitli *B. thuringiensis* enzimlerinin hedef olmayan organizmalar üzerinde toksik etki gösterdiği belirtilmiştir.

1.6. *Bacillus thuringiensis*'in Biyopestisit Olarak Geliştirilmesi

Henüz sentetik insektisitler keşfedilmemişken, *B. thuringiensis* 1920'lerin sonlarında Macaristan'da, 1930'ların başlarında ise Yugoslavya'da zararlı böceklerle mücadelede kullanılmaya başlamıştır. *Bt* içerikli ilk ticari ürün, "Sporeine" ismiyle 1938'de Fransa'da üretilmiştir. 20 yıl sonra ABD'de ticari olarak kullanılmaya başlanmış ve 1961'de Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından ruhsatlandırılmıştır. Ancak kimyasal insektisitlerle karşılaştırıldığında ürünlerin düşük performansı, bilim insanlarını yeni suşlar araştırmaya ve üretim sürecini geliştirmeye yöneltmiştir. Oldukça etkili olan *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1) suşu keşfedilmiş (Dulmage, 1970), Abbott Laboratuvarları tarafından üretilerek "Dipel" ticari ismiyle piyasaya sunulmuştur. İlerleyen yıllarda bu suş kullanılarak birçok firma tarafından yeni ürünler geliştirilmiştir. Günümüzde *B. thuringiensis* içerikli biyopestisit pazarının %70'ine Abbott Laboratuvarları ve Novartis sahiptir. Son verilere göre, ABD'de en az 180 *B. thuringiensis* içerikli ürün, Avrupa Birliği'nde 120'nin üzerinde mikrobiyal ürün ve Çin'de ruhsatlı 276 *B. thuringiensis* içerikli ürün bulunmaktadır (Tablo 4). Ülkemizde ise ruhsatlandırılmış 12 adet *B. thuringiensis* içerikli ithal biyopestisit bulunmaktadır (URL-3).

Tablo 4. *Bt* içerikli bazı biyopestisitler ve üreticileri

<i>Bt</i> alttürü	Ürün adı	Üretici	Hedef böcek grubu
<i>kurstaki</i>	Dipel	Abbotts Labs.	Lepidoptera
	Biobit, Foray	Valent Bioscience Co.	Lepidoptera
	Condor, Cutlass, Crymax, Lepinox	Ecogen Inc.	Lepidoptera
	Javelin, Thuricide	Sandoz Agro Inc.	Lepidoptera
	Bactospeine, Futura	Solvay&Cie/Duphar	Lepidoptera
	Delfin, CoStar, Vault, Steward	Thermo Trilogy Corp.	Lepidoptera
<i>aizawai</i>	Agree	Sandoz Agro Inc.	Lepidoptera
	Florbac, Xentari	Valent Bioscience Co.	Lepidoptera
	Solbichae	Gree Biotech Co.	Lepidoptera
<i>israelensis</i>	Bactimos, VectoBac, Teknar	Valent Bioscience Co.	Diptera
	Skeetal	Novo Nordisk	Diptera
	Bactokulicid	VPO Biopreperat	Diptera
	Moskitur	JZD Slusovice	Diptera
<i>morrissoni</i> ve <i>tenebrionis</i>	M-One, M-Trak	Mycogen	Coleoptera
	Trident	Sandoz Agro Inc.	Coleoptera
	Di Terra	Valent Bioscience Co.	Coleoptera
	Novodor	Novo Nordisk	Coleoptera
	Foil	Ecogen	Coleoptera
<i>galleriae</i>	Entobactirin	Glavmikro-Bioprom	Lepidoptera
	Spicturin	Tuticorin Alkali Ltd.	Lepidoptera
<i>thuringiensis</i>	Bathurin	Chamapol-Biokrna	Lepidoptera
	Muscabac	Farmos	Lepidoptera
	Insektin	Glavmikro-Bioprom	Lepidoptera
	Bacillex	Shionogi Co.	Lepidoptera
<i>dendrolimus</i>	DendroBacillin	Glavmikro-Bioprom	Lepidoptera

Bacillus thuringiensis'in biyopestisit olarak geliştirilmesi, fermentasyon ile spor-kristallerin elde edilmesi ve bunların çevre koşullarına dayanıklı formülasyonlarının üretilmesi olarak iki aşamada incelenebilir.

1.6.1. Fermentasyon

B. thuringiensis'in kitlesel üretimi batık faz ve katı faz fermentasyonu ile üretilebilir. Dulmage ve de Barjac (1973), Pearson ve Ward (1988), Farrera vd. (1998), Montiel vd. (2001) ve Zouari vd. (2002) tarafından farklı besin kaynakları kullanılarak batık faz fermentasyonu, Devi vd. (2005), El-Bendary vd. (2016) ve Zou vd. (2016) tarafından ise *B. thuringiensis*'in katı faz fermentasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır.

B. thuringiensis'in zararlı böcekler üzerinde etki göstermesi için hem spor sayısının hem de delta-endotoksin miktarının yüksek olması gerekir. Yüksek verimde spor kristal kompleksi elde etmek için besince zengin ve düşük maliyetli besiyeri ortamları geliştirilmiştir (Poopathi ve Abidha, 2009; Devidas vd., 2014a; Bhowmik vd., 2015). Kullanılan besiyeri ortamı ve bileşimi, *B. thuringiensis* suşlarının etkinliğini değiştirebilir (Tokcaer vd., 2006). Farklı kompozisyondaki besiyerlerinin δ -endotoksinlerin sentezini ve boyutunu etkileyerek Cry protein miktarını değiştirdiği belirtilmiştir (Farrera vd., 1998).

Bakteriler beslenmede karbon, azot, fosfor, potasyum, magnezyum gibi makrobesinlere, demir, bakır, çinko, krom, manganez gibi mikrobesinlere ihtiyaç duyarlar. *B. thuringiensis* karbon kaynağı olarak glukoz, fruktoz, maltoz, riboz, melas, nişasta, dekstrin, buğday unu ve inülin kullanır. Ancak, kullanılan suşa bağlı olarak, besiyerinde kullanılan karbon kaynağı δ -endotoksin sentezi üzerinde pozitif etki gösterdiği gibi negatif etki de gösterebilir (Özkan vd., 2003). Ayrıca, kullanılan karbon kaynağının konsantrasyonu da δ -endotoksin sentezini önemli ölçüde etkiler. Yüksek karbon konsantrasyonu vejetatif büyüme safhasının uzamasına ve toksin miktarının azalmasına neden olabilir (Banerjee-Bhatnagar, 1998).

Karbon kaynağı kadar besiyerindeki azot kaynağı da δ -endotoksin sentezini etkiler. Azot kaynağı olarak amonyum sülfat, sodyum nitrat, glutamat, üre, soya unu, balık unu, pamuk çekirdeği küspesi, peyniraltı suyu, baklagil tozu, pepton, kazaminoasit ve mısır maserasyon sıvısı gibi organik ve inorganik kaynakları kullanılabilir. Organik azot kaynaklarının sentetik azot kaynaklarından daha fazla biyokütle ve toksin üretimini desteklediği gözlenmiştir (Içgen vd., 2002a; Devidas vd., 2014b).

İnorganik fosfatlar spor-kristal üretimi için besiyerinde bulunması gereken önemli bileşenlerden biridir. Fosfatlar hem protein ekspresyonu hem de hücre büyümesi için gereklidir (Wakisaka vd., 1982; Banerjee-Bhatnagar, 1999; Kurt vd., 2005). Aynı zamanda yüksek sporulasyon ve delta-endotoksin üretimi için bazı metal iyonları da gereklidir. Metal iyonları holoenzimlerde kofaktör görevi görür ve enzim proteinlerinin aktivitesini etkiler, sonuçta organizmaların metabolik süreçlerini değiştirir. Yapılan çalışmalarda eser miktardaki metal iyonlarının kristal proteinlerinin sentezini teşvik ettiği veya baskıladığı belirlenmiştir (Kurt vd., 2005; Qiu vd., 2016).

1.6.2. Formülasyon

Formülasyon, bakteri tarafından üretilen spor ve kristallerin uygun sistemler kullanılarak insektisite dönüştürülmesi prosesidir. Formülasyonların ticari olarak başarılı olabilmesi için aşağıdaki şartları sağlaması gerekmektedir.

- Formülasyon sırasında insektisidal aktivite korunmalıdır.
- Kabul edilebilir bir raf ömrüne sahip olmalıdır. Ortalama 25°C sıcaklıkta 18-36 ay raf ömrüne sahip olmalıdır.
- Kolay uygulanabilir olmalıdır.
- Pazarlamada rekabet gücünü artırmak için ekonomik olmalıdır.
- Aktif bileşen, yağmurla yıkanma ve ultraviyole ışınlar gibi çevre koşullarına karşı dayanıklı olacak şekilde formülize edilmelidir.

Ticari insektisit formülasyonları genellikle sıvı, yağ ve katı ürünlerdir. Sıvı formülasyonların üretim maliyeti katı formülasyonlara nazaran daha azdır. Ancak, katı formülasyonlar sıvı formülasyonlara göre daha dayanıklıdır. Sıvı formülasyonlar yüksek sıcaklıktan ve ekzojenik kontaminantlardan kolaylıkla etkilenirler. Besiyerinin doğrudan konsantre edilmesi ile elde edilirler. Bu esnada bakteri ve toksinlerinin virulansının devamlılığı için koruyucu maddeler eklenir (Tablo 5).

Yağ formülasyonları, spor ve kristallerin mineral veya bitkisel yağ içerisinde tutundurulması ile elde edilen formülasyonlardır. Sıvı formülasyonların aksine yağ formülasyonları katı formülasyonlar gibi kararlıdır. Bu tip formülasyonlar yağ, jelleştirici madde, süspansiyon ajanları ve emülgatör içerirler. Spor ve kristaller, yağ içerisinde jelleştirici madde ve süspansiyon ajanı kullanılarak süspansiyonları elde edilir. Bu tip formülasyonlar emülgatör içeriğinden dolayı su ile kolaylıkla karıştırılarak uygulanabilir.

Katı formülasyonlar ise kullanımı en yaygın ürünlerdir. Katı formülasyonlar toz, ıslanabilir toz, suda dağılabilen granül, tablet, briket, pellet vb. şekillerde olabilirler. Toz formülasyonlar su ile karıştırılmadan direk kullanılan formülasyonlardır. Diğer katı formülasyonlar ise suda kolaylıkla dağılabilen formülasyonlardır. Katı formülasyonlar içerisinde ıslanabilir toz formülasyonlar, uzun saklama koşullarına sahip olması ve suyla kolayca karıştırılarak uygulanabilir olması nedeniyle biyoinektisit pazarında en çok tercih edilen ürünlerdir (Knowles, 2005; Brar vd., 2006). Bakterilerin katı formülasyonlarında kullanılan bazı maddeler Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 5. Entomopatojenik bakterilerin likit formülasyonlarında kullanılan maddeler

Katkı maddesi	Fonksiyon
Surfynol TGE	Dispersant
Bevaloid 211	Dispersant
Veegum	Askı maddesi
Ksantan Gam	Askı maddesi
Potasyum sorbat	Antifungusit
Sitrik asit	Stabilizör
Disodyum hidrojen fosfat	Stabilizör
Metil paraben	Antibakteriyel
Sodium klorit	Koruyucu
Metanol	Koruyucu
Gliserol	Kıvam artırıcı
Tween 80	Dispersant
Sorbitol	Anti-evaporant

Tablo 6. Entomopatojenik bakterilerin katı formülasyonlarında kullanılan maddeler

Katkı Maddesi	Fonksiyonu
Soya unu	Kaplama materyali, fagostimülant
Mısır unu	Kaplama materyali, fagostimülant
Maltodekstrin	Kaplama materyali
Nişasta	Kaplama materyali, fotoprotektan
Gam	Kaplama materyali
Killer	Kaplama materyali
Melas	Fagostimülant, fotoprotektan, yapıştırıcı
Lignin	Kaplama materyali, fotoprotektan
Sükroz	Fagostimülant, fotoprotektan
Titanyum dioksit	Fotoprotektan
Alüminyum tozu	Fotoprotektan
Triptofan	Fotoprotektan
Folik asit	Fotoprotektan
Kongo kırmızısı	Fotoprotektan
Hematoksilen	Fotoprotektan
Süt tozu	Fotoprotektan, Fagostimülant
Triton X	Yüzey aktif madde
Sorbitol	Yüzey aktif madde
Tween 80	Yüzey aktif madde

1.7.Taguchi Metodu

Bir üründe kaliteyi artırmak için, ürün kalitesine etki eden faktörlerin ele alınması ve bu faktörlerin düzeylerinin neler olabileceğinin iyi belirlenmesi gerekir. Kalite-faktör sayısı-düzeyler denklemi çalışanlar için en önemli problemlerden biridir. Çünkü, uygun faktör seviyeleri belirlenirken, çalışmacı birçok veriyi analiz etmek ve birçok faktör düzeyini dikkate almak zorundadır. Bu faktörler tek tek veya kombine olduklarında farklı sonuçlar verdiğinden durum daha da karışık bir hal almaktadır. Faktör ve düzey sayılarının artması ile klasik deney tasarım teknikleri (tam faktoriyel deney tasarımı vb.) her ne kadar daha sağlıklı veri analizine imkan sağlasa da deney sayısının artması zaman, emek ve maliyet açısından araştırmacıları pratik çözümlere yöneltmektedir.

Endüstride süreç gelişimi araştırmalarında yapılan deneyleri tasarlamak için en çok bilgiyi en kısa sürede, en az maliyet ve işgücüyle elde eden çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri de Japon mühendis Genichi Taguchi tarafından geliştirilen ve özellikle ürün tasarımında kullanılan Taguchi metodudur. Taguchi metodu farklı faktörlerin, farklı seviyeleri arasından en iyi kombinasyonu saptamak için oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Her bir faktörün, her bir seviyesini içeren tüm kombinasyonlar için oldukça fazla deneysel çalışma yapılması gereken durumlarda Taguchi yönteminde ortogonal dizi tablosu (Tablo 7) kullanılarak çok daha az sayıda deneysel çalışmayla sonuca ulaşmak mümkündür.

Taguchi yönteminde sisteme ait varyasyonu ölçmek için, Taguchi kayıp fonksiyonu olarak bilinen sinyal-gürültü oranı (Sinyal/Noise ratio) kullanılır. Hedeflenen değere bağlı olarak 3 farklı S/N oranı vardır. Bunlar;

-Küçük değer en iyi olduğu durumda:

$$S/N = -10 \log \left\{ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2 \right\}$$

-Nominal değer en iyi olduğu durumda:

$$S/N = -10 \log \left\{ \frac{\bar{y}^2}{S^2} \right\}$$

-Büyük değer en iyi olduğu durumda:

$$S/N = -10 \log \left\{ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right\}$$

Burada;

S/N : Sinyal gürültü oranını

n : Deney sayısını

y_i : Performans yanıtı

i : Gözlem değerini

S^2 : Gözlem değerinin varyansını

\bar{y} : Gözlem değerinin ortalamasını ifade eder.

Tablo 7. Taguchi ortogonal dizi seçim tablosu

		SEVİYE SAYISI			
		2	3	4	5
FAKTÖR SAYISI	2	L ₄	L ₉	L ₁₆	L ₂₅
	3	L ₄	L ₉	L ₁₆	L ₂₅
	4	L ₈	L ₉	L ₁₆	L ₂₅
	5	L ₈	L ₁₈	L ₁₆	L ₂₅
	6	L ₈	L ₁₈	L ₃₂	L ₂₅
	7	L ₈	L ₁₈	L ₃₂	L ₅₀
	8	L ₁₂	L ₁₈	L ₃₂	L ₅₀
	9	L ₁₂	L ₂₇	L ₃₂	L ₅₀
	10	L ₁₂	L ₂₇	L ₃₂	L ₅₀
	11	L ₁₂	L ₂₇		L ₅₀
	12	L ₁₆	L ₂₇		L ₅₀
	13	L ₁₆	L ₂₇		
	14	L ₁₆	L ₃₆		
	15	L ₁₆	L ₃₆		
	16	L ₃₂	L ₃₆		
	17	L ₃₂	L ₃₆		
	18	L ₃₂	L ₃₆		
	19	L ₃₂	L ₃₆		
	20	L ₃₂	L ₃₆		
	21	L ₃₂	L ₃₆		
	22	L ₃₂	L ₃₆		
	23	L ₃₂	L ₃₆		
	24	L ₃₂			
	25	L ₃₂			
	26	L ₃₂			
	27	L ₃₂			
	28	L ₃₂			
	29	L ₃₂			
	30	L ₃₂			
	31	L ₃₂			

Taguchi yöntemi başlangıçta sanayi ürünlerinin kalitesinin artırılması amacıyla geliştirilmesine rağmen günümüzde mühendislik, pazarlama, reklamcılık ve biyoteknoloji gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Son on yılda biyoteknoloji alanındaki uygulamaları yaygınlaşmıştır. Biyoteknoloji alanında özellikle mikrobiyal fermentasyonda, eczacılıkta, moleküler biyolojide, biyoremidasyonda, atıksu arıtımında vb. kullanımına yönelik birçok çalışma mevcuttur.

Taguchi metodu, mikrobiyal fermentasyonla enzim üretimine yönelik birçok çalışmada başarı ile uygulanmıştır. Chenthamarakshan ve ark. (2017) Taguchi yöntemi ile fermentasyon sürecinin optimizasyonunu gerçekleştirilerek *Marasmiellus palmivorus* fungusundan lakkaz üretimini 17 kat artırmayı başarmıştır. Wei ve ark. (2006) besiyerindeki iz elementlerin optimizasyonu ile *Bacillus subtilis* ATCC 21332 suşundan surfaktin üretiminin iki katına çıktığını gözlemlemiştir. Zarei ve ark. (2010) tarafından *Serratia marcescens* B4A suşundan optimal kitinaz üretimi için besiyeri pH'sı 7,9, inkübasyon sıcaklığı 30°C, besiyerindeki tuz konsantrasyonu %0,1 ve kitin konsantrasyonu %1 olarak belirlenmiştir.

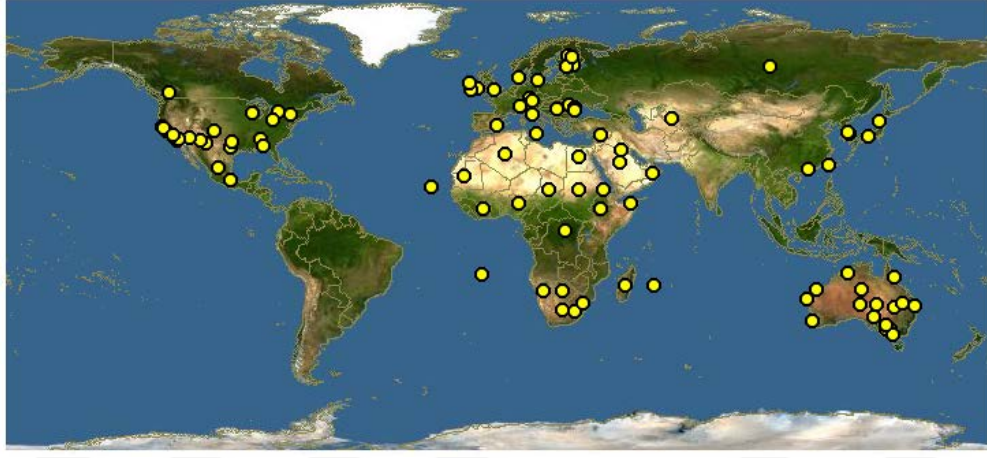
Bununla birlikte, moleküler biyoloji çalışmalarında kullanımına da rastlanmaktadır. Cobb ve Clarkson (1994) PCR koşullarını optimize ettiklerinde ürün miktarında önemli derecede artışlar gözlemişlerdir. Bunun dışında Taguchi yöntemi Bakülovirus ekspresyon sisteminde protein ekspresyonunda (Burch vd., 1995), DNA amplifikasyonu ve fingerprintte (Caetano-Anollés vd., 1999), 2D jel elektroforezinin protokol optimizasyonunda (Khoudoli vd., 2004) başarı ile kullanılmıştır. Method ayrıca sağlık endüstrisinde tümör tanımlamasında (Sudharsan ve Ng 2000), antikor üretiminde (Kallel vd., 2002; Tanfous vd., 2006), aşı üretiminde (Trabelsi vd., 2006) ve ELİSA prosedürünün optimizasyonunda (Jeney vd., 1999) kullanılmıştır.

Assadpour ve Jafari (2016) tarafından püskürtmeli kurutma yöntemi optimize edilerek toz folik asit üretimi için gerekli optimum koşullar belirlenmiştir. Emami vd. (2015) antienflamatuvar etkisi olan bir kortikosteroid olan budesonidin toz formülasyonunun optimizasyonunu Taguchi yöntemi ile gerçekleştirmiştir. Saydi ve Hatamipour (2012) patates suyunu sprey kurutucu ile toz hale getirmek için yaptıkları çalışmada sprey kurutucunun giriş sıcaklığının, besleme ve hava akış hızının patates tozu üretiminde etkili faktörler olduğunu belirlemiştir.

1.8. Çizgili Yaprakkurdu, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

1.8.1. Coğrafik Dağılım

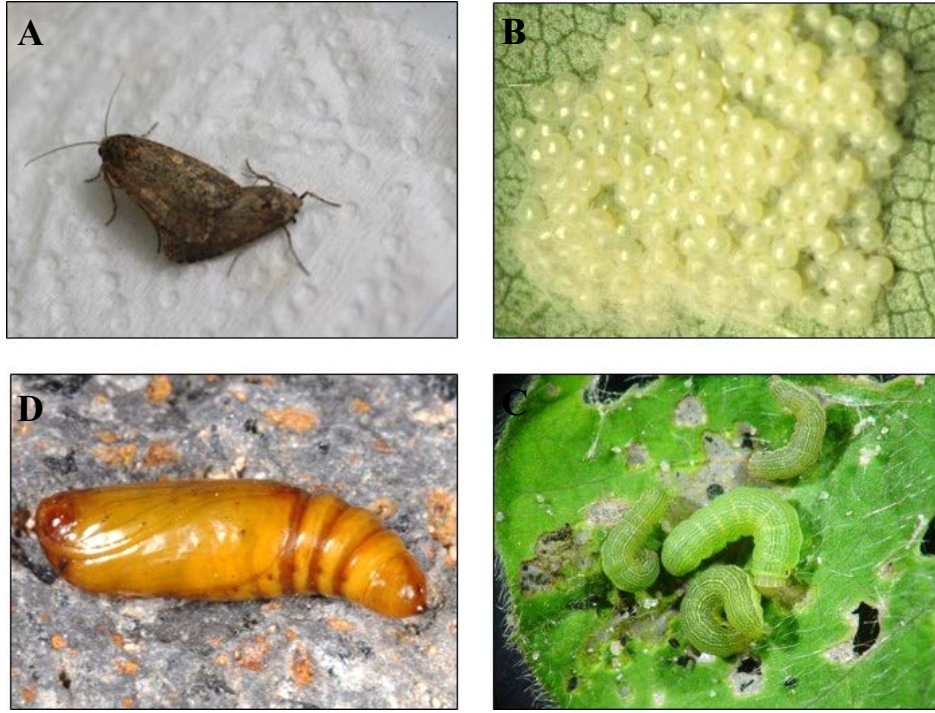
Çizgili yaprakkurdunun Güneydoğu Asya orijinli olduğu düşünülmektedir. Yüksek göç ve adaptasyon yeteneği nedeniyle Asya'dan dünyanın birçok bölgesine yayılmıştır (Şekil 5). Zararlıının coğrafik dağılımı 64° ve kuzey 45° güney enlemleri arası olarak belirlenmiştir (Xia-Ling vd., 2011).



Şekil 5. Çizgili yaprakkurdunun dünyadaki coğrafik dağılımı

1.8.2. Morfolojisi

Halk arasında karadrina olarak bilinen çizgili yaprakkurdu erginlerinin kanat açıklığı 26-32 mm kadardır. Kanatlar üzerinde zikzaklı çizgiler bulunur. Ön kanatta biri böbrek diğeri daire şeklinde olan kahverengi, iki leke vardır. Dişiler erkeklere göre daha iri yapılı ve daha koyu renklidir. Yumurtası 0.4 mm çapında, beyaz renkli ve üzerleri pullarla örtülüdür. Üstten hafifçe basık olup gözle görülebilir. Yumurtadan yeni çıkan larvalar 1 mm boyunda, soluk yeşil renkli olup, baş siyah ve vücuda oranla büyüktür. Olgunlaşan larvaların renkleri, konukçu bitkiye ve gelişme dönemlerine göre değişiklik göstermekle birlikte, genelde yeşilimsi kahverengi bir görünüştedirler. Sırtta ve yanlarda baştan sona kadar uzanan beyazımsı bir şerit bulunur. Olgun larvanın boyu son dönemde 30 mm'ye kadar ulaşabilir. Pupası ise 1 cm boyunda ve açık kahverengidir. Pupanın uç kısmında birbirlerinden uzakta iki tane dikenimsi çıkıntısı vardır (Şekil 6).



Şekil 6. Çizgili yaprakkurdunun ergin (A), yumurta (B), larva (C) ve pupası (D)

1.8.3. Hayat Döngüsü

Kelebekler pupadan çıktıktan sonra çiftleşir ve 2-3 gün içerisinde yumurta bırakır. Yumurtlama 3-7 gün sürebilir. Kelebekler yaklaşık 9-10 gün yaşar. Erginler yumurtalarını yapraklara kümeler halinde bırakır. Bir dişi kelebek hayatı boyunca 300-600 yumurta bırakır. Yumurtalar 2-4 günde açılır ve çıkan larvalar yaklaşık 5 gün toplu beslenir. Beslenerek olgunlaşan larvalar bitkilere yayılarak yalnız beslenirler. Larvalar gece beslenir, gündüzleri ise bitkinin gölge ve nemli kısımlarında saklanırlar. Larva dönemi 9-12 gün sürer ve olgunlaşan larva toprak içerisinde 4-7 cm derinliklerde, yüksük şeklinde bir odacık yaparak burada pupa olur. Pupa dönemi 7-8 gün kadardır. Pupadan çıkan ergin bireyler çiçek nektarlarını emerek beslenir ve ömrü 6-8 gün kadardır. Zararlı hayat döngüsünü bu şekilde yaklaşık 21 günde tamamlar.

1.8.4. Ekonomik Önemi

S. exigua 10 farklı familyadan 50'den fazla bitki türüyle beslenmektedir (Smits vd., 1987). Konukçuları arasında pamuk, mısır, yer fıstığı, şeker pancarı, ayçiçeği, tütün, yonca, üzüm, domates, patlıcan gibi önemli kültür bitkileri yer alır. Zararlı, bitkiler 4-6 yapraklı

dönemde iken zarar yapmaya başlar. Larvalar başlangıçta bitkinin alt yaprakları ile beslenirken, daha sonra bütün bitkiye yayılarak ana damarları hariç tüm yaprakları yerler (Şekil 7). Bazen larvalar hep birlikte toplu olarak göç ederler ve kısa sürede ortamdaki tüm bitkileri yok edebilirler.

Zarar derecesi bitkinin fenolojik dönemine, zararlının biyolojisine ve yoğunluğuna bağlı olarak büyük farklılıklar gösterir. Özellikle geniş spektrumlu kimyasal pestisitler kullanılan bölgelerde zararlının doğal düşmanları yok olduğundan, zararlı salgın yapabilmektedir. Zararlı ile mücadele yapılmadığı takdirde ürün kaybı %100'e ulaşabilir.



Şekil 7. *Spodoptera exigua*'nın zararı

1.8.5. Mücadelesi

Zararlı ile mücadelede ülkemizde genellikle kimyasal insektisit kullanılmaktadır. İlaçlama için, bitkinin 2-4 ve 4-6 yapraklı gelişme dönemlerinde tarlayı temsil edecek şekilde 5 noktada sıra üzerindeki yan yana 5'er bitki olmak üzere toplam 25 bitki kontrol edilerek larvalar sayılır ve bitki başına ortalama 2 larva olduğunda ilaçlama yapılır. İsektisit uygulaması günün serin saatlerinde yeşil aksam ilaçlaması şeklinde gerçekleştirilir. Zararlı ile mücadelede T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yayınlanan teknik talimatnamede güvenli olarak tavsiye edilen lufenuron veya teflubenzuron içerikli insektisitler kullanılır (Mısır Entegre Mücadele Teknik Talimatı, 2011).

Zararlıının biyolojik mücadelesinde zararlıının doğal düşmanlarının belirlenmesi, korunması ve etkinliğinin artırılmasına yönelik bazı çalışmalar yapılmıştır (Cabellaro vd., 1990; Tingle vd., 1994; Carpenter, 1995). Ülkemizde Diyarbakır ili pamuk alanlarında yapılan çalışmalarda *S. exigua*'nın predatörü olarak *Geocoris pallidipennis* (C), *Nabis pseudoferus* Rem., *Nabis rugosus* L., *Chrysoperla carnea* (Steph.), *Coccinella septempunctata* L.; parazitoiti olarak *Temelucha decorata* (Grav.) ve *Barylypa pallida* (Grav.) türleri saptanmıştır (Göven ve Gümüş, 1998). Ayrıca, Atlıhan vd. (2003) tarafından Van ili patates alanlarında yapılan çalışmada *S. exigua*'nın Hemiptera, Coleoptera, Neuroptera ve Hymenoptera takımlarına bağlı 12 doğal düşmanı saptanmıştır. Çizgili yaprakkurdunun ülkemizde tespit edilen doğal düşmanları Tablo 8'de belirtilmiştir.

Tablo 8. Zararlıının doğal düşmanları

Predatörler	Takım ve Familya
<i>Chrysoperla carnea</i>	Neu.: Chrysopidae
<i>Coccinella septempunctata</i>	Col.: Coccinellidae
<i>Orius niger</i>	Hem.: Anthocoridae
<i>Orius minutus</i>	Hem.: Anthocoridae
<i>Nabis pseudoferus</i>	Hem.: Nabidae
<i>Nabis rugosus</i>	Hem.: Nabidae
<i>Nabis punctatus</i>	Hem.: Nabidae
<i>Geocoris</i> spp	Hem.: Lygaeidae
Parazitoidler	Takım ve Familya
<i>Microplitis tuberculifer</i>	Hym.: Braconidae
<i>Sinophoris xanthostomus</i>	Hym.: Braconidae
<i>Chelonus oculator</i>	Hym.: Braconidae
<i>Meteorus ictericus</i>	Hym.: Braconidae
<i>Microbracon</i> spp	Hym.: Braconidae
<i>Hyposoter didymator</i>	Hym.: Ichneumonidae
<i>Temelucha decorata</i>	Hym.: Ichneumonidae
<i>Exorista xanthaspis</i>	Dip.: Tachinidae

Zararlıya karşı *B. thuringiensis* tarafından üretilen toksin proteinler (Cry ve Vip) laboratuvar şartlarında denenmiştir (Xue vd. 2005; Zhu vd. 2006; Hernández-Martínez vd. 2008). Ülkemizde ise Kornoşor ve Oyartı (1989) *B. thuringiensis* içerikli ticari preparatı zararlıının larvalarına karşı laboratuvar ve arazi şartlarında denemiş ilk 24 saatte bakteriyal preparatın az veya hiç etkili olmadığını, 48 saat sonra etkinliğinin arttığını ve 72 saatten

sonra daha etkili olduğunu görmüştür. Ancak mikrobiyal mücadele kapsamında ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalar bunlarla sınırlı kalmıştır. Pratikte uygulamaya geçilememiştir. Zararlı ile mücadelede ülkemizde bir biyopestisit üretilip bunun ticari preparat haline getirilmesi zorunluluk haline gelmiştir.

1.9. Çalışmanın Amacı

Çizgili yaprakkurdu (*Spodoptera exigua* Hübner, Lepidoptera: Noctuidae) ülkemiz tarım alanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olan polifag bir zararlıdır. Bu nedenle zararlının populasyon seviyesini ekonomik zarar eşiğinin altında tutmak önemli bir konudur. Bu tez çalışmasının amacı da ülkemiz ve dünya tarım alanlarında çok büyük zararlara yol açmaya devam eden *Spodoptera exigua*'nın kültür edilebilir bakteriyel florasını belirlemek ve bunların, zararlıya karşı mikrobiyal mücadelede kullanılma potansiyellerini araştırmaktır. Ayrıca, mikrobiyal mücadelede kullanılma potansiyeli yüksek olduğu belirlenen izolatın ıslanabilir toz formülasyonunun Taguchi metodu ile optimize edilerek üretilmesidir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çizgili Yaprakkurdu (*Spodoptera exigua*)’nun Toplanması

Çalışma için gerekli olan *Spodoptera exigua* (Karadrina) larvaları 2014-2015 yılları Mayıs-Temmuz ayları arasında Osmaniye ilindeki mısır tarlalarından toplandı. Larvalar, toplandıkları yer ve tarih not edildikten sonra, özel kaplara konularak laboratuvara getirildi. Larvaların makroskobik incelemeleri yapılarak ölü ve sağlıklı larvalar ayrıldı. Ölü larvalar steril kaplara konularak +4°C’de saklandı. Sağlıklı larvalar ise ayrı kaplara konularak taze mısır gövdeleri ve koçanları ile beslenmeye devam edildi.

2.2. Çizgili Yaprakkurdu’ndan Kültür Edilebilir Bakterilerin İzolasyonu

Laboratuvara getirilen *S. exigua* larvalarından rastgele seçim ile 20 adet larva alınarak steril petri kapları içerisinde %70’lik etil alkol ile yüzey sterilizasyonu gerçekleştirildi. Sonra içerisinde steril saf su bulunan petrilere alınarak 2-3 kez yıkanıp, alkolden arındırıldı. Larvalar 1 ml nütrient sıvı besiyeri bulunan ependorflarda steril bir homojenizatör yardımıyla ezildi. Elde edilen karışım steril tülbent vasıtasıyla süzüldü. Bu karışımdan 10 µl ve 50 µl alınarak ayrı ayrı nütrient agar besiyerine yayma ekim yapıldı.

Ayrıca, *Bacillus* cinsi bakterilerin izolasyonu için karışımdan 1 ml alınıp, 80°C’de 10 dakika bekletildi. Bundan da 10 µl ve 50 µl alınarak ayrı ayrı nütrient agar besiyerine yayma ekim yapıldı. Nütrient agar besiyerine yapılan ekimlerin hepsi 30°C’lik etüvde 2-3 gün süreyle inkübe edildi.

2.3. Saf Kültürlerin Hazırlanması ve Stoklanması

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

2.4. Bakteriyel İzolatların Fenotipik Özellikleri

2.4.1. Makroskopik Özellikler

İzolatların nütrient agar üzerindeki koloni renkleri ve koloni şekilleri incelenerek makroskopik özellikleri belirlendi.

2.4.2. Mikroskopik Özellikler

İzolatların hücre şekli, gram boyama, spor boyama ve hareketlilik özellikleri belirlendi. Lam-lamel arası preperasyon yöntemiyle izolatların hücre şekilleri belirlendi. Daha sonra izolatlardan smear hazırlanarak gram boyama ve spor boyamaları gerçekleştirildi. Boyaması gerçekleştirilen preparat mikroskop altında incelendi. Gram boyama sonucu mor renkle boyanan bakterilerin gram pozitif, pembe renk ile boyanan bakterilerin ise gram negatif olduğuna karar verildi (Claus, 1992). Spor boyamada ise kırmızı renkli hücreler içersinde yeşile boyanmış sporların varlığı araştırıldı (Reynolds vd., 2009).

2.4.3. Biyokimyasal Özellikler

İzolatların biyokimyasal özellikleri VITEK-2 test panelleri yardımıyla gerçekleştirildi. Bakterilerin asidifikasyon, alkalinizasyon, enzim hidrolizi gibi çeşitli metabolik aktiviteleri belirleyen ve geniş bir veritabanı üzerinde tanımlanmalarını sağlayan bu sistemde, spor oluşturan gram pozitif basiller için BCL, gram pozitif koklar ve spor oluşturmayan gram pozitif basiller için GP, gram negatif fermentatif ve non-fermantatif basiller içinse GN kartları kullanılır.

Test için izolatlar triptik soy agar besiyerine ekildi ve 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra steril bir swap yardımıyla alınan bakteri %0,5'lik 3 ml steril tuz solusyonuna aktarılarak süspansiyon haline getirildi. McFarland bulanıklık aralığı BCL için 1.80-2.20, GN ve GP kartları içinse 0.50-0.63 olacak şekilde ayarlandı ve süspansiyonlar kasetlere yerleştirildi. Kartlar da süspansiyonlara yerleştirilerek barkodları bilgisayar sistemine tanıtıldı ve cihazın otomatik taşıyıcı sistemine yüklendi. Yaklaşık 14-15 saat sonra sonuçlar alındı.

2.4.4. Büyüme Özellikleri

İzolatların besiyeri tercihi, sıcaklık toleransı, tuz toleransı ve pH toleransı belirlendi. İzolatların besiyeri tercihinin belirlenmesinde triptik soy broth, nutrient broth ve luria bertani broth besiyerleri kullanıldı. Sıcaklık toleransını belirlemek için izolatlar triptik soy broth besiyerine inoküle edilerek, 20, 30, 37, 45 ve 55°C’de inkübe edildi. Tuz toleransını belirlemek için izolatlar %3, %5, %7 ve %9’luk sodyum klorür içeren triptik soy broth besiyerine inoküle edilerek inkübe edildi. Ph toleransını test etmek için ise, bakteriler pH3, pH5, pH7 ve pH9 olan besiyerlerinde inkübe edildi.

Yapılan çalışmalarda besiyerlerine $OD_{600} = 0,1$ olacak şekilde bakteri inokülasyonu gerçekleştirildi ve 48 saat boyunca belirli aralıklarla spektrofotometrede OD_{600} ’de absorbans değerleri ölçülerek bakterilerin büyüme özellikleri belirlendi (Cappuccino ve Sherman, 2011).

2.5. Bakteriyel İzolatların Genotipik Özellikleri

2.5.1. Genomik DNA İzolasyonu

İzolatlardan genomik DNA izolasyonu, DNA pürifikasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi (Fungal/Bacterial DNA Miniprep, Zymo Research). 100 mg bakteri hücresi 200 µl steril distile suda çözülürken 750 µl lizis buffer içeren “ZR BashingBead™ Lysis Tube” içerisine aktarıldı ve parçalayıcı yardımıyla hücrelerin parçalanması sağlandı. Karışım 10.000×g’de 1dk santrifüj edilerek hücre kalıntıları uzaklaştırıldı ve 400 µl süpernatant “Zymo-Spin™ IV Spin Filter”a aktarılarak 7,000×g’de 1 dk santrifüj edildi. Filtrata 1200 µl “Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer” ilave edildi. Elde edilen karışım 10.000×g’de 1dk santrifüj edilerek “Zymo-Spin™ IIC Column”dan geçirildi. Kolon önce 200 µl DNA Pre-Wash Buffer ile daha sonra 500 µl “Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer” ile yıkandı. Kolona 100 µl “DNA Elution Buffer” eklenerek oda sıcaklığında 2 dk bekletildi. 10.000×g’de 30 s santrifüj edilerek DNA elde edildi ve 4 °C’de muhafaza edildi.

2.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile 16S rRNA Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Genomik DNA'ları izole edilen bakteriyel izolatların 16S rRNA dizileri, 5'-ATGGTACCGTGTGTGACGGGCGGTGTGA-3' (ileri) ve 5'- ATTCTAGAGTTT GATCATGGCTCA-3'(geri) primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı. PCR işleminde GoTaq DNA Polymerase (New England Biolabs) enzimi kullanıldı. Enzim koşullarına göre reaksiyon, 5 µl 10X Standard *Taq* Reaction Buffer, 3 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP, 1 µl 10 µM ileri primer, 1 µl 10 µM geri primer, 0.5 µl *Taq* DNA polimeraz, 2 µl 20 ng DNA ve 35,5 µl steril distile su kullanılarak 50 µl'lik reaksiyon kuruldu. PCR programı Tablo 9'daki şekilde "Bio-Rad Thermal Cycler" ile gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (Gel Logic, Kodak) ile görüntülendi.

Tablo 9. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan PCR koşulları

PCR Döngüsü	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç Denaturasyonu	95°C	30 s.	1
Denaturasyon	95°C	30 s.	
Bağlanma	55°C	30 s.	35
Uzama	68°C	1 dk.	
Son Uzama	68°C	5 dk.	1

2.5.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin pGEM-T Vektörüne Ligasyonu

PCR ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgelerinin pGEM-T (Promega) vektörüne ligasyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon, 10 µl 2X Rapid Ligation Buffer, 8 µl insört DNA, 1 µl pGEM-T vektör ve 1µl T4 DNA ligaz olacak şekilde oluşturuldu ve 16 °C'de gece boyu bekletildi. Daha sonraki işlemlerde kullanmak üzere 4 °C'de saklandı.

2.5.4. Kompetent Hücre Hazırlanması

Bir gün önceden petriye ekilmiş *Escherichia coli* DH10β suşundan 5 ml Leura-Bertani (LB) besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de gece boyunca büyümeye bırakıldı. Bu kültürden 1 ml alınarak 100 ml LB besiyerine aşılandı. Hücreler, 37°C'de en az 2 saat, 600 nm dalga boyunda 0,4 olana kadar inkübasyona devam edildi. İstenilen yoğunluk elde edildiğinde

süspansiyonun tamamı steril falkon tüpe boşaltıldı ve 15 dk buzda bekletildi. Karışım 6.000 g'de 5 dk soğutmalı santrifüjde 4 °C'de santrifüj edildikten sonra oluşan pellet 10 ml soğuk FSB ile çözdürüldükten sonra 15 dakika buzda bekletildi. Bu işlemler 3 kez tekrar edildi. En son elde edilen pellet 3 ml soğuk FSB ile çözdürülerek 100'er µl olacak şekilde steril ependorf tüplere dağıtıldı. Kompotent hücreler kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

2.5.5. 16S rRNA Gen Bölgelerinin Kompotent Hücreye Aktarımı

Steril ependorfa 100 µl kompotent hücre ve 10 µl ligasyon ürününden koyulup 30 dk buzda bekletildi. Daha sonra 45 °C'de 2 dk ısıyla muamele edildikten sonra 1 ml LB besiyeri ilave edilip, 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 6.000 g'de 3 dk santrifüj edildi. Yaklaşık 50 µl kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet dikkatli bir şekilde çözdürüldü. LB^{Amp} agar besiyerine 40 µl X-Gal (40 mg/ml), 40 µl IPTG (24 mg/ml) ve transform olmuş hücre yayma ekim yapıldı. Petriler 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

2.5.6. Koloni PCR ile Transformasyonun Doğrulanması

Transformasyonda içerisine plazmid alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçildi ve koloni PCR gerçekleştirildi. PCR, 2,5 µl 10X Standard *Taq* Reaction Buffer, 2,5 µl 50 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl 10 µM ileri primer, 0,5 µl 10 µM geri primer, 0,1 µl *Taq* DNA Polimeraz ve 18,4 µl steril distile su kullanılarak 25 µl'lik reaksiyon kuruldu. PCR koşulları Tablo 9'da belirlenen şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (Gel Logic, Kodak) ile görüntülendi ve plazmidi içeren klonlar doğrulandı.

2.5.7. Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve DNA Dizi Analizi

Transformasyon sonucunda 16s rRNA gen bölgesini içerdiği doğrulanan kolonilerden, içerdikleri plazmid DNA'larını izole etmek için LB^{Amp} sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyu inkübe edildi. Plazmid izolasyon kiti (Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System) kullanılarak plazmid DNA'larının izolasyonu

gerçekleştirildi. Gece kültürleri 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant tamamen uzaklaştırılarak hücreler 250 µl "Cell Resuspension Solution" ile çözdürüldü. Üzerine 250 µl "Cell Lysis Solution" eklenerek 4-6 kez alt üst edildi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Endonükleaz ve proteinlerin inaktivasyonu için 10 µl alkalın proteaz eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyondan sonra "Neutralization Solution" eklenerek tüpler hemen alt üst edildi. Bakteriyel lizat maksimum hızda oda sıcaklığında 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant maksimum hızda 1dk santrifüj edilerek "Wizard SV Minicolumn"dan geçirildi. Kolon 750 µl "Column Wash Solution" ile 2 kez yıkandı. Kolona 50 µl "DNA Elution Buffer" eklenerek oda sıcaklığında 2 dk bekletildi. Maksimum hızda 1 dk santrifüj edilerek plazmid DNA'ları elde edildi. Plazmidlerin yoğunlukları nanodrop ile ölçüldü. Plazmidler DNA dizilerinin edilmesi için Macrogen firmasına (Hollanda) gönderildi.

2.5.8. Elde Edilen Baz Dizilimlerinin İncelenmesi

Sekans sonucunda elde edilen 16S rRNA gen bölgesinin baz dizilimi GenBank veritabanındaki benzerleri ile karşılaştırıldı. İzolatların 16S rRNA dizileri için GenBank erişim numarası alındı ve Mega 6.0 programı kullanılarak Neighbor-Joining analizi ve Bootstrap metodu (1000 tekrarlı) ile filogenetik ağacı çizildi, ağaçta %70'in üzerindeki benzerlikler gösterildi. Sonuçlar değerlendirildi.

2.6. Bakteriyel İzolatların İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

2.6.1. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

S. exigua'dan izole edilen ve karakterizasyonları yapılan izolatlar, 5 ml nütrient sıvı besiyerine inoküle edilerek 30°C'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 6000×g'de 10 dakika santrifüj edilerek besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Pellet birkaç kez steril su ile yıkandı. Yıkamalardan sonra hücrelerden oluşan pellet 3 ml steril suda çözüldü. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometrede ölçülerek OD₆₀₀'de 1,89 (1,8×10⁹ bakteri/ml) olacak şekilde ayarlandı (Ben-Dov vd., 1995).

2.6.2. Tarama Testleri

Uygun konsantrasyonlarda hazırlanan izolatlar, marul yapraklarına bulaştırılarak oda sıcaklığında kurutuldu. Bakteri bulaştırılan marul yaprakları 3-4 saat aç bırakılmış, sağlıklı 3. evre *S. exigua* larvalarına besin olarak verildi. Deneyde 30 adet larva kullanıldı ve larvalar kannibalizmi engellemek için ayrı ayrı kutularda beslendi. Deney düzenekleri 28°C’de 12:12 ışık periyodunda ve %60 nem ortamında gerçekleştirildi ve 10 gün boyunca günlük takip edildi. Kontrol grubunda steril su kullanıldı. Tüm denemeler 3 tekrarlı gerçekleştirildi ve 10 gün sonunda ölüm oranları Abbott formülüne göre hesaplandı (Abbott, 1925).

2.6.3. Doz Denemeleri

Tarama testleri sonucunda *S. exigua* üzerinde yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenen *Bacillus thuringiensis* Se13 suşunun zararlı üzerinde doz denemeleri yapıldı.

Bacillus thuringiensis Se13 suşu, sporlanmayı ve kristal üretimini teşvik eden, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, ZnSO₄, FeSO₄ ve MnSO₄ eklenerek hazırlanan TSA besiyerinde 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonucu oluşan koloniler steril spatül yardımı ile besiyerinden alınarak 1M NaCl çözeltisinde süspansiyon edildi. Süspansiyon 6000 rpm’de 10 dk santrüj edildi. Elde edilen pellet 2 kez daha tuz çözeltisi ile yıkandı. Son yıkamadan sonra pellet steril su ile çözdürüldü ve 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴ ve 10³ cfu/ml konsantrasyonlarda spor-kristal süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan süspansiyonlar ile 2.6.2’de belirtilen koşullarda biyotestler gerçekleştirildi.

2.7. *B. thuringiensis* Se13 suşunun İnsektisidal Aktivite Özellikleri

2.7.1. İnsektisidal Kristal Proteinlerin Mikroskobisi

B. thuringiensis Se13 suşu TSA besiyeri içerisinde 4-5 gün inkübe edildi. Elde edilen spor-kristal karışımları 1 M’lık NaCl’de süspansiyon edildi. Daha sonra bu karışım 13000×g’de 4 °C’de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet steril ddH₂O ile iki kez yıkandı.

Spor-kristal karışımından bakteriyel smear hazırlanarak fikse edildi. Smear Buffalo Black ile 70 s boyandı. Ardından saf su ile yıkanarak 20 sn Karbon fuchsin ile boyandı. Boyanın fazlası saf su ile akıtılarak smear kurumaya bırakıldı. Koyu mavi renkte kristaller ile pembe renkte sporlar ışık mikroskobunda görüntüledi.

Elde edilen spor-kristal karışımı 1/100 oranında seyreltilerek, 10 µm örnek straplara yayıldı ve bir gece 37°C'de kurumaya bırakıldı. Kuruyan strapların üzeri altın ile kaplanarak taramalı elektron mikroskopunda incelendi.

2.7.2. PCR ile Toksin Genlerinin Araştırılması

Zararlı üzerinde gerçekleştirilen tarama ve doz denemeleri sonucunda elde edilen bilgiler ışığında *B. thuringiensis* Se13 suşunun insektisidal aktivitesinden sorumlu olabilecek toksin genlerinin varlığı Tablo 10'de belirtilen primerler kullanılarak PCR ile belirlendi.

Tablo 10. Toksin genlerinin varlığını taramada kullanılan primerler

Gen	Primer sekansı (5' -> 3')	Bağlanma Sıcaklığı T _m (°C)
<i>cry1</i> (277 bp)	CATGATTCATGCGGCAGATAAAC (f)	55
	TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT (r)	
<i>cry2</i> (701 bp)	GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG (f)	52
	CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT (r)	
<i>cry3</i> (604bp)	CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC (f)	54
	CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT (r)	
<i>cry4</i> (439 bp)	GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC (f)	59
	GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC (r)	
<i>cry5</i> (474 bp)	TTACGTAAATTGGTCAATCAAGCAAA (f)	52
	AAGACCAAATTCAATACCAGGGTT (r)	
<i>cry7</i> (420 bp)	AAGCAGTGAATGCCTTGTTTAC (f)	49
	CTTCTAAACCTTGACTACTT (r)	
<i>cry9</i> (359 bp)	CGGTGTTACTATTAGCGAGGGCGG (f)	60
	GTTTGAGCCGCTTCACAGCAATCC (r)	
<i>cry11</i> (305 bp)	TTCCAACCCAACTTTCAAGC (f)	51
	AGCTATGGCCTAAGGGGAAA (r)	
<i>vip1</i> (1400 bp)	GGATCCCAAACAAATCAGCTTTCTACAGC (f)	54
	AAGCTTCTAATTTTTCACTTTCATAGCTGAAAC (r)	
<i>vip2</i> (1400 bp)	GGATCCATGAAAAGAATGGAGGAACGCTTG (f)	55
	AAGCTTTTATTTTGTTAATAATGTAGCATCGACCA (r)	
<i>vip3</i> (1400 bp)	GGCTCCATGAACAAGAATAATACTAAATTAAGC (f)	50
	GAATTCTTACTTAATAGAGACATCGTAAAAATG (r)	

f: ileri primer; r: geri primer

PCR ile varlığı belirlenen gen bölgelerinin pGEM-T vektörüne ligasyonu gerçekleştirilerek *Escherichia coli* DH10β kompotent hücrelerine transforme edildi. Oluşan beyaz kolonilerden alınarak transformasyonu doğrulamak amacıyla koloni PCR

gerçekleştirildi. PCR sonrası istenilen geni içeren kolonilerden plazmid izolasyonu gerçekleştirilerek sekansa gönderildi. Sekans sonucu elde edilen diziler benzerleriyle karşılaştırıldı ve MEGA 6.0 yazılımı ile filogenetik ağaçları çizildi.

2.7.3 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

2.7.1’de hazırlanan spor-kristal karışımının protein konsantrasyonu Bradford (1976) yöntemine göre belirlendi. Miktarları tayin edilmiş olan protein numunelerinden eşit konsantrasyonda alındı ve numunelere muamele tamponu (60 mM Tris-HCl (pH 6,8), %25 Gliserol, %2 SDS, %5 2-merkaptoetanol, %0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra kaynayan su içerisinde 10 dakika bekletildi. Daha sonra Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %10’luk SDS-PAGE’e yüklendi. Jele 80 V akım uygulanarak ayrılma işlemi gerçekleştirildi.

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

2.8. Fermentasyon Koşullarının Optimizasyonu

2.8.1. Başlangıç Kültürünün Hazırlanması

Fermentasyon çalışmalarında kullanılacak *B. thuringiensis* Se13 izolatının bakteriyel büyüme eğrisi belirlendi. Bunun için izolatın en iyi büyüebildiği triptik soy broth besiyerine (100 ml) $OD_{600}=0,1$ olacak şekilde bakteri inokülasyonu gerçekleştirilerek, bakteri yoğunluğu spektrofotometre (OD_{600}) ile ölüm safhası gözlenene kadar 1’er saat arayla ölçüldü. Logaritmik büyüme fazı belirlenerek bu safhasındaki hücreler başlangıç kültürü olarak kullanıldı.

2.8.2. Deneysel Tasarım-1

İlk önce spor-kristal üretiminin maksimum olduğu fermentasyon besiyeri, başlangıç pH'sı, inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi Taguchi yöntemi ile belirlendi. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve içerikleri Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Optimizasyon çalışmalarında kullanılan besiyerleri ve içerikleri

Besiyerler			
M1	M2	M3	M4
Dekstroz (%1,5)	Nişasta (%1,5)	Glukoz (%4)	Soya (%2,5)
Cottonseed flour (%1)	Yeast (%1)	Yeast (%1,5)	Glukoz (%2,5)
Pepton (%0,2)	Corn steep liquor (%0,2)	Corn steep liquor (0,4)	K ₂ HPO ₄ (%0,3)
Yeast (%0,2)	CaCO ₃ (%0,8)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%0,4)	KH ₂ PO ₄ (%0,3)
CaCO ₃ (%0,1)	NaPO ₂ H ₂ (%0,4)	MgSO ₄ (%0,06)	MgSO ₄ (%0,4)
MgSO ₄ (%0,03)		FeSO ₄ (%0,06)	
FeSO ₄ (%0,002)		ZnSO ₄ (%0,001)	
ZnSO ₄ (%0,002)		MnSO ₄ (%0,01)	
		CaSO ₄ (%0,001)	

Spor-kristal verimine etki eden faktörler ve seviyeleri Tablo 12'deki gibi belirlendi. Dört faktörün dört farklı seviyesi için Taguchi L₁₆ ortogonal düzlemi kullanıldı (Tablo 13). Hazırlanan besiyerlerine (100 ml) 1 ml başlangıç kültürü inoküle edilerek Tablo 13'de belirlenen koşullarda fermentasyon gerçekleştirildi.

Tablo 12. Optimizasyonda kullanılan faktörler ve seviyeleri

Faktörler	Seviye 1	Seviye 2	Seviye 3	Seviye 4
İnkübasyon süresi	48 saat	72 saat	96 saat	120 saat
İnkübasyon sıcaklığı	25°C	30°C	34°C	37°C
Başlangıç pH'sı	6	7	8	9
Besiyeri	M1	M2	M3	M4

Tablo 13. L₁₆ Taguchi Tasarımı

Deney	İnkübasyon süresi	İnkübasyon sıcaklığı	Başlangıç pH'sı	Besiyeri
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	1	4	4	4
5	2	1	2	3
6	2	2	1	4
7	2	3	4	1
8	2	4	3	2
9	3	1	3	4
10	3	2	4	3
11	3	3	1	2
12	3	4	2	1
13	4	1	4	2
14	4	2	3	1
15	4	3	2	4
16	4	4	1	3

2.8.3. Canlı Spor Sayısının Belirlenmesi

İnkübasyon sonunda her bir besiyerinden 1 ml örnek alındı. Örneklerden seri dilüsyon yöntemi ile 10^{-7} 'ye kadar seyreltikler hazırlandı ve 80°C'de 15 dakika bekletildi. Seyreltiklerden 0.1 ml alınarak Mueller-Hinton agar besiyerine yayma ekimi gerçekleştirildi. Petriler 30°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 30-300 arası koloni olan petriler belirlenerek sayımları yapıldı. Deney 3 kez tekrar edildi ve ortalamaları alındı. Sonuçta, besiyerilerindeki canlı spor sayısı cfu/ml olarak belirlendi.

2.8.4. Deney Tasarımı-2

Birinci deney tasarımından sonra M4 besiyeri maksimum spor üretimi için en uygun besiyeri olarak belirlendi. Bu besiyerindeki maddelerin farklı konsantrasyonlarının spor-kristal üretimine etkisini belirlemek amacıyla besiyeri içeriğindeki 5 maddenin 3 farklı seviyesi test edildi (Tablo 14).

Tablo 14. Besiyeri içeriğinin optimizasyonunda kullanılan faktörler ve seviyeleri

Faktörler	Seviye 1	Seviye 2	Seviye 3
Soya	%1	%2,5	%5
Glukoz	%1	%2,5	%5
KH ₂ PO ₄	%0,1	%0,3	%0,5
K ₂ HPO ₄	%0,1	%0,3	%0,5
MgSO ₄	%0,2	%0,4	%0,8

Tablo 15. L₂₇ Taguchi Tasarımı

Deney	Faktörler ve Seviyeleri				
	Soya	Glukoz	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄
1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	2
3	1	1	1	1	3
4	1	2	2	2	1
5	1	2	2	2	2
6	1	2	2	2	3
7	1	3	3	3	1
8	1	3	3	3	2
9	1	3	3	3	3
10	2	1	2	3	1
11	2	1	2	3	2
12	2	1	2	3	3
13	2	2	3	1	1
14	2	2	3	1	2
15	2	2	3	1	3
16	2	3	1	2	1
17	2	3	1	2	2
18	2	3	1	2	3
19	3	1	3	2	1
20	3	1	3	2	2
21	3	1	3	2	3
22	3	2	1	3	1
23	3	2	1	3	2
24	3	2	1	3	3
25	3	3	2	1	1
26	3	3	2	1	2
27	3	3	2	1	3

Besiyeri içeriğindeki beş maddenin üç farklı seviyesi için Minitab 17 yazılımı kullanılarak Taguchi L₂₇ ortogonal düzlemi oluşturuldu (Tablo 15). Elde edilen deney tasarımları kullanılarak 100 ml besiyeri hazırlanıp pH'sı 9 ayarlandı. Hazırlanan besiyerilerine 1 ml başlangıç kültürü eklenip bir önceki deney tasarımında elde edilen optimum inkübasyon süresi ve sıcaklığı kullanılarak inkübasyon gerçekleştirildi.

2.8.5. Canlı Spor Sayısının Belirlenmesi

M4 besiyerindeki maddelerin optimizasyonu için gerçekleştirilen çalışmalar sonrasında 27 besiyerinden ayrı ayrı birer ml örnek alınarak besiyerindeki canlı spor sayısı 2.8.3'deki şekilde belirlendi.

2.8.6. Doğrulama Deneyi

Optimizasyon çalışmalarından elde edilen optimum koşullar (Başlangıç pH'sı 9 olan %5 soya unu, %5 glukoz, %0,3 KH_2PO_4 , %0,1 K_2HPO_4 ve %0,4 MgSO_4 içeren M4 besiyeri, 30°C inkübasyon sıcaklığı, 72 saat inkübasyon süresi) kullanılarak doğrulama deneyi gerçekleştirildi ve Minitab 17 yazılımı ile elde edilebilecek tahmini sonuç ile karşılaştırıldı.

2.9. Fermentörde Üretim

Optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen optimum koşullar kullanılarak laboratuvar tipi fermentörde (Biostat A, Sartorius) üretim gerçekleştirildi. Fermentasyon besiyeri (%5 soya unu, %5 glikoz, %0,3 KH_2PO_4 , %0,1 KH_2PO_4 ve %0,4 MgSO_4) 5 litre olacak şekilde hazırlanarak pH'sı 9 olarak ayarlandı. Fermentör otoklav ile steril edildikten sonra, besiyeri oda sıcaklığına gelince %10 (500 ml) bakteri eklenerek 30°C'de 72 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oluşan spor ve kristaller santrifüj ile toplandı. Elde edilen pellet 3 kez 1 M NaCl ile 3 kez de steril saf su ile yıkanarak proteazlar ve β -ekzotoksinler gibi ekstrasellüler komponentler uzaklaştırıldı. Elde edilen spor-kristal karışımındaki canlı spor sayısı standart plak sayım metodu ile belirlendi ve sprey kurutucu ile kurutuluncaya kadar +4°C'de saklandı.

2.10. Enkapsülasyon Koşullarının Optimizasyonu

Optimizasyon çalışmaları sonrası fermentörde üretimi gerçekleştirilen spor-kristal karışımının, çevre koşullarında daha uzun süre dayanabilmesi için enkapsülasyonu gerçekleştirildi. Enkapsülasyon için uygulaması kolay ve ucuz olduğundan en çok tercih edilen püskürterek kurutma yöntemi kullanıldı. Püskürterek kurutma yönteminin koşulları Taguhi metodu ile optimize edildi.

2.10.1. Deney Tasarımı-3

Püskürterek kurutma yöntemine etki eden faktörler, sprey kurutucunun giriş ve çıkış sıcaklığı ile kaplama materyali olarak belirlendi (Tablo 16). Bu 3 faktörün 4 farklı seviyesi için L_{16} Taguchi ortogonal düzlemi oluşturuldu (Tablo 17).

Tablo 16. Püskürterek kurutma yöntemine etki eden faktörler ve seviyeleri

Faktörler	Seviye 1	Seviye 2	Seviye 3	Seviye 4
Kaplama Materyali	Soya unu	Nişasta	Arabik gam	Maltodekstrin
Giriş Sıcaklığı	120	140	160	180
Çıkış Sıcaklığı	60	70	80	90

Tablo 17. L_{16} Taguchi Tasarımı

Deney	Kaplama Materyali	Giriş Sıcaklığı	Çıkış Sıcaklığı
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	1	4	4
5	2	1	2
6	2	2	1
7	2	3	4
8	2	4	3
9	3	1	3
10	3	2	4
11	3	3	1
12	3	4	2
13	4	1	4
14	4	2	3
15	4	3	2
16	4	4	1

2.10.2. Formülasyonun Hazırlanışı

Biyopestisit üretiminde, üretilen ürünün fiziksel ve biyolojik özelliklerinin standartlara uyması önemli bir konudur. Bu nedenle spor-kristal karışımına çeşitli maddeler eklenerek formülasyon hazırlandı. Fagostimulant olarak sükröz ve süt tozu, kurutma sırasında topaklanmayı ve pişmeyi önlemek için silika füme, köpüklenmeyi önlemek için köpük kesici, ultraviyole ışıklardan korumak içinde kaplama materyalleri (soya unu,

maltodekstrin, arabik gam ve nişasta) kullanıldı. Spor-kristal karışımını içeren süspansiyon kurutulmadan önce 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Tüm formülasyonlar, spor-kristal karışımı %10, toplam katı madde oranı ise %30 olacak şekilde dizayn edildi ve süspansiyonlar Tablo 17’de belirlenen koşullar kullanılarak sprey kurutucudan geçirilerek, toz hale getirildi.

2.10.3. Canlı Spor Sayımı

Püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilen 16 toz formülasyonunun, standart plak sayım metodu ile 1 gramında bulunan canlı spor sayısı belirlendi. Bir gram toz formülasyon 99 ml saf suda çözdürülerek 1 saat boyunca periyodik olarak karıştırıldı. Süspansiyon seri dilüsyon yöntemi ile 10^{-7} ’ye kadar seyreltildi ve 80°C ’de 15 dakika bekletildi. Seyreltiklerden 0,1 ml alınarak Mueller-Hinton agar besiyerine yayma ekimi gerçekleştirildi. Petriler 30°C ’de 24 saat inkübe edildikten sonra 30-300 arası koloni olan petriler belirlenerek sayımları yapıldı ve ürünlerin 1 gramında bulunan spor sayısı belirlendi.

2.10.4. Doğrulama Deneyi

Optimizasyon çalışmalarından elde edilen optimum koşullar (kaplama materyali: maltodekstrin, sprey kurutucu giriş-çıkış sıcaklığı: $160-70^{\circ}\text{C}$) kullanılarak doğrulama deneyi gerçekleştirildi ve Minitab 17 yazılımı ile elde edilebilecek tahmini sonuç ile karşılaştırıldı.

2.11. Üretilen Biyopestisitinin Özellikleri

2.11.1. Elektron Mikroskopisi

Üründeki partiküllerin yüzey görüntüsünü ve boyutunu belirlemek için Karadeniz Teknik Üniversitesi, Malzeme ve Metalurji Bölümündeki taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı. Toz formülasyon karbon film yardımıyla straplara yapıştırıldı. Strapların üzeri iletkenliği sağlamak için altın ile kaplandı. Kaplama sonrası örnek Zeiss Evo LS-10 marka taramalı elektron mikroskobunda incelendi. Örneğin farklı büyütmelerde fotoğrafı çekildi.

2.11.2. Partikül Analizi

Ürünün partikül analizi Karadeniz Teknik Üniversitesi, Malzeme ve Metalurji Bölümündeki Malvern Mastersizer 2000 marka partikül boyut analiz cihazı ile gerçekleştirildi. Cihaz tarafından örnek üzerine lazer ışığı gönderilerek, yansıyan ve kırılan ışığın saçılma açısı ve şiddetine göre parçacık boyut dağılımı belirlendi.

2.11.3. Islanabilirlik

Elde edilen ürünün ıslanabilme süresi Lisansky vd. (1993)'nin prosedürüne göre belirlendi. Bunun için 250 ml'lik beher içerisine 100 ml distile su koyuldu. Suyun yüzeyinden 10 cm uzaktan 0,1 g ürün huni vasıtasıyla suya bırakıldı. Ürün suya düştüğü anda kronometre çalıştırıldı ve tamamen ıslandığında durduruldu. Deney üç kez tekrar edildi ve sonucun ortalaması alındı.

2.11.4. Süspansibilite

100 ml'lik mezür içerisine 97 ml distile su ve 3 g örnek eklendi. Mezür 30 defa alt üst edildi. En üst 10 ml'lik kısımdan 5 ml'lik örnek alındı. 105°C'ye ayarlı bir fırında 24 saat kurutuldu. Deney 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar tamamen çözünmüş bir ürünün süspansibilitesidir. Bu sonuçlar kontrol olarak kullanıldı. Deney aynı şekilde 3 kez daha gerçekleştirildi. Ancak bu kez örnek almadan önce 1 saat beklendi. Süspansibilite yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Lisansky vd., 1993).

$$\text{Süspansibilite (\%)} = \frac{\text{Uygulama ağırlığı}}{\text{Kontrol ağırlığı}} \times 100$$

2.11.5. Nem İçeriği

Ürünün nem içeriğini belirlemek için 10 g ürün tartılarak 105°C 'ye ayarlı bir fırında 24 saat kurutuldu. Kuruduktan sonraki miktarı tartılarak aşağıdaki formüle göre yüzde nem içeriği belirlendi. Deney 3 kez tekrar edilerek ortalaması alındı (Lisansky vd., 1993).

$$\text{Nem İçeriği (\%)} = \frac{\text{Başlangıç ağırlığı} - \text{Son ağırlık}}{\text{Başlangıç ağırlığı}} \times 100$$

2.11.6. Canlı Spor Sayımı

Toz formülasyonun 1 gramında bulunan canlı spor sayısı, standart plak sayım metodu ile 2.10.3’de belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

2.12. Ürünün Entomopatojenitesi

2.12.1. *Spodoptera exigua* Üzerindeki Etkinliği

Toz formülasyonun entomopatojenitesi *Spodoptera exigua*’nın 3. dönem larvaları üzerinde test edildi. Çalışmada karşılaştırma amacıyla *B. thuringiensis* Se13 izolatının spor kristal karışımı ve *B. thuringiensis kursaki* içerikli ticari biyopestisit Dipel kullanıldı. Toz formülasyondan 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 ve 10^4 spor/ml konsantrasyonlarda süspansiyonlar hazırlandı. Süspansiyonlar %0,1’lik sodyum hipoklorit ile dezenfekte edilmiş marul yapraklarına bulaştırılarak kurutuldu ve zararlı bu besinlerle beslendi. Denemeler her konsantrasyon için 3 tekrarlı gerçekleştirildi ve her tekrarda 30 larva kullanıldı. Larvalar kannibalizmi engellemek için ayrı ayrı kaplarda beslendi. Kontrol grubunda steril su kullanıldı. Denemeler 10 gün boyunca günlük takip edildi. Ölüm oranları Abbott formülüne göre hesaplandı (Abbott, 1925). Medyan letal konsantrasyon (LC_{50}) ve medyan ölüm zamanı (LT_{50}) probit analizi ile belirlendi (Finney, 1971).

Ayrıca, saksı denemeleri ile ürünün etkisi ticari ürün ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Denemeler 30 cm çapındaki saksılarda büyütülen marullar üzerinde gerçekleştirildi. Üç farklı uygulama için 5 tekrarlı olacak şekilde düzenekler kuruldu. Grupları oluşturmak için 15 adet saksıya marul fideleri dikildi ve 8-10 gün büyütülerek deney için hazır hale getirildi. Birinci gruptaki 5 marula 1 g/litre olacak şekilde hazırlanan ürünümüz püskürtme tabancası ile uygulandı. Aynı konsantrasyonda hazırlanan ticari ürün de ikinci gruptaki 5 marula uygulandı. Kontrol grubuna ise su püskürtüldü. Marul yaprakları kuruduktan sonra üzerlerine 3. evre 3-5 saat aç bırakılmış 10’ar adet *S. exigua* larvası yerleştirildi ve 25°C’de inkübe edildi. Deneyin sonucunda, marul yapraklarında meydana gelen zararlar karşılaştırılarak ürünümüzün etkisi, ticari ürün ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

2.12.2. Konak Spektrumu

Çalışma ile elde edilen ürünün etkinliği, Amerikan beyaz kelebeği (*Hyphantria cunea* Dry., Lepidoptera: Arctiidae) ve Yüzük kelebeği (*Malacosoma neustria* L., Lepidoptera: Lasiocampidae) larvalarının 3. dönemleri üzerinde laboratuvar ortamında test edildi. İnsektisidal aktivite testleri 2.12.1’de belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

2.13. Memeli Toksisitesi

Enkapsüle *B. thuringiensis* Se13’ün memeliler üzerindeki patojenite toksisite testleri sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Çalışmalarda kullanılan sıçanlar Karadeniz Teknik Üniversitesi, Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesinde faaliyet gösteren Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarından sağlandı ve deneyler bu birimde yürütüldü.

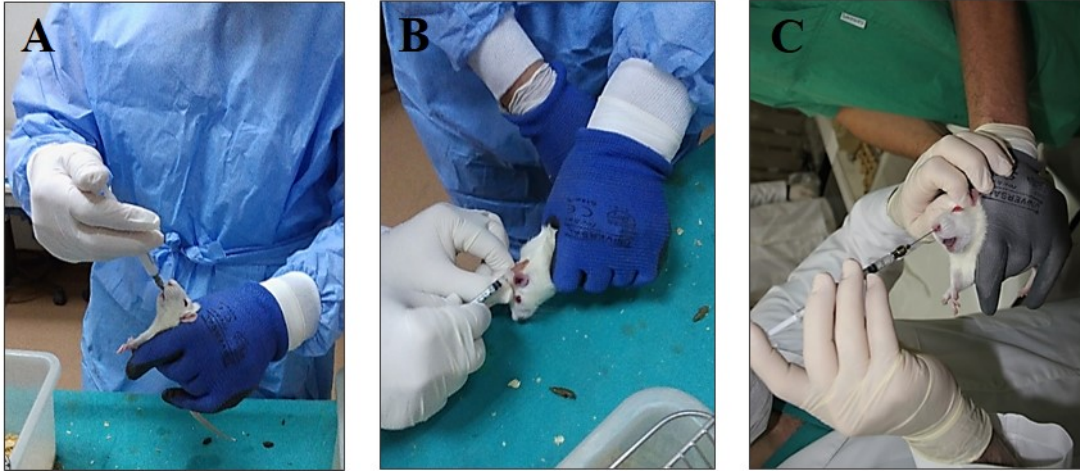
Denemelerde yaklaşık 3-4 aylık, 150-250 gr ağırlığında, dişi sıçanlar (Sprague Dawley) kullanıldı. Denemeler oral, subkutan ve pulmonar toksisite şeklinde planlandı. Her bir testte 8 adet dişi sıçan kullanıldı. Pulmonar toksisite patojenite testinde örneklemeden sonra hayvanlar öleceği için ilave 4 deney grubu daha düzenlemek gerekti. Dolayısıyla 3 farklı patojenite testi için, 5 ürün uygulaması, 5 otoklavlanarak inaktive edilmiş ürün uygulaması ve 1 negatif kontrol (steril su) olmak üzere 11 deney grubu planlandı. Çalışmada toplam 88 adet sıçan kullanıldı (Tablo 18). Akut oral toksisite/patojenite testi ve pulmonar toksisite/patojenite testinde 3×10^8 spor/ml bakteri, akut derialtı toksisite/patojenite testinde ise 3×10^7 spor/ml bakteri kullanıldı (Şekil 8).

Sıçanlar 22 ± 2 °C oda sıcaklığında %45-60 nemde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyotta barındırıldı. Sıçanlar *ad-libitum* olarak pellet yem ve su ile beslendi (Şekil 9). Bütün deney grupları 3 hafta boyunca takip edildi.

Günlük klinik incelemelerle hayvanların davranış biçimleri gözlemlendi. Klinik incelemeler ilk hafta her gün, sonraki iki hafta haftada bir gerçekleştirildi. Tüm denemelerde uygulamadan önce ve sonra sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü (Mancebo vd., 2011).

Tablo 18. Toksikoloji çalışmalarında kullanılacak deney grupları ve sıçan sayıları

	Uygulama Grubu	Uygulama Yöntemi	Uygulama dozu	Sıçan sayısı
1. grup	Kontrol Grubu	-	-	8
2. grup	Oral Toksikite Patojenite Grubu	İntragastrik Uygulama (Gavaj)	2 ml (10 ⁸ cfu/ml bakteri içeren ürün)	8
3. grup			2 ml (İnaktif ürün)	8
4. grup	Subkutan Patojenite Toksikite Grubu	Derialtı Uygulama	0,1 ml (10 ⁷ cfu/ml bakteri içeren ürün)	8
5. grup			0,1 ml (İnaktif ürün)	8
6. grup	Pulmonar Toksikite Patojenite Grubu (7. gün örnekleme)	İntranazal Uygulama	0,3 ml (10 ⁸ cfu/ml bakteri içeren ürün)	8
7. grup			0,3 ml (İnaktif ürün)	8
8. grup	Pulmonar Toksikite Patojenite Grubu (14. gün örnekleme)	İntranazal Uygulama	0,3 ml (10 ⁸ cfu/ml bakteri içeren ürün)	8
9. grup			0,3 ml (İnaktif ürün)	8
10. grup	Pulmonar Toksikite Patojenite Grubu (21. gün örnekleme)	İntranazal Uygulama	0,3 ml (10 ⁸ cfu/ml bakteri içeren ürün)	8
11. grup			0,3 ml (İnaktif ürün)	8
Toplam				88



Şekil 8. Enkapsüle *B. thuringiensis* Se13'ün sıçanlar üzerindeki patojenite toksisite testleri A. İntragastrik uygulama, B. Subkutan uygulama, C. İntranazal uygulama



Şekil 9. Sıçanların barındırılması ve beslenmesi

Toksisiteyi değerlendirmek için uygulamalardan sonra oral ve derialtı testleri için 2. 4. 7. 14. ve 21. günlerde pulmonar test için ise 7, 14, ve 21. gün sonunda örnekleme yapıldı. Sıçanlardan oral uygulama için 1 gr feçes örneği, derialtı uygulaması için 500 µl kan örneği ve pulmonar test için 1 gr akciğer doku örneği alındı. Aynı zamanda toz formülasyon uygulanmayan sıçanlardan da örnekleme yapıldı (Siegel, 2001; Mancebo vd., 2011).

Örnekler steril saf su içerisinde homojenize edildikten sonra seri dilüsyon yöntemiyle seyreltikler hazırlandı ve 80°C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası seyreltiklerden triptik soy agar besiyerine ekimler yapıldı ve 30°C'de 24 saat inkübe edildi. Petrilerde oluşan kolonilerden bakteri sayımı gerçekleştirildi (Mancebo vd., 2011).

3. BULGULAR

3.1. *Spodoptera exigua* Larvalarından Bakteri İzolasyonu

Bu çalışmada, Osmaniye ilindeki mısır tarlalarından toplanan *Spodoptera exigua* larvalarından toplam 15 bakteriyel izolat elde edildi. Saflaştırılan 15 izolat Se1, Se2, Se3, Se4, Se5, Se6, Se7, Se8, Se9, Se10, Se11, Se12, Se13, Se14 ve Se15 olarak numaralandırıldı.

3.2. İzolatların Fenotipik Özellikleri

3.2.1. Makroskobik ve Mikroskobik Özellikleri

İzolatların koloni rengi ve şekli gibi makroskobik özellikleri binoküler mikroskop altında incelenerek belirlendi. Bu inceleme sonuçlarına göre; Se1 ve Se8 numaralı izolatların krem renkli dalgalı-yuvarlak, Se2, Se3, Se5 ve Se12 numaralı izolatların beyaz renkli düz-yuvarlak, Se4, Se6, Se10, Se11, Se13 ve Se14 numaralı izolatların krem renkli düz-yuvarlak, Se7 numaralı izolatın sarı renkli düz-yuvarlak, Se9 numaralı izolatın kırmızı renkli düz-yuvarlak ve Se15 numaralı izolatın koyu krem renkli düz-yuvarlak koloni morfolojilerine sahip olduğu belirlendi (Tablo 19).

İzolatların mikroskobik özellikleri ise ışık mikroskobu ile incelenerek belirlendi. Buna göre, izolatların hücre şeklinin Se5 numaralı izolat hariç basil, Se5 numaralı izolatın ise kok olduğu belirlendi. Gram boyama ve spor boyama çalışmaları sonrası Se1, Se2, Se4, Se8, Se10, Se11, Se13, Se14 ve Se15 numaralı izolatların gram pozitif sporlu bakteriler olduğu, Se5 numaralı izolatın gram pozitif sporsuz bakteri olduğu belirlendi. Se9 numaralı izolatın sporlu gram negatif bakteri olduğu, geriye kalan Se3, Se6, Se7 ve Se12 numaralı izolatların ise gram negatif sporsuz bakteriler oldukları belirlendi.

Se5, Se6 ve Se7 numaralı izolatların hareketsiz, Se1, Se2, Se3, Se4, Se8, Se9, Se10, Se11, Se12, Se13, Se14 ve Se15 numaralı izolatların ise hareketli oldukları belirlendi (Tablo 19).

Tablo 19. İzolatların fenotipik özellikleri

İzolatlar	Makroskobik Özellikler		Mikroskobik Özellikler			
	Koloni rengi	Koloni şekli	Hücre şekli	Gram boyama	Spor boyama	Hareketlilik
Se1	Krem	Dalgalı-yuvarlak	Basil	+	+	+
Se2	Beyaz	Düz-yuvarlak	Basil	+	+	+
Se3	Beyaz	Düz-yuvarlak	Basil	-	-	+
Se4	Krem	Düz-yuvarlak	Basil	+	+	+
Se5	Beyaz	Düz-yuvarlak	Kok	+	-	-
Se6	Krem	Düz-yuvarlak	Basil	-	-	-
Se7	Sarı	Düz-yuvarlak	Basil	-	-	-
Se8	Krem	Dalgalı-yuvarlak	Basil	+	+	+
Se9	Kırmızı	Düz-yuvarlak	Basil	-	+	+
Se10	Krem	Düz-yuvarlak	Basil	+	+	+
Se11	Krem	Düz-yuvarlak	Basil	+	+	+
Se12	Beyaz	Düz-yuvarlak	Basil	-	-	+
Se13	Krem	Düz-yuvarlak	Basil	+	+	+
Se14	Krem	Düz-yuvarlak	Basil	+	+	+
Se15	Koyu krem	Düz-yuvarlak	Basil	+	+	+

3.2.2. Biyokimyasal Özellikleri

VITEK-2 panel test sistemi ile tam otomatik olarak bakterilerin asidifikasyon, alkalinizasyon, enzim hidrolizi gibi çeşitli metabolik aktiviteleri belirlendi ve kendi veritabanı üzerinde sonuçlar değerlendirildi. Gram pozitif sporsuz kok ve basil bakteriler için VITEK-2 GP kartı, gram pozitif sporlu bakteriler için VITEK-2 BCL kartı, gram negatif kok ve basil bakteriler içinse VITEK-2 GN kartı kullanılarak biyokimyasal bazı özellikler test edildi ve sonuçları Tablo 20-21’de gösterilmiştir.

Tablo 20. Gram pozitif *Bacillus* izolatların biyokimyasal özellikleri

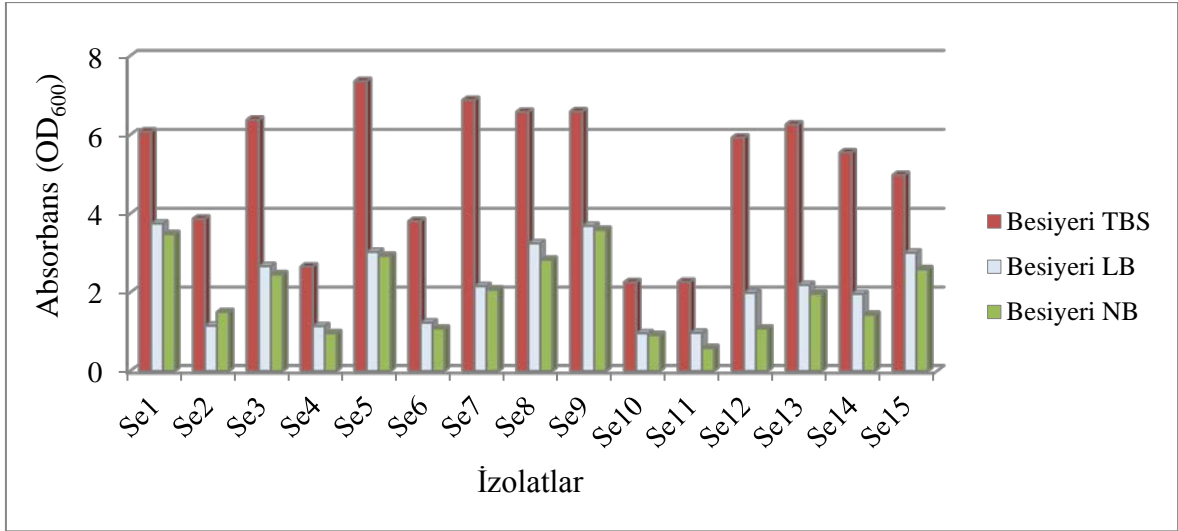
BCL Kartındaki Testler	İzolatlar								
	Se1	Se2	Se4	Se8	Se10	Se11	Se13	Se14	Se15
Beta-Xylosidase	-	-	+	-	+	+	-	-	-
L-Lysine Arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Aspartate Arylamidase	-	+	-	-	(+)	-	-	-	-
Leucine Arylamidase	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Phenylalanine Arylamidase	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Proline Arylamidase	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Beta-Galactosidase	-	-	+	-	+	+	-	-	-
L-Pyrrolydonyl Arylamidase	+	+	+	+	(-)	(-)	+	+	+
Alpha-Galactosidase	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Alanine Arylamidase	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Tyrosine Arylamidase	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Beta-N-Acetyl-Glucosaminidase	(+)	+	-	-	-	-	-	+	+
Ala-Phe-Pro Arylamidase	-	+	-	+	(-)	+	+	+	+
Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Glycogen	(-)	-	+	-	-	-	-	-	-
Myo-inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-A-D-Glucopyranoside acid.	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Ellman	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Methyl-D-Xyloside	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-
Alpha-Mannosidase	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Maltotriose	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Glycine Arylamidase	(+)	+	-	(-)	-	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	+	-	+	+	-	-	-
D-Mannose	-	-	+	-	+	+	-	-	-
D-Melezitose	-	-	+	-	(-)	(-)	-	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Palatinose	-	-	+	-	+	+	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beta-Glucosidase	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Beta-Mannosidase	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Phosphoryl Choline	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Pyruvate	-	(-)	-	(-)	-	-	(-)	(+)	+
Alpha-Glucosidase	-	-	+	-	+	+	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Trehalose	+	-	+	+	+	+	-	+	-
Inulin	-	-	-	-	+	+	-	-	-
D-Glucose	+	-	+	+	+	+	+	+	-
D-Ribose	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Putrescine assimilation	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 6.5% NaCl	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Kanamycin Resistance	+	-	+	-	+	+	+	+	-
Oleandomycine Resistance	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculine Hydrolysis	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Tetrazolium Red	(-)	-	-	-	+	+	-	-	+
Polymixin B Resistance	+	+	+	+	(+)	(-)	+	+	-

Tablo 21. Gram negatif (solda) ve gram pozitif sporsuz (sağda) izolatların biyokimyasal özellikleri

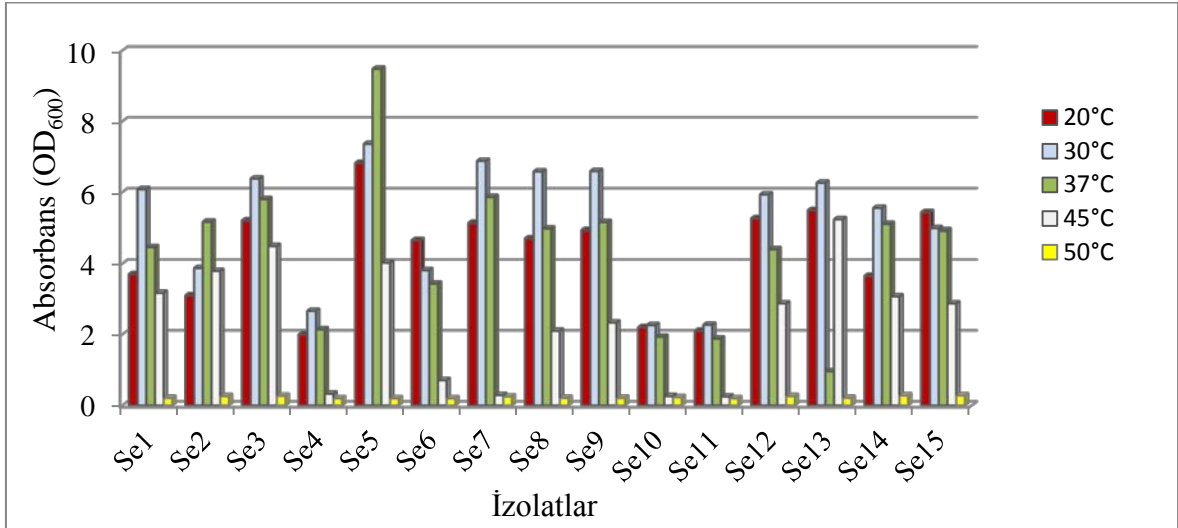
GN kartındaki testler	İzolatlar					GP kartındaki testler	İzolat
	Se3	Se6	Se7	Se9	Se12		
Ala-Phe-Pro-Arylamidase	-	-	+	-	-	D-Amygdalin	-
Adonitol	-	-	+	-	-	Phosphatidylinositol Phos. C	-
L-Pyrrolydonyl-Arylamidase	+	-	-	+	-	D-Xylose	-
L-Arabitol	-	-	+	+	-	Arginine Dihydrolase 1	-
D-Cellobiose	-	+	-	-	+	Beta Galactosidase	+
Beta-Galactosidase	+	-	-	+	+	Alpha Glucosidase	+
H2S Production	-	-	-	-	-	Ala-Phe-Pro Arylamidase	-
Glutamyl Arylamidase pNA	-	-	+	-	-	L-Aspartate Arylamidase	-
D-Glucose	+	+	-	+	+	Beta Galactopyranosidase	-
Gamma-Glutamyl-Transferase	-	-	-	+	+	Alpha Mannosidase	-
Fermentation/Glucose	-	-	-	+	+	Phosphatase	-
Beta-Glucosidase	-	-	+	+	+	Leucine Arylamidase	-
D-Maltose	+	-	-	-	+	L-Proline Arylamidase	-
D-Mannitol	+	-	-	+	+	Beta Glucuronidase	-
D-Mannose	-	+	-	+	+	Alpha-Galactosidase	+
Beta-Xylosidase	-	-	+	-	-	L-Pyrrolydonyl Arylamidase	-
Beta-Alanine Arylamidase	-	-	-	-	-	Beta-Glucuronidase	-
L-Proline Arylamidase	-	+	-	+	-	Alanine Arylamidase	-
Lipase	+	+	-	-	-	Tyrosine Arylamidase	-
Palatinose	+	-	-	-	+	D-Sorbitol	-
Tyrosine Arylamidase	+	+	+	+	+	Urease	-
Urease	-	+	-	-	-	Polymixin B Resistance	-
D-Sorbitol	+	-	-	+	+	D-Galactose	-
Saccharose/Sucrose	+	-	-	+	+	D-Ribose	(-)
D-Tagatose	-	-	-	-	-	L-Lactate alkalisation	-
D-Trehalose	+	-	+	+	+	Lactose	-
Citrate (Sodium)	+	+	+	+	+	N-Acetyl-D-Glucosamine	+
Malonate	-	+	-	-	+	D-Maltose	+
5-Keto-D-Gluconate	-	-	-	-	-	Bacitracin Resistance	-
L-Lactate alkalisation	+	+	-	+	+	Novobiocin Resistance	-
Alpha-Glucosidase	+	-	+	+	-	Growth in %6,5 NaCl	+
Succinate alkalization	-	+	-	+	+	D-Mannitol	+
Alpha-Galactosidase	+	-	-	-	+	Metyl-B-D-Glucopyranoside	+
Phosphatase	-	-	+	+	-	Pullulan	-
Glicine Arylamidase	-	-	-	+	+	D-Raffinose	-
Ornithine Decarboxylase	-	-	-	+	+	O/129 Resistance	+
Lysine Decarboxylase	-	-	-	+	-	Salicin	+
L-Histidin assimilation	-	-	-	-	-	Saccharose/Sucrose	+
Coumarate	-	-	-	+	-	D-Trehalose	+
Beta-Glucoronidase	-	-	-	-	-	Arginine dihydrolase 2	-
O/129 Resistance	+	-	-	+	+	Optochin Resistance	+
Glu-Gly-Arg-Arylamidase	-	-	+	+	-		
L-Malate assimilation	-	-	-	-	-		
Ellman	+	-	+	-	-		
L-Lactate assimilation	-	-	-	-	-		

3.2.3. Büyüme Özellikleri

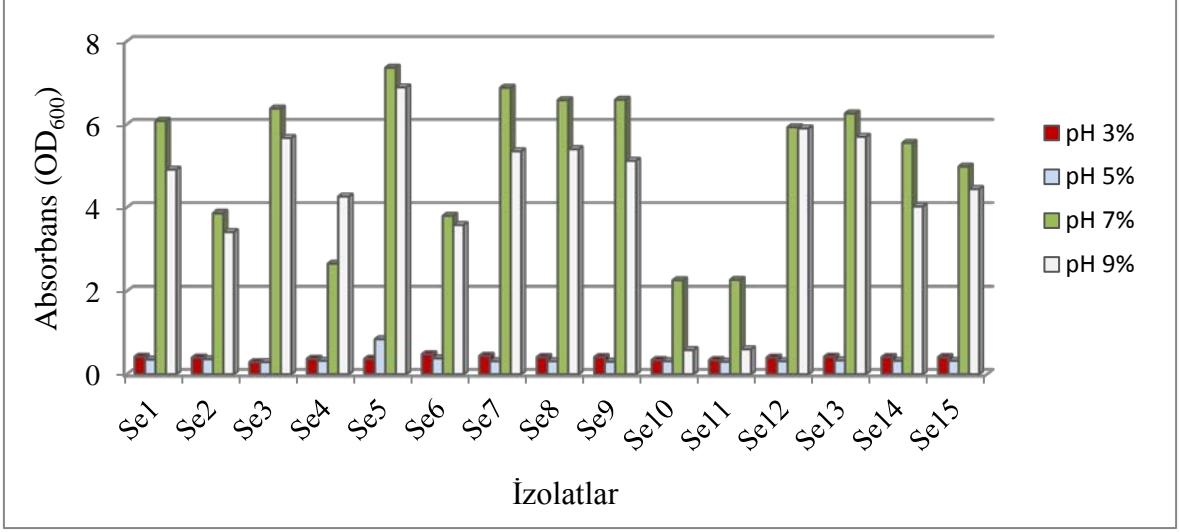
İzolatların farklı besiyeri, sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonlarında büyüme özellikleri belirlendi. Başlangıç yoğunluğu OD_{600} 'de 0,1 olacak şekilde bakteri inokülasyonu gerçekleştirilip 48 saat sonra ölçümler alındı (Şekil 10-13).



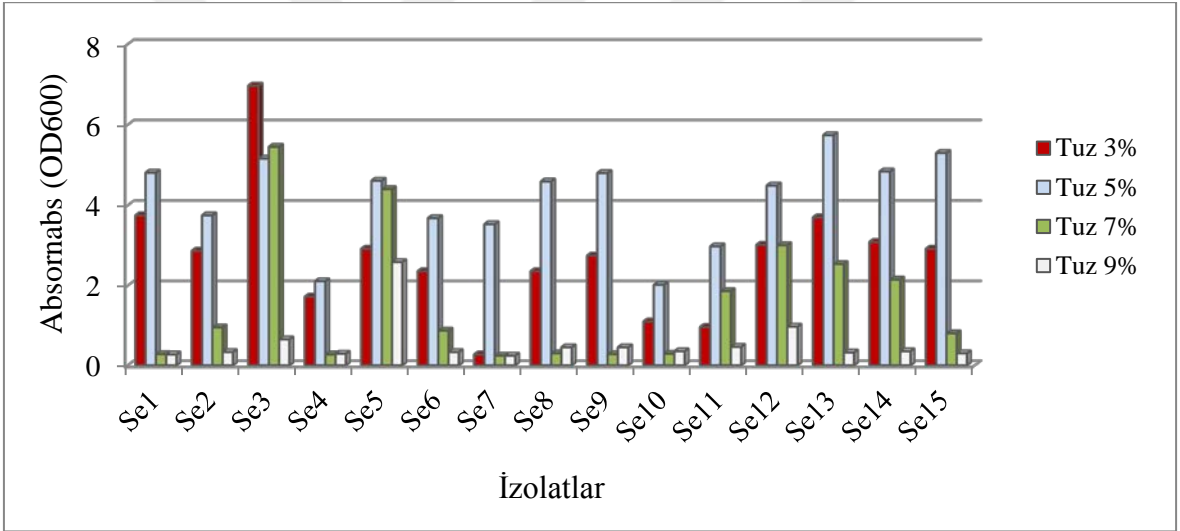
Şekil 10. İzolatların farklı besiyerilerindeki absorbans değerleri



Şekil 11. İzolatların farklı sıcaklıklardaki absorbans değerleri



Şekil 12. İzolatların farklı pH'daki absorbands değerleri



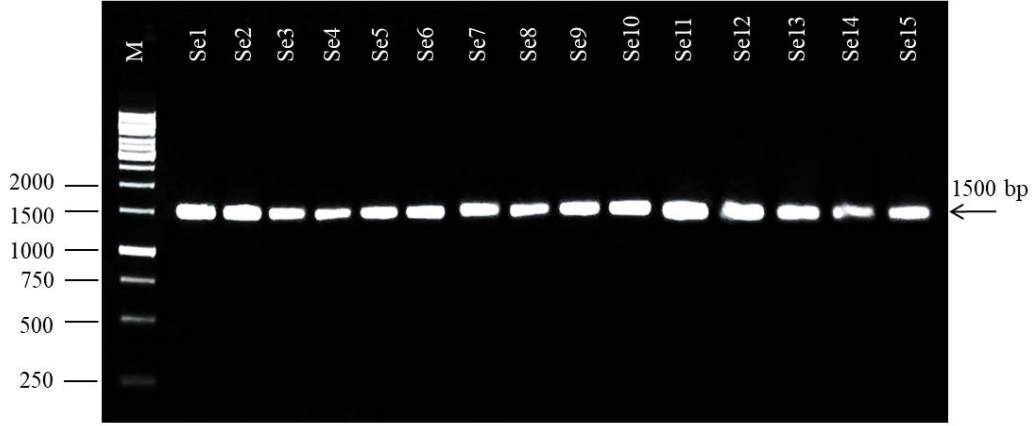
Şekil 13. İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarındaki absorbands değerleri

İzolatların tamamının optimal büyümeyi TSB besiyeri içerisinde gösterdiği belirlendi (Şekil 10). İzolatların optimal büyüme sıcaklığı TSB besiyeri içerisinde Se2 ve Se5 numaralı izolatlar için 37°C, Se6 ve Se15 numaralı izolatlar için 20°C, diğer izolatlar için 30°C olarak belirlendi (Şekil 11). Se4 izolatu hariç diğer tüm izolatların pH7 besiyerinde optimal büyüme gösterdiği, Se4 izolatu ise pH9 besiyerinde optimal büyümeyi gösterdiği belirlendi.

Se3 numaralı izolat %3 tuz içeren besiyerinde optimal büyüme gösterirken diğer izolatlar %5 tuz içeren besiyerinde optimal büyüme gösterdi. Se7 izolatu ise sadece %5 içeren ortamda büyüebildiği görüldü.

3.3. Genotipik Özellikler

Tüm bakterilerden 16S rRNA çoğaltılmasına sağlayan üniversal primer kullanılarak bu genin çoğaltılması ve sekanslanması filogenik çalışmalarda standard yöntem olarak yerini almıştır. Bu sebeple izolatlardan kromozomal DNA'lar izole edildi. Elde edilen kromozomal DNA'ların 16S rRNA bölgeleri PCR ile çoğaltıldı ve bütün izolatlar için yaklaşık 1.500 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlendi (Şekil 14).

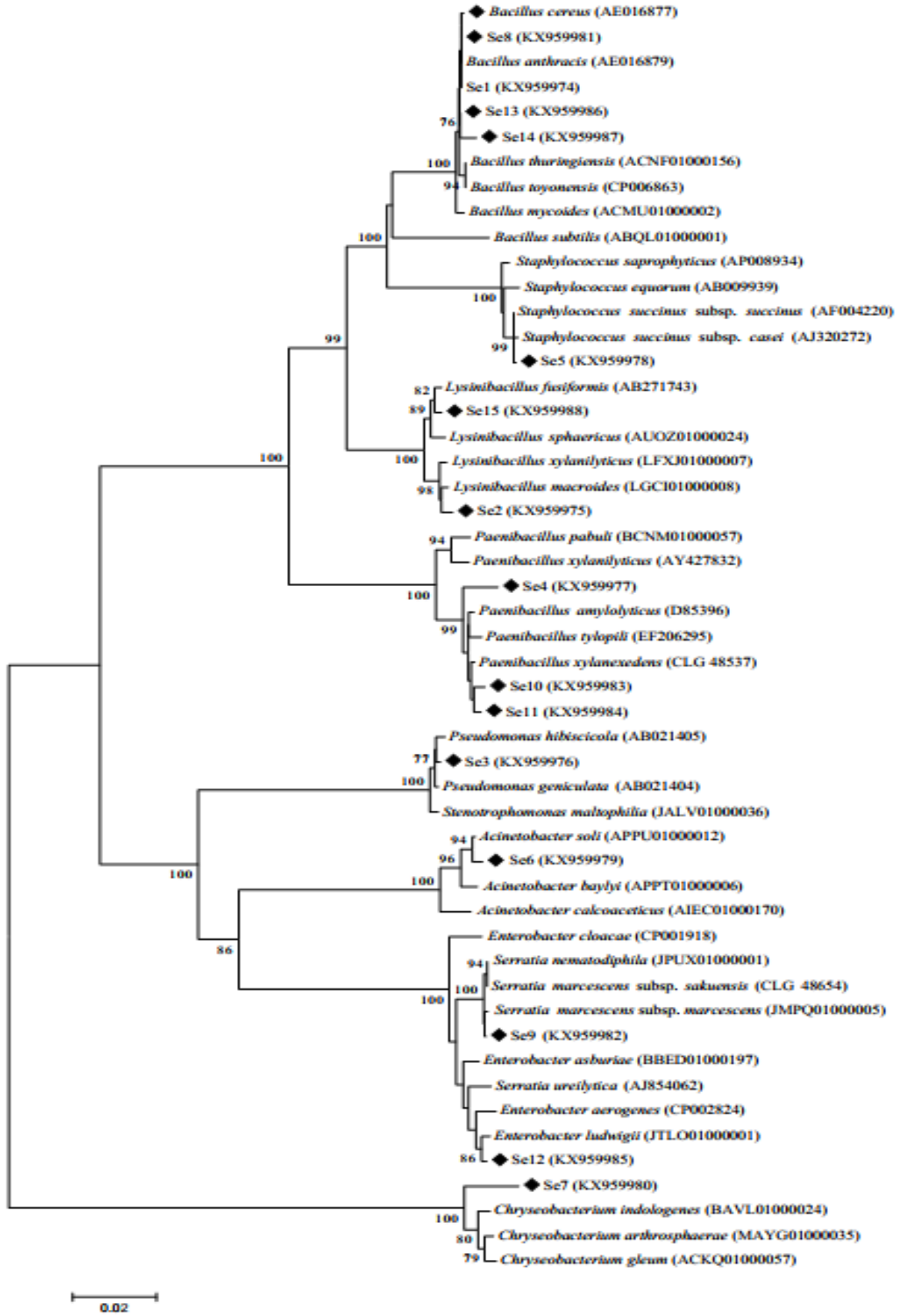


Şekil 14. İzolatların PCR ile çoğaltılmış 16S rRNA gen bölgelerinin agaroz jel lektroforez görüntüsü (M: Markır (Fermentas, GeneRuler 1 kb)

16S rRNA gen bölgelerinin *E. coli* JM101 kompotent hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildikten sonra plasmid izolasyonu ile 16S rRNA gen bölgesini içeren klonlar sekans ettirilerek nükleotid sıraları belirlendi (Ek-2). Bu sıralar GenBank'taki veritabanı ile karşılaştırılarak bilinen türlere olan benzerlik oranları belirlendi (Tablo 22). Dizin analizi sonuçları Mega 6.0 programı kullanılarak Neighbor-Joining analizi ile değerlendirildi ve izolatların filogenetik ağacı oluşturuldu (Şekil 15). Filogenetik ağaç verileri ve 16S rRNA sonuçları birbirlerini desteklemektedir.

Tablo 22. İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin NCBI veritabanındaki benzerlikleri

İzolatlar	Türler	Benzerlik Oranı	Kayıt No	İzolatlar	Türler	Benzerlik Oranı	Kayıt No
Se1	<i>Bacillus cereus</i>	%99	NR_074540.1	Se9	<i>Serratia marcescens</i>	%99	NR_036886.1
	<i>Bacillus mycoides</i>	%99	NR_113990.1		<i>Serratia nematodiphila</i>	%99	NR_044385.1
	<i>Bacillus toyonensis</i>	%99	NR_121761.1		<i>Serratia ureilytica</i>	%98	NR_042356.1
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	%99	NR_114581.1	Se10	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	%99	NR_025882.1
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	%99	NR_024697.1		<i>Paenibacillus tundrae</i>	%99	NR_044525.1
			<i>Paenibacillus xylanexedens</i>		%99	NR_044524.1	
Se2	<i>Lysinibacillus macroides</i>	%99	NR_114920.1		<i>Paenibacillus tylopili</i>	%99	NR_115990.1
	<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>	%99	NR_113166.1	Se11	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	%99	NR_044524.1
	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	%99	NR_042072.1		<i>Paenibacillus tundrae</i>	%99	NR_044525.1
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	%98	NR_042073.1		<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	%99	NR_025882.1
				<i>Paenibacillus tylopili</i>	%99	NR_115990.1	
Se3	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	%99	NR_024709.1	Se12	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	%99	NR_104933.1
	<i>Pseudomonas geniculata</i>	%99	NR_024708.1		<i>Enterobacter ludwigii</i>	%99	NR_042349.1
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	%99	NR_041577.1		<i>Enterobacter aerogenes</i>	%99	NR_102493.1
	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	%99	NR_118008.1		<i>Pantoea agglomerans</i>	%99	NR_111998.1
Se4	<i>Paenibacillus cucumis</i>	%99	NR_149778.1	Se13	<i>Bacillus cereus</i>	%99	NR_074540.1
	<i>Paenibacillus tundrae</i>	%98	NR_044525.1		<i>Bacillus mycoides</i>	%99	NR_113990.1
	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	%98	NR_025882.1		<i>Bacillus toyonensis</i>	%99	NR_121761.1
	<i>Paenibacillus tylopili</i>	%98	NR_115990.1		<i>Bacillus thuringiensis</i>	%99	NR_114581.1
Se5	<i>Staphylococcus succinus</i>	%99	NR_028667.1		<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	%99	NR_024697.1
	<i>Staphylococcus equorum</i>	%99	NR_027520.1	Se14	<i>Bacillus cereus</i>	%99	NR_074540.1
	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	%99	NR_036903.1		<i>Bacillus thuringiensis</i>	%99	NR_114581.1
			<i>Bacillus weihenstephanensis</i>		%99	NR_024697.1	
Se6	<i>Acinetobacter soli</i>	%99	NR_044454.1		<i>Bacillus mycoides</i>	%99	NR_113990.1
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	%97	NR_117619.1	Se15	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	%99	NR_114920.1
Se7	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	%98	NR_112975.1		<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	%99	NR_042072.1
	<i>Chryseobacterium arthrophaerae</i>	%97	NR_116977.1		<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>	%98	NR_042073.1
Se8	<i>Bacillus cereus</i>	%99	NR_074540.1		<i>Lysinibacillus macroides</i>	%99	NR_114920.1
	<i>Bacillus mycoides</i>	%99	NR_113990.1				
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	%99	NR_114581.1				



Şekil 15. İzolatların 16S rRNA gen bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı (Bootstrap metodu ile 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.)

3.4. İzolatların İnsektisidal Aktiviteleri

3.4.1. Tarama Testleri

İzolatların zararlı üzerindeki insektisidal aktiviteleri Tablo 23’de gösterilmiştir. Uygulamadan 10 gün sonra *Bacillus thuringiensis* Se13 suşu %100 ile en yüksek öldürücü etkiyi gösterdi. Bunu %83,33 ile *Bacillus thuringiensis* Se14 ve %73,33 ile *Serratia marcescens* Se9 suşları takip etti. En düşük etki ise %26,66 ile *Staphylococcus succinus* Se5, *Acinetobacter soli* Se6 ve *Lysinibacillus sphaericus* Se15 suşlarında görüldü. Geri kalan suşlardan *Bacillus cereus* Se1 %50, *Lysinibacillus macroides* Se2 %70, *Paenibacillus geniculata* Se3 %66,66, *Paenibacillus tylopili* Se4 %43,33, *Chryseobacterium indologenes* Se7 %36,66, *Bacillus toyonensis* Se8 %46,66, *Paenibacillus amylolyticus* Se10 %36,66, *Paenibacillus xylanexedens* Se11 %40 ve *Enterobacter ludwigii* Se12 ise %40 ölüm meydana getirdi.

Tablo 23. Bakteriye flora üyelerinin zararlı üzerindeki insektisidal etkileri

1.8 × 10 ⁹ bakteri/ml uygulama	Ölüm Oranı (%) ± SE			
	2. gün	5. gün	7. gün	10. gün
<i>B. cereus</i> Se1	20,00 ± 1,00 ^{cd}	23,33 ± 0,57 ^{def}	23,33 ± 0,57 ^{de}	50,00 ± 1,00 ^{cdef}
<i>L. macroides</i> Se2	6,66 ± 0,57 ^{cd}	33,33 ± 0,57 ^{de}	36,66 ± 0,57 ^{cd}	70,00 ± 2,00 ^{bcd}
<i>P. geniculata</i> Se3	23,33 ± 0,57 ^c	43,33 ± 1,15 ^{cd}	46,66 ± 1,52 ^c	66,66 ± 0,57 ^{bcd}
<i>P. tylopili</i> Se4	26,66 ± 1,15 ^c	30,00 ± 1,73 ^{def}	30,00 ± 1,73 ^{cde}	43,33 ± 2,08 ^{def}
<i>S. succinus</i> Se5	6,66 ± 0,57 ^{cd}	13,33 ± 0,57 ^{ef}	16,66 ± 0,57 ^{de}	26,66 ± 0,57 ^f
<i>A. soli</i> Se6	10,00 ± 1,73 ^{cd}	23,33 ± 1,52 ^{def}	23,33 ± 1,52 ^{de}	26,66 ± 2,08 ^f
<i>C. indologenes</i> Se7	10,00 ± 1,00 ^{cd}	23,33 ± 0,57 ^{def}	23,33 ± 0,57 ^{de}	36,66 ± 2,08 ^f
<i>B. toyonensis</i> Se8	13,33 ± 0,57 ^{cd}	26,66 ± 0,57 ^{def}	30,00 ± 1,00 ^{cde}	46,66 ± 0,57 ^{cdef}
<i>S. marcescens</i> Se9	23,33 ± 0,57 ^c	56,66 ± 1,15 ^{bc}	66,66 ± 0,57 ^b	73,33 ± 0,57 ^{bc}
<i>P. amylolyticus</i> Se10	13,33 ± 1,52 ^{cd}	26,66 ± 2,08 ^{def}	30,00 ± 2,64 ^{cde}	36,66 ± 3,05 ^f
<i>P. xylanexedens</i> Se11	10,00 ± 1,00 ^{cd}	13,33 ± 1,15 ^{ef}	16,66 ± 0,57 ^{de}	40,00 ± 1,00 ^{ef}
<i>E. ludwigii</i> Se12	16,66 ± 0,57 ^{cd}	20,00 ± 1,00 ^{def}	20,00 ± 1,00 ^{de}	40,00 ± 0,00 ^{ef}
<i>B. thuringiensis</i> Se13	75,00 ± 2,00 ^a	95,00 ± 1,73 ^a	100,0 ± 0,00 ^a	100,0 ± 0,00 ^a
<i>B. thuringiensis</i> Se14	56,66 ± 1,52 ^b	73,33 ± 1,52 ^{ab}	76,66 ± 1,15 ^b	83,33 ± 1,52 ^{ab}
<i>L. fusiformis</i> Se15	00,0 ± 0,00 ^d	6,66 ± 0,57 ^f	10,0 ± 1,00 ^e	26,66 ± 0,57 ^f

Tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma metodu kullanılmıştır. Aynı kolonda yer alan farklı küçük harfler önemli farklılıkları göstermektedir (P <0,05).

İzolatların zararlı üzerindeki etkileri 2. günden itibaren görülmeye başladı. En etkili izolat olan *B. thuringiensis* Se13 suşu 2. günde %75 ölüm meydana getirirken, 7. günde deney grubundaki tüm larvaların öldüğü gözlemlendi.

3.4.2. Doz Denemeleri

Tarama testleri sonucunda zararlı üzerinde yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenen *B. thuringiensis* Se13 suşu kullanılarak doz denemeleri gerçekleştirildi. Kullanılan konsantrasyonların 10 gün sonundaki ölüm oranları ve letal ölüm zamanı Tablo 24'de gösterildi.

Tablo 24. *Bacillus thuringiensis* Se13 izolatının zararlı üzerindeki doz denemeleri

Konsantrasyon (cfu/ml)	Ölüm Oranı (%) \pm SE	LT ₅₀ (gün) (FL, %95)
10 ⁹	100 \pm 0,00 ^a	1,59 ^a (1,32-1,83)
10 ⁸	96 \pm 2,89 ^a	1,58 ^a (1,32-1,87)
10 ⁷	86 \pm 3,00 ^b	2,49 ^b (1,39-3,42)
10 ⁶	63 \pm 1,52 ^c	5,79 ^c (5,17-6,55)
10 ⁵	48 \pm 4,58 ^c	12,4 ^d (10,08-16,82)
10 ⁴	31 \pm 2,88 ^d	19,05 ^e (14,72-28,87)
10 ³	26 \pm 5,7 ^d	19,15 ^e (14,91-28,90)

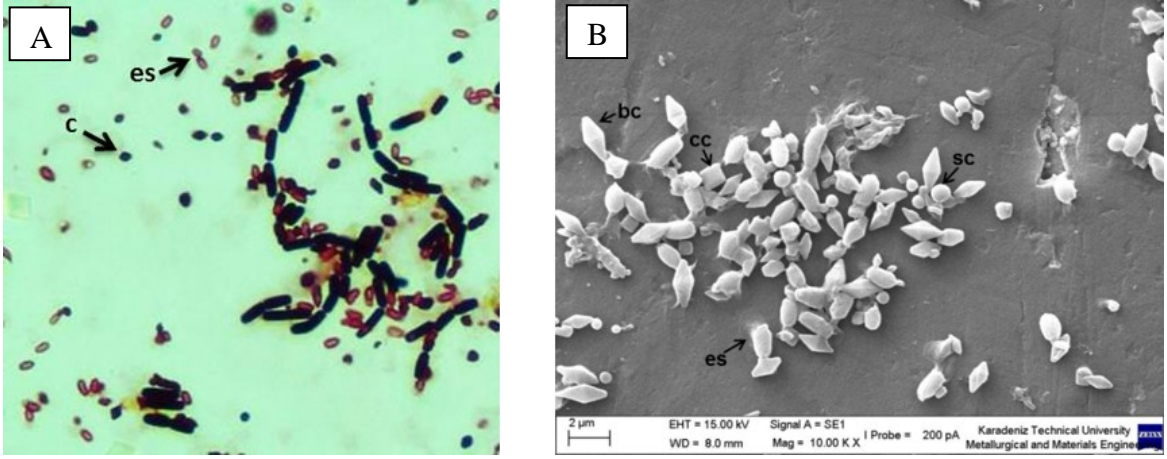
Tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma metodu kullanılmıştır. Aynı kolonda yer alan farklı küçük harfler önemli farklılıkları göstermektedir (P <0,05).

3.5. *Bacillus thuringiensis* Se13 suşunun İnsektisidal Aktivite Özellikleri

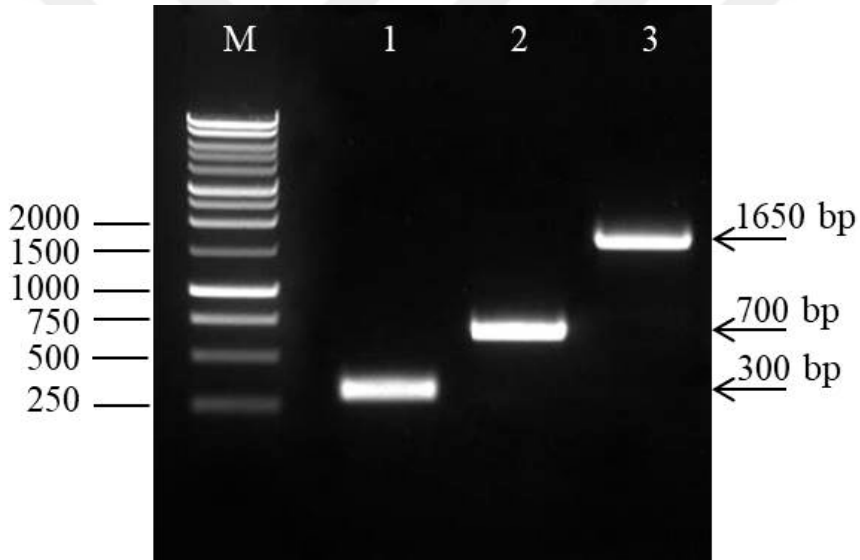
B. thuringiensis Se13 suşundan hazırlanan spor-kristal karışımı ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu ile incelenerek kristal proteinlerin varlığı belirlendi (Şekil 16). Spor-kristal boyamaları sonucunda koyu mavi renkli kristal proteinleri ve pembe renkli sporar gözlemlendi. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde ise kristallerin bipiramidal, kübik ve sferik şekillerde olduğu belirlendi (Şekil 16).

B. thuringiensis Se13 suşundan PCR ile toksin genlerinin araştırılması sonucunda *cry1*, *cry2* ve *vip3* genlerini içerdiği belirlendi (Şekil 17). Elde edilen gen bölgelerinin dizin analizi sonuçları (Ek-3) GenBank veritabanındaki benzerleriyle karşılaştırıldı ve *cry1Ac*, *cry2Aa* ve *vip3Aa* genleri olduğu belirlendi. Diziler için GenBank erişim numarası alındı (HM121039-HM121041) ve Mega 6.0 yazılımı ile filogenetik ağaçları çizildi (Şekil 18-20).

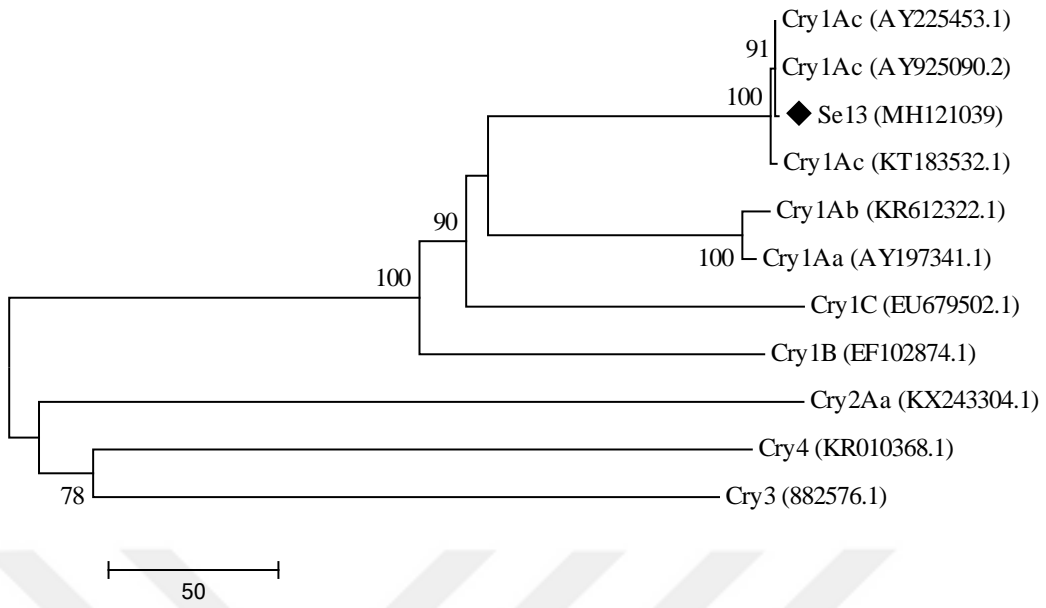
Yapılan SDS-PAGE ile izolatın protein profilleri belirlenerek yaklaşık 130 kDa ağırlığında Cry1 ve yaklaşık 65 kDa ağırlığında Cry2 proteininin varlığı belirlendi (Şekil 21).



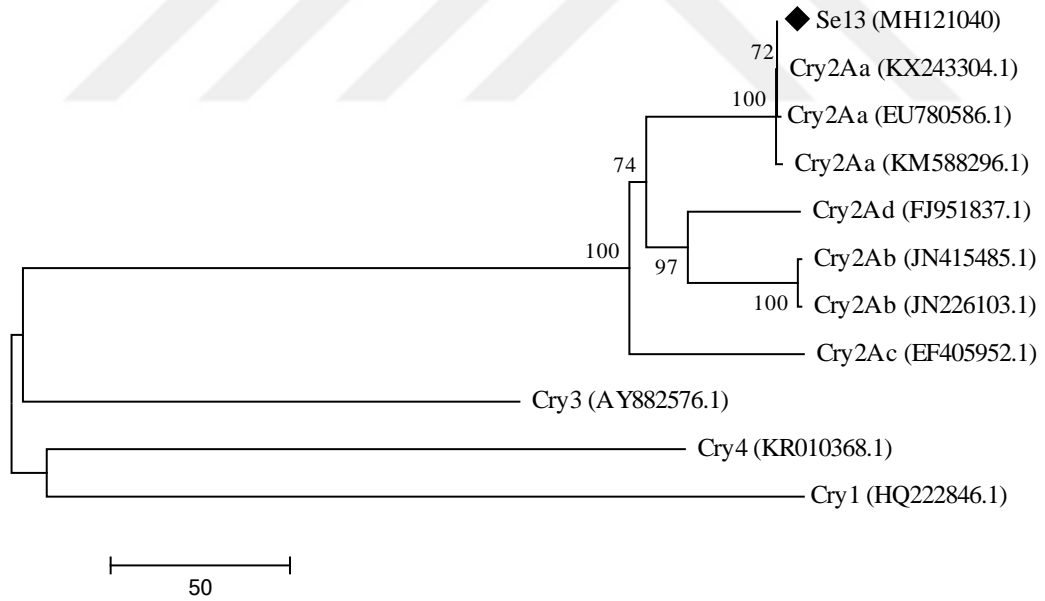
Şekil 16. *B. thuringiensis* Se13'ün faz-kontrast mikroskobisi (A) ve elektron mikroskobisi (B). es: endospor, c: kristal, bc: bipiramidal kristal, cc:kübik kristal, sc:sferik kristal.



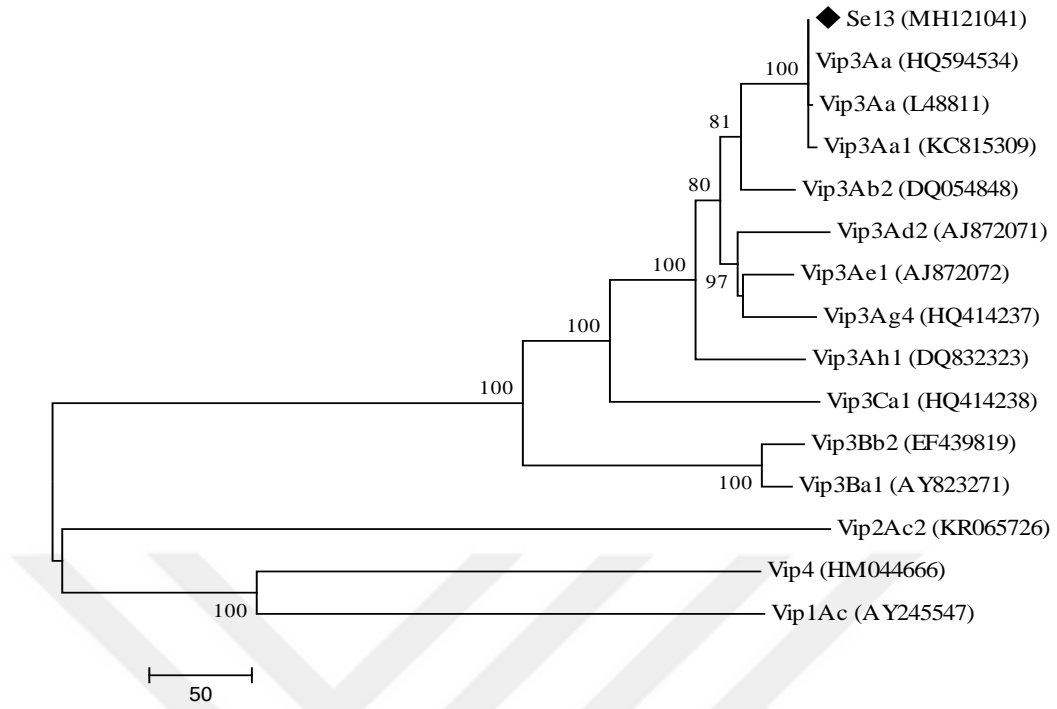
Şekil 17. *B. thuringiensis* Se13'ün toksin genlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü. M: Marker (Promega 1 kb DNA Ladder), 1: *cry1*, 2: *cry2*, 3: *vip3*



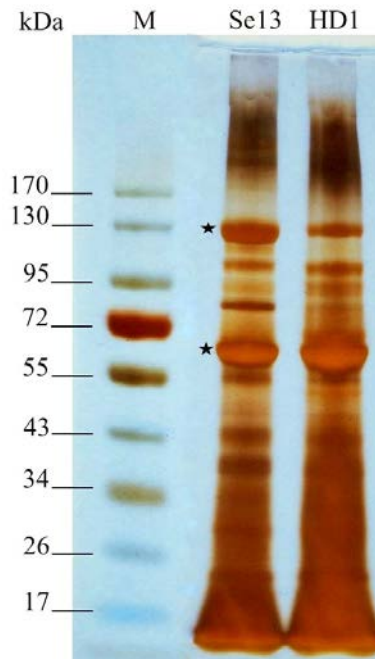
Şekil 18. *Cry1* gen bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı (Bootstrap metodu ile 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.)



Şekil 19. *Cry2* gen bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı (Bootstrap metodu ile 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.)



Şekil 20. *Vip3* gen bölgesinin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı (Bootstrap metodu ile 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.)



Şekil 21. *B. thuringiensis* Se13 izolatının gümüş nitrat ile boyanmış protein profilleri (M: Marker (Novex pre-stained protein marker), Se13: *Bacillus thuringiensis* Se13, HD1: *B. thuringiensis* HD-1)

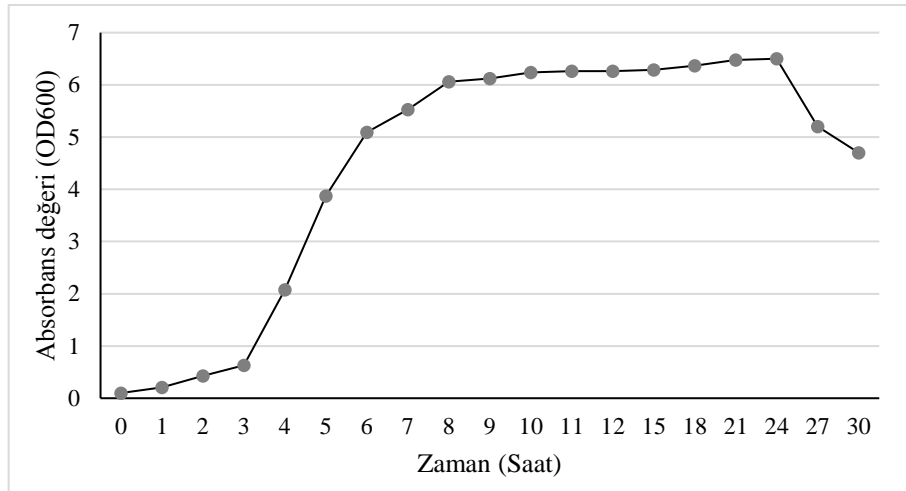
3.6. Fermentasyon Koşullarının Optimizasyonu

Optimizasyon çalışmalarında kullanılan *B. thuringiensis* Se13 suşunun bakteriyel büyüme eğrisi Şekil 22'deki gibi belirlendi. Buna göre 12 saat inkübe edilen kültür başlangıç kültürü olarak kullanıldı. Fermentasyon koşullarının optimizasyonu için Taguchi metodu kullanıldı. Öncelikle inkübasyon zamanı, inkübasyon sıcaklığı, besiyerinin başlangıç pH'sı ve besiyerinin optimizasyonu gerçekleştirildi. L₁₆ Taguchi ortogonal dizisi kullanılarak yapılan çalışma sonucu 1 ml besiyerindeki spor sayısı belirlendi (Tablo 25).

Sonuçlar Minitab 17 yazılımı ile sinyal/gürültü oranı ve varyans analizi kullanılarak değerlendirildi. Şekil 23'de gösterilen faktörlerin, sahip oldukları en büyük S/N değeri, o faktörün en iyi, spor sayısının ise en yüksek olduğu sonucunu göstermektedir. Buna göre optimum spor sayısı; inkübasyon süresi 72 saat, inkübasyon sıcaklığı 30°C, besiyerinin başlangıç pH'sı 9 ve besiyeri M4 olduğu zaman elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan faktörlerin spor sayısına etkisi, sonuçların varyans analizi ile değerlendirilmesiyle belirlendi (Tablo 26). Faktörlerin etki oranları Şekil 24'de gösterildi.

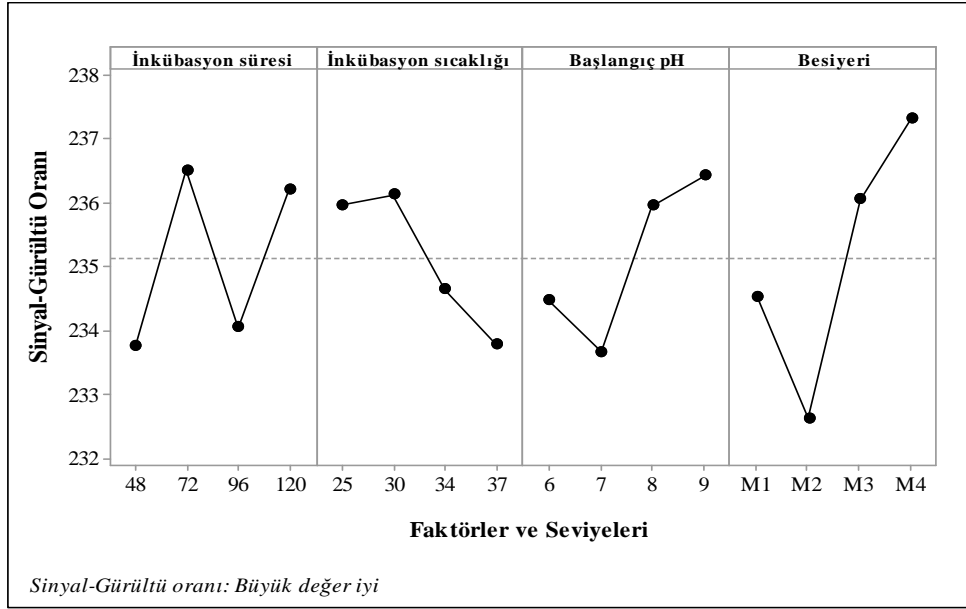
Sinyal/gürültü oranı ve varyans analizi sonuçlarına göre elde edilen optimum koşullarda doğrulama deneyi gerçekleştirildi ve test edilen optimum koşullarda spor sayısı $9,4 \times 10^{11}$ olarak belirlendi. Bu sonuç Taguchi yöntemi ile tahmin edilen optimum tasarım sonucuna oldukça yakındır (Tablo 27).



Şekil 22. *B. thuringiensis* Se13 suşunun bakteriyel büyüme eğrisi

Tablo 25. Taguchi L16 ortogonal düzlemine göre spor sayısı

Deney	Faktörler ve Seviyeleri				Spor sayısı (cfu/ml)
	İnkübasyon süresi (saat)	İnkübasyon sıcaklığı (°C)	Başlangıç pH'sı	Besiyeri	
1	48	25	6	M1	$4,9 \times 10^{11}$
2	48	30	7	M2	$3,4 \times 10^{11}$
3	48	34	8	M3	$5,3 \times 10^{11}$
4	48	37	9	M3	$6,4 \times 10^{11}$
5	72	25	7	M3	$7,1 \times 10^{11}$
6	72	30	6	M4	$8,4 \times 10^{11}$
7	72	34	9	M1	$6,7 \times 10^{11}$
8	72	37	8	M2	$5,0 \times 10^{11}$
9	96	25	8	M4	$7,7 \times 10^{11}$
10	96	30	9	M3	$7,7 \times 10^{11}$
11	96	34	6	M2	$3,4 \times 10^{11}$
12	96	37	7	M1	$3,2 \times 10^{11}$
13	120	25	9	M2	$5,8 \times 10^{11}$
14	120	30	8	M1	$7,6 \times 10^{11}$
15	120	34	7	M4	$7,0 \times 10^{11}$
16	120	37	6	M3	$5,6 \times 10^{11}$

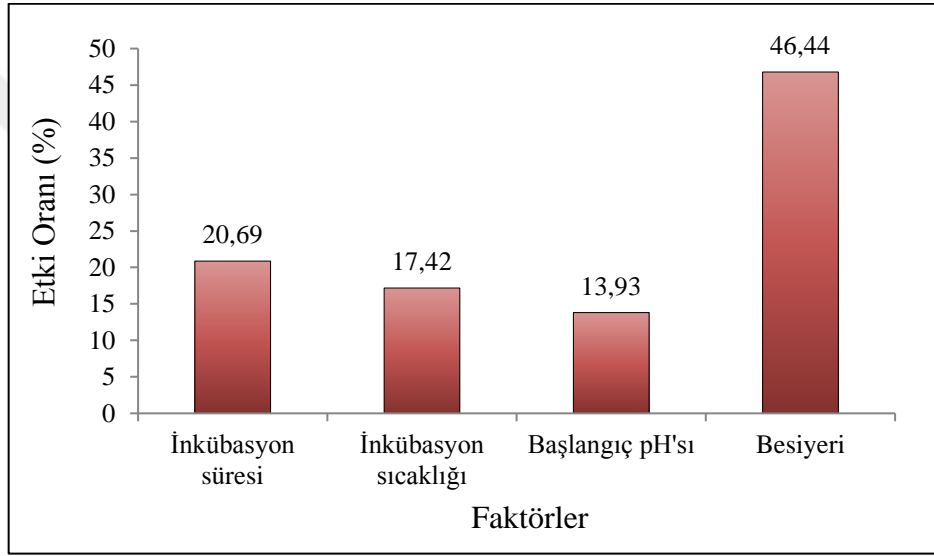


Şekil 23. Fermentasyon koşullarına etki eden faktörlerin sinyal gürültü oranı

Tablo 26. Fermentasyon koşullarına etki eden faktörlerin varyans analizi

Faktörler	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	P değeri
Model	4,05E+23	12	3,38E+22	16,22	0,021*
İnkübasyon süresi	8,52E+22	3	2,84E+22	13,63	0,029*
İnkübasyon sıcaklığı	7,17E+22	3	2,39E+22	11,48	0,037*
Başlangıç pH'sı	5,73E+22	3	1,91E+22	9,18	0,050*
Besiyeri	1,91E+23	3	6,37E+22	30,60	0,009*
Hata	6,25E+21	3	2,08E+21		
Toplam	4,11E+23	15			

*Faktörün önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$).



Şekil 24. Fermentasyon koşullarını etkileyen faktörlerin etki oranı

Tablo 27. Optimum tasarım için tahmin edilen ve belirlenen değerler

Tahmini değer (cfu/ml)	Ortalamanın standart hatası	%95 güven aralığı	Deney sonucu (cfu/ml)	Doğruluk
$9,7 \times 10^{11}$	$4,1 \times 10^{10}$	$8,4 \times 10^{11} - 1,1 \times 10^{12}$	$9,4 \times 10^{11}$	%96,9

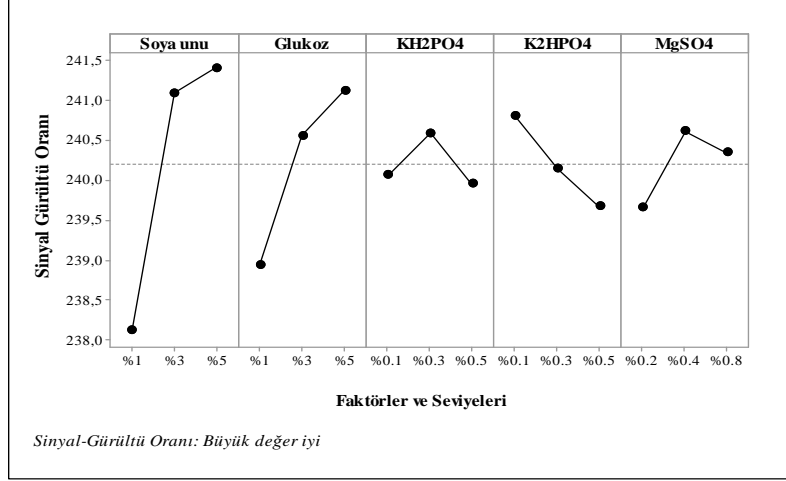
İnkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, besiyerinin başlangıç pH'sı ve besiyeri optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra M4 besiyerini oluşturan maddelerin farklı konsantrasyonlarının spor sayısına etkisi incelendi. Besiyeri içeriğindeki soya unu, glukoz, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 ve MgSO_4 'ün 3 farklı seviyesinin spor sayısına etkisi Taguchi L_{27} ortogonal düzlemi kullanılarak yapılan çalışmalarla belirlendi (Tablo 28).

Tablo 28. Taguchi L₂₇ ortogonal düzlemine göre spor sayısı

Deney	Faktörler ve Seviyeleri					Spor sayısı
	Soya unu	Glukoz	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	
1	% 1	% 1	%0,1	%0,1	%0,2	6,9×10 ¹¹
2	% 1	% 1	%0,1	%0,1	%0,4	7,7×10 ¹¹
3	% 1	% 1	%0,1	%0,1	%0,8	7,4×10 ¹¹
4	% 1	%2,5	%0,3	%0,3	%0,2	7,6×10 ¹¹
5	% 1	%2,5	%0,3	%0,3	%0,4	9,4×10 ¹¹
6	% 1	%2,5	%0,3	%0,3	%0,8	9,2×10 ¹¹
7	% 1	%5	%0,5	%0,5	%0,2	7,5×10 ¹¹
8	% 1	%5	%0,5	%0,5	%0,4	8,1×10 ¹¹
9	% 1	%5	%0,5	%0,5	%0,8	9,0×10 ¹¹
10	%2,5	% 1	%0,3	%0,5	%0,2	9,3×10 ¹¹
11	%2,5	% 1	%0,3	%0,5	%0,4	9,9×10 ¹¹
12	%2,5	% 1	%0,3	%0,5	%0,8	9,7×10 ¹¹
13	%2,5	%2,5	%0,5	%0,1	%0,2	1,1×10 ¹²
14	%2,5	%2,5	%0,5	%0,1	%0,4	1,3×10 ¹²
15	%2,5	%2,5	%0,5	%0,1	%0,8	1,3×10 ¹²
16	%2,5	%5	%0,1	%0,3	%0,2	1,2×10 ¹²
17	%2,5	%5	%0,1	%0,3	%0,4	1,3×10 ¹²
18	%2,5	%5	%0,1	%0,3	%0,8	1,2×10 ¹²
19	%5	% 1	%0,5	%0,3	%0,2	9,4×10 ¹¹
20	%5	% 1	%0,5	%0,3	%0,4	1,0×10 ¹²
21	%5	% 1	%0,5	%0,3	%0,8	1,0×10 ¹²
22	%5	%2,5	%0,1	%0,5	%0,2	1,1×10 ¹²
23	%5	%2,5	%0,1	%0,5	%0,4	1,2×10 ¹²
24	%5	%2,5	%0,1	%0,5	%0,8	1,1×10 ¹²
25	%5	%5	%0,3	%0,1	%0,2	1,4×10 ¹²
26	%5	%5	%0,3	%0,1	%0,4	1,6×10 ¹²
27	%5	%5	%0,3	%0,1	%0,8	1,4×10 ¹²

Sonuçlar Minitab 17 yazılımı ile sinyal/gürültü oranı ve varyans analizi kullanılarak değerlendirildi. Buna göre optimum spor sayısı, %5 soya unu, %5 glukoz, %0,3 KH₂PO₄, %0,1 K₂HPO₄ ve %0,4 MgSO₄ içeren besiyerinden sağlandı (Şekil 25). Besiyerini oluşturan maddelerin farklı konsantrasyonlarının spor sayısına etkisi, varyans analizi ile değerlendirilerek (Tablo 29) faktörlerin etki oranları Şekil 26'de gösterildi.

Taguchi metodu ile belirlenen optimum koşullarda doğrulama deneyi gerçekleştirildi ve spor sayısı 1.47×10¹² cfu/ml olarak belirlendi. Minitab 17 yazılımı ile optimum koşullarda elde edilebilecek spor sayısı tahmin edilerek, doğrulama deneyinde elde edilen değerle karşılaştırıldı (Tablo 30).

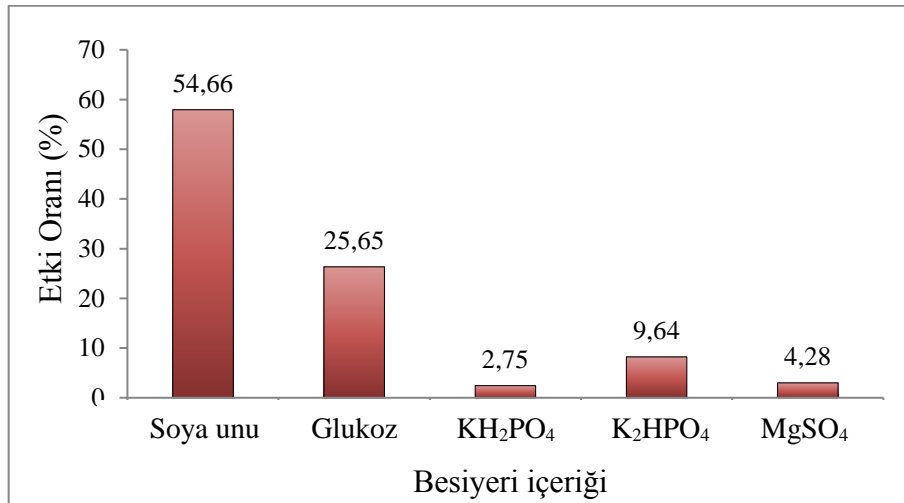


Şekil 25. Fermentasyonda kullanılan M4 besiyeri içerisindeki maddelerin optimizasyonu sonucu elde edilen sinyal gürültü oranı

Tablo 29. M4 besiyeri içeriğinin optimizasyonu için varyans analizi

Faktörler	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	P değeri
Model	1,39E+24	10	1,39E+23	51,29	0,0001*
Soya unu	7,86E+23	2	3,93E+23	144,55	0,0001*
Glukoz	3,69E+23	2	1,84E+23	67,82	0,0001*
KH ₂ PO ₄	3,95E+22	2	1,97E+22	7,27	0,0057*
K ₂ HPO ₄	1,38E+23	2	6,93E+22	25,49	0,0001*
MgSO ₄	6,15E+22	2	3,07E+22	11,31	0,0009*
Hata	4,35E+22	16	2,72E+21		
Toplam	1,43E+24	26			

*Faktörün önemli olduğunu gösterir (p<0,05).



Şekil 26. M4 besiyeri içerisindeki maddelerin spor sayısına etkisi

Tablo 30. Optimum tasarım için tahmin edilen ve belirlenen değerler

Tahmin (cfu/ml)	Ortalamanın standart hatası	%95 güven aralığı	Deney sonucu (cfu/ml)	Doğruluk
$1,51 \times 10^{12}$	$3,3 \times 10^{10}$	$1,44 \times 10^{12} - 1,58 \times 10^{12}$	$1,47 \times 10^{12}$	%97,35

3.7. Fermentörde Üretim

Optimum koşullar kullanılarak orta ölçekli üretim Sartorius marka fermentörle gerçekleştirildi. Optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon sonrası, besiyerindeki spor kristal karışımı santrüfüjleme ile toplandı ve canlı spor sayısı $1,42 \times 10^{12}$ cfu/ml olarak belirlendi. Elde edilen spor-kristal karışımı enkapsülasyonda kullanıldı.

3.8. Enkapsülasyon Koşullarının Optimizasyonu

Enkapsülasyon için püskürterek kurutma yöntemi kullanıldı. Sprey kurutucunun giriş ve çıkış sıcaklığı ile kaplama materyalinin enkapsülasyona etkisi Taguchi L_{16} ortogonal düzlemi yöntemi kullanılarak belirlendi ve yapılan deneyler sonrası elde edilen ürünlerin bir gramında bulunan spor sayısı standart plak sayım metodu ile belirlendi (Tablo 31).

Sonuçlar Minitab 17 yazılımı ile sinyal/gürültü oranı ve varyans analizi kullanılarak değerlendirildi. Buna göre optimum spor sayısı, kaplama materyali olarak maltodekstrin kullanıldığında ve sprey kurutucunun giriş ve çıkış sıcaklığı sırasıyla 160°C ve 70°C olarak ayarlandığında sağlandı (Şekil 27).

Kullanılan faktörlerin, püskürterek kurutma yöntemine etkisi varyans analizi (Tablo 32) ile değerlendirilerek, etki oranları Şekil 28’te gösterildi.

Çalışmalar sonucu elde edilen optimum koşullarda doğrulama deneyi gerçekleştirildi ve elde edilen ürünün spor sayısı $8,1 \times 10^{11}$ cfu/ml olarak belirlendi. Minitab 17 yazılımı ile optimum koşullarda elde edilebilecek spor sayısı, doğrulama deneyinde elde edilen değerle karşılaştırıldı (Tablo 33). Elde edilen sonucun tahmini değere yakın olduğu ve %91,01 doğruluk gösterdiği görüldü.

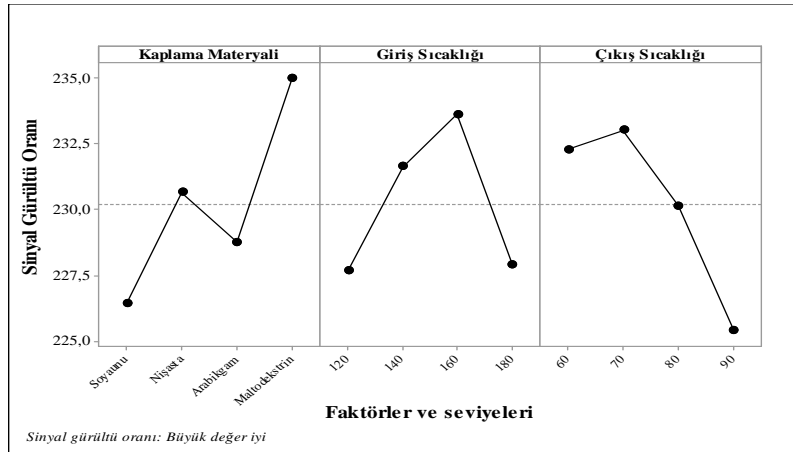
Tablo 31. Enkapsülasyona etki eden faktörler

Deney	Kaplama Materyali	Giriş Sıcaklığı	Çıkış Sıcaklığı	Spor Sayısı (cfu/g)
1	Soya unu	120°C	60°C	$1,8 \times 10^{11}$
2	Soya unu	140°C	70°C	$3,2 \times 10^{11}$
3	Soya unu	160°C	80°C	$3,3 \times 10^{11}$
4	Soya unu	180°C	90°C	$1,0 \times 10^{11}$
5	Nişasta	120°C	70°C	$4,1 \times 10^{11}$
6	Nişasta	140°C	60°C	$5,1 \times 10^{11}$
7	Nişasta	160°C	90°C	$3,4 \times 10^{11}$
8	Nişasta	180°C	80°C	$1,9 \times 10^{11}$
9	Arabik gam	120°C	80°C	$2,1 \times 10^{11}$
10	Arabik gam	140°C	90°C	$1,6 \times 10^{11}$
11	Arabik gam	160°C	60°C	$5,1 \times 10^{11}$
12	Arabik gam	180°C	70°C	$3,3 \times 10^{11}$
13	Maltodekstrin	120°C	90°C	$2,2 \times 10^{11}$
14	Maltodekstrin	140°C	80°C	$8,1 \times 10^{11}$
15	Maltodekstrin	160°C	70°C	$9,3 \times 10^{11}$
16	Maltodekstrin	180°C	60°C	$6,1 \times 10^{11}$

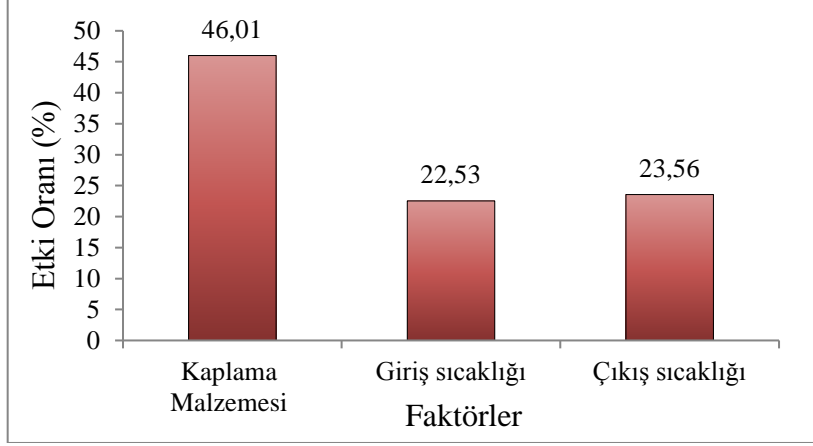
Tablo 32. Enkapsülasyona etki eden faktörlerin varyans analizi

Faktör	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kareler	F-değeri	Prob>F
Model	$7,75 \times 10^{23}$	9	$8,61 \times 10^{22}$	7,78	0,0107*
Kaplama Materyali	$3,87 \times 10^{23}$	3	$1,29 \times 10^{23}$	11,65	0,0065*
Giriş Sıcaklığı	$1,89 \times 10^{23}$	3	$6,32 \times 10^{22}$	5,71	0,0343*
Çıkış Sıcaklığı	$1,98 \times 10^{23}$	3	$6,61 \times 10^{22}$	5,97	0,0311*
Hata	$6,65 \times 10^{22}$	6	$1,10 \times 10^{22}$		
Toplam	$8,42 \times 10^{23}$	15			

*Faktörün önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$).



Şekil 27. Enkapsülasyonda kullanılan faktörlerin sinyal gürültü oranı



Şekil 28. Enkapsülasyona etki eden faktörlerin etki oranı

Tablo 33. Optimum tasarım için tahmin edilen ve belirlenen değerler

Tahmin (cfu/ml)	Ortalamanın standart hatası	%95 güven aralığı	Deney sonucu (cfu/ml)	Doğruluk
$8,9 \times 10^{11}$	$8,32 \times 10^{10}$	$6,9 \times 10^{11} - 1,1 \times 10^{12}$	$8,1 \times 10^{11}$	%91,01

3.9. Optimum Şartlarda Üretilen Ürünün Özellikleri

Optimum koşullarda elde edilen ürünün, elektron mikroskopisi yardımıyla morfolojik özelliği, partikül boyut analizi, ıslanabilirliği, süspansibilitesi ve nem içeriği gibi özellikleri belirlendi.

3.9.1. Elektron Mikroskopisi

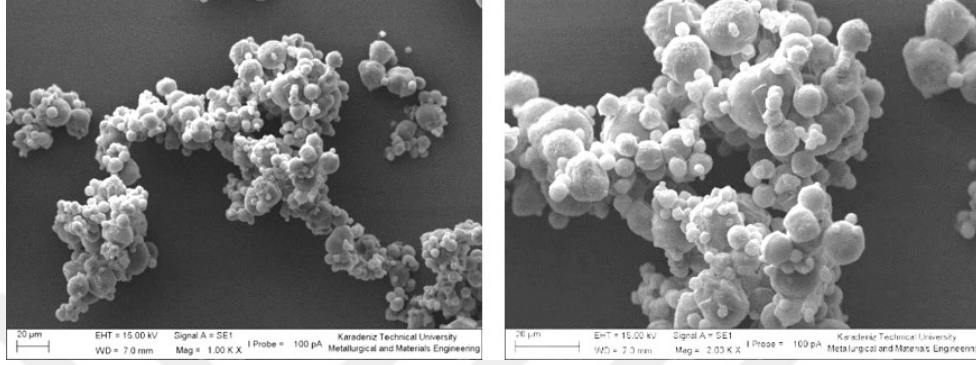
Ürünün elektron mikroskobu ile farklı büyütme oranlarında fotoğrafları çekildi ve spor-kristal karışımının kaplama materyali ile matriks bir yapı oluşturduğu gözlemlendi. Matriks yapının hem içerisinde hem de yüzeyinde spor ve kristaller görüldü (Şekil 29).

3.9.2. Partikül Boyut Analizi

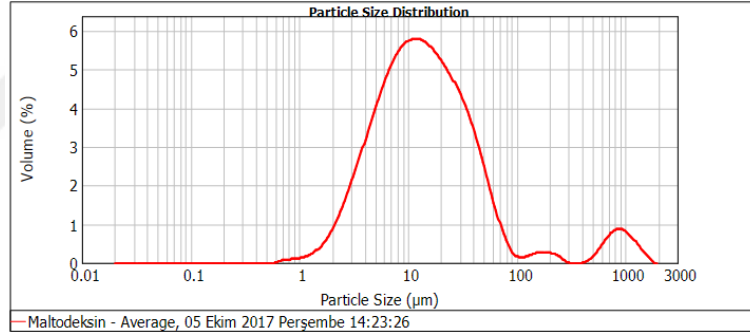
MasterSizer 2000 partikül analiz cihazı ile yapılan partikül boyut analizi ile ürünün ortalama partikül boyutunun $13.462 \mu\text{m}$ olduğu belirlendi. Ürünün %43,99'unun $10 \mu\text{m}$ 'den, %85,12'sinin $50 \mu\text{m}$ 'den %93,85'inin $100 \mu\text{m}$ 'den küçük olduğu belirlendi (Şekil 30).

3.9.3. Islanabilirlik, Süspansibilite ve Nem İçeriği

Ürünün ıslanabilirliği için yapılan çalışmalarda ıslanabilme süresi $25,22 \pm 1,75$ saniye, süspansen olma yüzdesi %77,66, nem içeriği $\%7,29 \pm 0,16$ olarak belirlendi.



Şekil 29. Elde edilen biyopestisidin elektron mikroskopisi



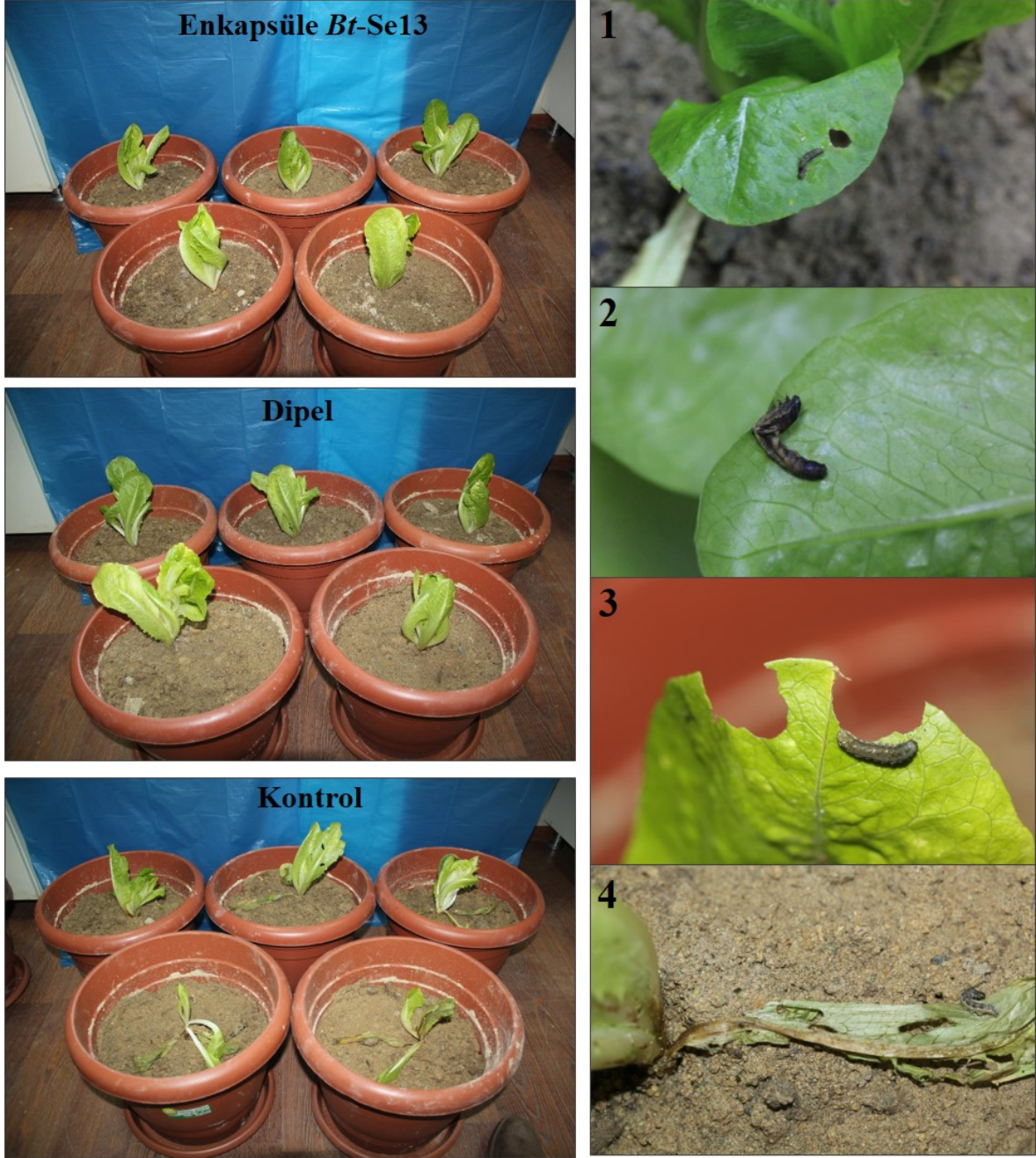
Şekil 30. Optimum koşullarda üretilen ürünün partikül boyut analizi

3.10. Ürünün Entomotoksitesisi

3.10.1. *Spodoptera exigua* Üzerindeki Etkisi

Zararlı üzerinde *B. thuringiensis* Se13'ün spor-kristal karışımı, enkapsüle formülasyonu ve ticari ürün Dipel test edildi. Test edilen tüm ürünler 10^9 cfu/ml konsantrasyonda zararlı üzerinde %100 mortalite gösterdi. Aynı konsantrasyonda ürünlerin medyan ölüm zamanı Tablo 34'de gösterildi. Ayrıca, enkapsüle *B. thuringiensis* Se13, spor-kristal karışımı ve Dipel için medyan letal konsantrasyonları sırasıyla $1,6 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$ ve $4,6 \times 10^4$ cfu/ml olarak belirlendi (Tablo 35).

Saksı denemelerinde uygulama sonrası ölümler her gün takip edilerek marullarda meydana gelen değişiklikler fotoğraflandı (Şekil 31). Uygulamada enkapsüle *B. thuringiensis* Se13 zararlı üzerinde %93, ticari ürün Dipel ise %90 larval mortalite gösterdi. Medyan letal zamanı (LT_{50}) ise enkapsüle *B. thuringiensis* Se13 ve Dipel için sırasıyla 2,53 gün ve 3,19 gün olarak belirlendi (Tablo 36).



Şekil 31. Saksı denemeleri. 1. Enkapsüle *B. thuringiensis* uygulaması gerçekleştirilen grupta ölen larva, 2. Ticari ürün Dipel uygulama grubunda ölen larva, 3-4. Kontrol grubunda beslenen ve bitkiyi tahrip eden larva

Tablo 34. Ürünlerin laboratuvar ortamında 10^9 cfu/ml konsantrasyonda zararlı üzerindeki ölüm oranları ve medyan letal zamanları (LT_{50})

Ürünler	Mortalite (%)	LT_{50} (gün) (FL, %95)	Slope \pm SE	X^2
Enkapsüle <i>Bt</i> -Se13	100 ^a	0,8 ^a (0,617-0,976)	3,03 \pm 0,264	10,14
Spor-kristal karışımı	100 ^a	1,638 ^c (1,025 – 2,174)	6,03 \pm 0,156	24,79
Dipel	100 ^a	1,04 ^b (0,623 – 1,413)	4,497 \pm 0,19	20,27

FL: Güven aralığı, Slope: Eğim, SE: Standart hata, X^2 : Ki-kare. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma metodu kullanılmıştır. Aynı kolonda yer alan farklı küçük harfler önemli farklılıkları göstermektedir (P < 0,05).

Tablo 35. Ürünlerin laboratuvar ortamında zararlı üzerindeki medyan letal konsantrasyonu (LC_{50})

Ürünler	LC_{50} (cfu/ml) (FL, %95)	Slope \pm SE	LC_{95}	df	X^2
Enkapsüle <i>Bt</i> -Se13	1,6 $\times 10^4$ a (5,8 $\times 10^3$ – 3,7 $\times 10^4$)	10,48 \pm 0,04	6,6 $\times 10^7$	4	6,22
Spor-kristal karışımı	1,0 $\times 10^5$ c (5,2 $\times 10^4$ – 1,7 $\times 10^5$)	13,91 \pm 0,04	1,2 $\times 10^8$	4	4,74
Dipel	4,6 $\times 10^4$ b (3,1 $\times 10^3$ – 2,1 $\times 10^5$)	11,60 \pm 0,04	3,8 $\times 10^8$	4	9,59

FL: Güven aralığı, Slope: Eğim, SE: Standart hata, df: Serbestlik derecesi, X^2 : Ki-kare. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma metodu kullanılmıştır. Aynı kolonda yer alan farklı küçük harfler önemli farklılıkları göstermektedir (P < 0,05).

Tablo 36. Ürünlerin saksı denemelerinde zararlı üzerindeki ölüm oranları ve medyan letal zamanları (LT_{50})

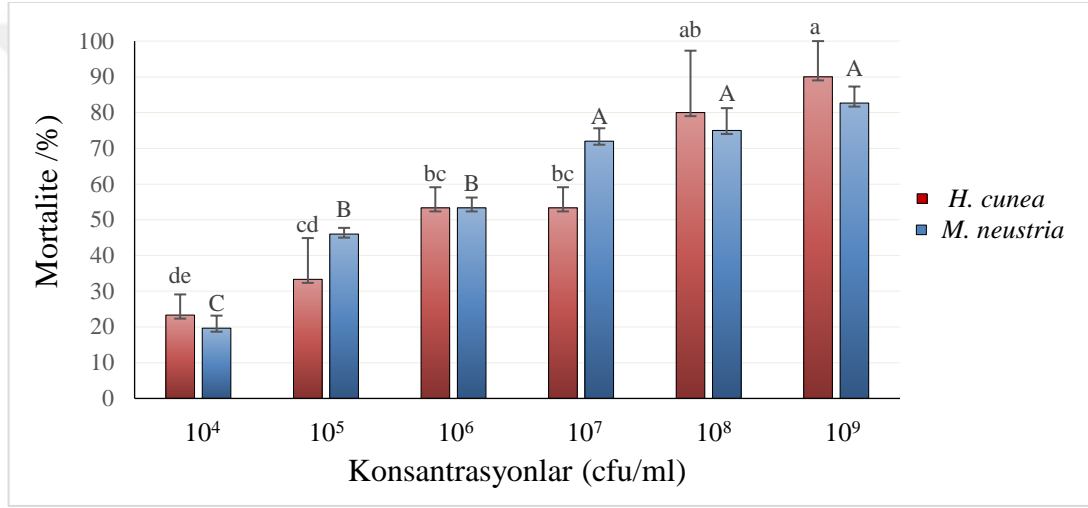
Ürünler	Mortalite (%)	LT_{50} (gün) (FL, %95)	Slope \pm SE	X^2
Enkapsüle <i>Bt</i> -Se13	93 ^a	2,53 ^a (2,17-2,88)	8,10 \pm 0,171	12,16
Dipel	90 ^a	3,19 ^b (2,46-3,87)	8,26 \pm 0,171	33,63

FL: Güven aralığı, Slope: Eğim, SE: Standart hata, X^2 : Ki-kare. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma metodu kullanılmıştır. Aynı kolonda yer alan farklı küçük harfler önemli farklılıkları göstermektedir (P < 0,05).

3.10.2. Konak Spektrumu

Enkapsüle *B. thuringiensis* Se13'ün insektisidal aktivitesi Amerikan beyaz kelebeği ve Yüzük kelebeği larvaları üzerinde test edildi. Amerikan beyaz kelebeği üzerinde 10^9 cfu/ml konsantrasyonda %90 ölüm, Yüzük kelebeği üzerinde ise aynı konsantrasyonda %82 ölüm meydana getirdi (Şekil 32).

Enkapsüle *B. thuringiensis* Se13'ün medyan letal konsantrasyonu (LC_{50}) *H. cunea* larvaları için $1,12 \times 10^6$ cfu/ml, *M. neustria* larvaları için $6,71 \times 10^5$ cfu/ml olarak belirlendi (Tablo 37).



Şekil 32. Enkapsüle *Bt*-Se13'ün *H. cunea* ve *M. neustria* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi. Standard sapma çubuklarının üzerindeki farklı harfler önemli istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Tablo 37. Enkapsüle *Bt*-Se13'ün *H. cunea* ve *M. neustria* larvaları üzerindeki medyan letal konsantrasyonu (LC_{50})

Zararlı	LC_{50} (cfu/ml) (FL , %95)	Slope $\pm SE$	LC_{95}	df	X^2
<i>H. cunea</i>	$1,12 \times 10^6$ a ($3,75 \times 10^5$ - $3,02 \times 10^6$)	$0,40 \pm 0,035$	$1,93 \times 10^{10}$	4	7,38
<i>M. neustria</i>	$6,71 \times 10^5$ b ($8,98 \times 10^4$ - $3,06 \times 10^6$)	$0,34 \pm 0,034$	$5,25 \times 10^{10}$	4	8,50

FL : Güven aralığı, Slope: Eğim, SE : Standart hata, df : Serbestlik derecesi, X^2 : Ki-kare. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma metodu kullanılmıştır. Aynı kolonda yer alan farklı küçük harfler önemli farklılıkları göstermektedir ($P < 0,05$).

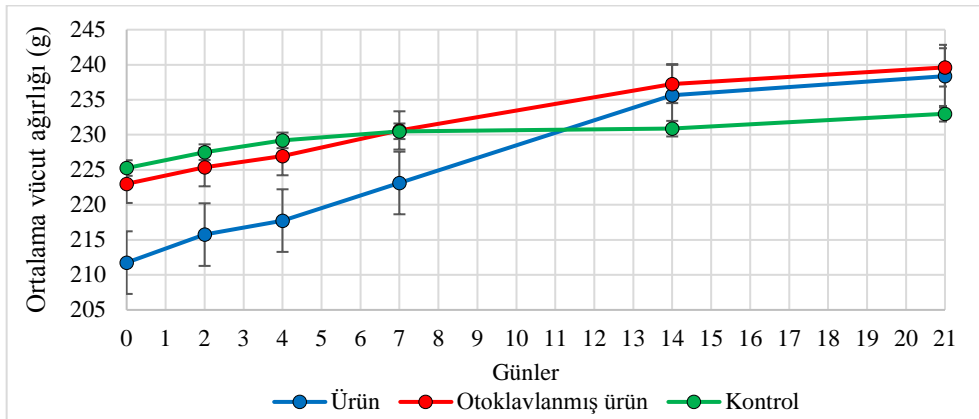
3.11. Ürünün Memeli Toksisitesi

Elde edilen ürünün patojenite toksisite testleri sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda uygulama yapılan herhangi bir grupta ölüm meydana gelmedi. Ayrıca sıçanların davranışlarında herhangi bir anormallik görülmezken ortalama vücut ağırlıklarının çalışma boyunca arttığı görüldü (Şekil 33-35).

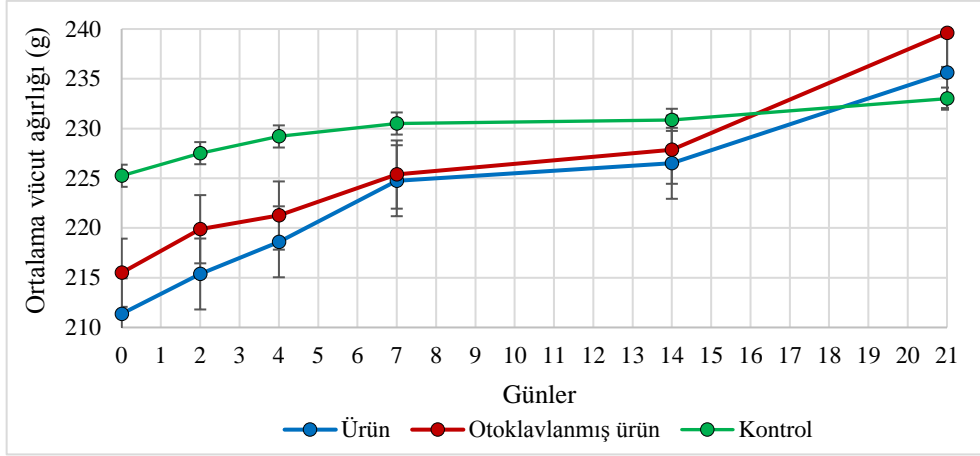
Oral toksisite/patojenite testlerinde kontrol grubunun ortalama vücut ağırlığı %3,44 artarken, ürün ve otoklavlanmış ürün uygun gruplarda ise sırasıyla %12,57 ve %7,45 arttı. İkinci günde alınan dışkı örneklerinde bakteri sayısı, $4,6 \times 10^5$ cfu/g, 4. günde alınan örneklerde ise $1,7 \times 10^5$ cfu/g olarak belirlendi, ancak daha sonraki günlerde alınan örneklerde *B. thuringiensis* varlığına rastlanmadı.

Subkutan toksisite/patojenite testlerinde kontrol grubunun ortalama vücut ağırlığı %3,44 artarken, ürün ve otoklavlanmış ürün uygun gruplarda ise sırasıyla %11,47 ve %11,19 arttı. İkinci günde alınan kan örneklerinde bakteri sayısı, 14 cfu/g, 4. günde alınan örneklerde ise 5 cfu/g, 7. günde alınan örneklerde ise 1 cfu/g olarak belirlendi, ancak daha sonraki günlerde alınan örneklerde bakteri izine rastlanmadı.

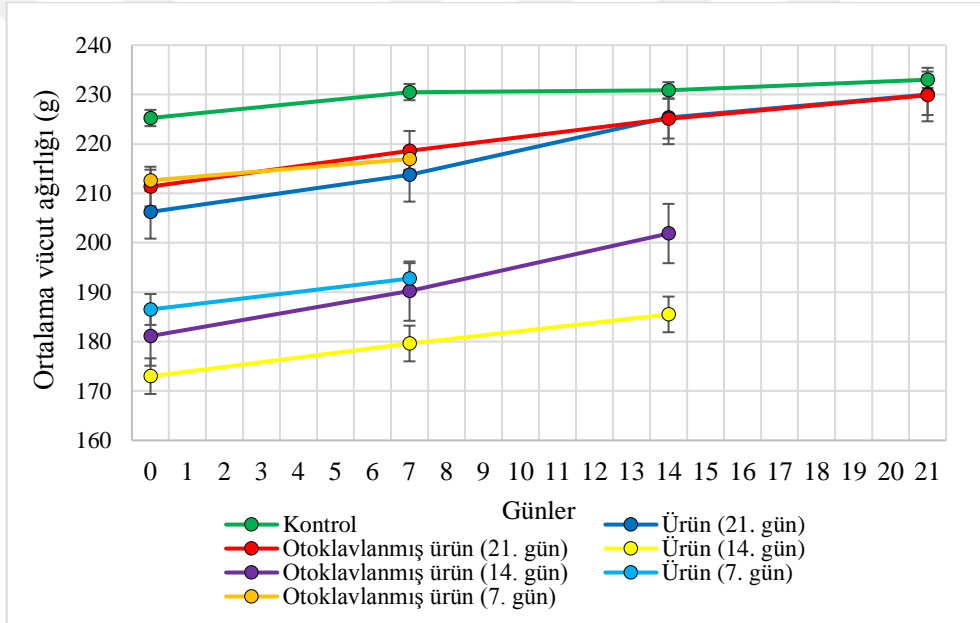
Pulmonar toksisite/patojenite testlerinde kontrol grubunun ortalama vücut ağırlığı %3,44 artarken, ürün ve otoklavlanmış ürün uygun gruplarda ise sırasıyla %11,51 ve %8,75 arttı. Yedinci günde alınan akciğer örneklerinde bakteri sayısı, 3 cfu/g, 14. günde alınan örneklerde ise 1 cfu/g olarak belirlendi. 21. günde alınan örneklerde ise bakteri izine rastlanmadı.



Şekil 33. Akut oral toksisite/patojenite testi



Şekil 34. Akut subkutan toksisite/patojenite testi



Şekil 35. Akut pulmonar toksisite/patojenite testi

4. TARTIŞMA

İnsanoğlunun zararlı böceklerle mücadelesi tarihin ilk dönemlerinde başlamıştır. Bazı hastalıkları yaymaları ve tarım alanlarında oluşturdukları zararlar yüzünden böceklerle mücadele etmek zorunlu hale gelmiştir. Zararlı böceklerle mücadele başlangıçta doğal yöntemlerle başlamış fakat yerini zamanla sentetik kimyasallar almıştır. Halen en çok tercih edilen yöntem olmasına rağmen, hedef dışı organizmalara olan yan etkileri, böceklerde direnç gelişimine neden olması, besinlerde kalıntı bırakması vb. birçok sebepten ötürü alternatif mücadele yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur.

Gerçekleştirilen çalışmalar ile *S. exigua*'dan kültüre edilebilir 15 bakteri izole edildi. İzolatların tanımlanması fenotipik, genotipik ve filogenetik yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılan tanımlara çalışmaları sonucunda;

Se2 ve Se15 numaralı izolatların *Lysinibacillus* cinsi bakteriler oldukları belirlendi. N-asetil D-glukozamin testi iki izolat için de negatif olduğundan dolayı izolatların *L. boronitolerans*, *L. fusiformis* ve *L. pakistanensis* olmadığı belirlendi. Se2 numaralı izolat %5 ve %7 tuz içeren besiyerinde büyüme göstermediği için *L. macroides*, Se15 numaralı izolat %7 tuz içeren besiyerinde büyüme gösterdiğinden *L. fusiformis* olarak tanımlandı. Daha önceleri *Bacillus macroides* olarak tanımlanan *L. macroides*, Coorevits vd. (2012) tarafından yeniden tanımlanmış ve literatüre kazandırılmıştır. *L. macroides* daha önce Chandel vd. (2013) tarafından *Culex quinquefasciatus* (Culicidae: Diptera) erginlerinin orta bağırsak florasında tespit edilmiştir. Bakteri lepidoptera takımına bağlı bir zararlı olan *S. exigua*'dan izole edildi ve zararlı üzerindeki insektisidal aktivitesi %70 olarak belirlendi. *L. fusiformis* ise *Bacillus fusiformis* olarak bilinmekte iken Ahmed vd. (2007) tarafından yeniden isimlendirilmiştir. Tranchida vd. (2011) tarafından *L. fusiformis* K7865 suşu *Culex pipiens*, *Culex apicinus* ve *Culex dolosus* üzerinde test edilmiş, medyan ölüm dozu sırasıyla $1,5 \times 10^{10}$ spor/ml, $4,3 \times 10^{10}$ spor/ml ve $1,1 \times 10^8$ spor/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda *L. fusiformis* olarak tanımlanan Se15 izolatu ise *S. exigua* larvaları üzerinde %26,66 ölüm meydana getirdi. Gerçekleştirilen çalışmalar bakterinin insektisidal aktivitesinin oldukça düşük olduğunu göstermiştir.

Se4, Se10 ve Se11 numaralı izolatların *Paenibacillus* cinsi bakteriler oldukları belirlendi ve tip suşları ile karşılaştırıldı. Se4 numaralı izolatu, L-rhamnose ve glukoz testi

pozitif olduğu için *P. amylolyticus* ve *P. tundrae*, *P. cucumis* olmadığı, *P. tylopili* olduğu belirlendi. Se11 numaralı izolatın ise D-riboz ve β -xylosidase testi negatif olduğu için *P. tundrae*, *P. amylolyticus* ve *P. tylopili* olmadığı, *P. xylanexedens* olduğu belirlendi. Se10 numaralı izolatın D-riboz testi ve *myo*-inositol testi pozitif olduğundan *P. xylanexedens* ve *P. tylopili* olmadığı, inulin testi negatif olduğu için izolatın *P. amylolyticus* olduğu belirlendi. *Paenibacillus* cinsi birçok bakteri bitki büyümesini teşvik ederken, aynı zamanda bitkinin direnç mekanizmasını indükleyerek veya ürettikleri biyosidal ürünlerle bitki patojeni birçok bakteri ve fungustan bitkiyi korumaktadır (Von Der Weid vd., 2005; Zhou vd., 2008; Phi vd., 2010) Ayrıca, ürettikleri kitinaz enzimi ile zararlı böceklerin mücadelesinde kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Amerika'da zararlı böceklerle mücadele için ruhsatlandırılan ilk mikrobiyal mücadele etmeni olan *P. popilliae* Lepidoptera ve Coleoptera takımından zararlılara karşı kullanılmaktadır (Grady vd., 2016). Sharma vd. (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmada Coleoptera takımından *Brahmina coriacea*'dan izole edilen *P. tylopili* zararlı üzerinde %22 ölüm meydana getirmiştir. Çalışmamızda izole edilen *P. tylopili*, *P. xylanexedens* ve *P. amylolyticus* ise *S. exigua* üzerinde sırasıyla %43, %40 ve %36 mortalite gösterdi.

Se3 izolatının gram negatif bir bakteri olduğu ve *Pseudomonas hibiscicola*, *Pseudomonas geniculata*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Stenotrophomonas pavanii* türleri ile %99 benzerlik gösterdiği belirlendi. Biyokimyasal test sonuçlarının tip suşlarla karşılaştırılması sonucu; izolat %5 tuz içeren besiyeri ortamında büyüebildiğinden *S. pavanii* ve *P. hibiscicola* olmadığı belirlendi. Ayrıca, üreaz enzimi üretebildiği için izolatın *P. geniculata* olduğuna karar verildi. *Pseudomonas* cinsi bakteriler toprak, su, bitki ve hayvan dokularında bulunabilir. Bakteri Yadav vd. (2015) tarafından Diptera takımından *Aedes albopictus*'tan, Snyman vd. (2016) tarafından Lepidoptera takımından *Busseola fusca*'dan izole edilmiş, ancak entomopatojen etkisi test edilmemiştir. Çalışmada izole edilen *P. geniculata* Se3 suşu *S. exigua*'nın 3. dönem larvaları üzerinde test edildi ve 10^9 cfu/ml konsantrasyonda %66 ölüm meydana getirdi.

Se5 numaralı izolatın *Staphylococcus* cinsi bakterilerden *S. succinus*, *S. equorum* veya *S. gallinarum* olabileceği belirlendi. D-riboz testi negatif olduğu için izolatın, *S. equorum* ve *S. gallinarum* olmadığı, *S. succinus* olduğu belirlendi. Bakteri daha önce fermente et ürünlerinden, peynirden ve klinik örneklerden izole edilmiştir (Place vd., 2002; Nováková vd., 2006; Kesmen vd., 2012). Ayrıca Cardoza vd. (2009) tarafından *Dendroctonus rufipenni* (Coleoptera: Curculionidae) erginlerinin ağız salgısından da izole

edilmiştir. Bakterinin daha önceki çalışmalarda insektisidal aktivitesi çalışılmamıştır. Çalışmada izole edilen *S. succinus* Se5 izolatu *S. exigua* üzerinde düşük ölüm (26,6) meydana getirmiştir.

Se6 numaralı izolatu *Acinetobacter* cinsine ait *A. soli* veya *A. calcoaceticus* olduğu belirlendi. Lipaz testi pozitif olduğu için izolatu *A. soli* olduğuna karar verildi. *Acinetobacter* cinsi bakteriler genellikle toprak ve suda olmakla birlikte böceklerden izole edilen örnekler de vardır. Manguin vd. (2013) tarafından *Anopheles* cinsi sivrisineklerden Chandel vd. (2013) tarafından *Culex quinquefasciatus*'tan izole edilmiş ancak insektisidal aktivitesi araştırılmamıştır. Bahar ve Demirbag (2007) tarafından *Oberea linearis*'ten, Sezen vd. (2007) tarafından *Melolontha melolontha*'dan izole edilmiş ve zararlılar üzerinde test edilmiştir. Ancak iki çalışmada da izolatların insektisidal aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir. Çalışmamızda, *S. exigua*'dan izole edilen *A. soli* Se6 izolatu zararlı üzerinde %26,6 gibi düşük bir etkiye sahip olduğu belirlendi.

Se7 numaralı izolatu *Chryseobacterium indologenes* ve *Chryseobacterium arthrosphaerae* türlerine %99 benzerlik gösterdiği belirlendi. Üreaz testinin negatif, trehaloz testinin pozitif olmasından dolayı izolatu *C. indologenes* olduğuna karar verildi. Daha önceden *Flavobacterium indologenes* olarak tanımlanan bu tür bugüne kadar topraktan, gıda maddelerinden, bitkilerden, su kaynaklarından, hastanelerden ve bazı omurgasızlardan izole edilmiştir. Burešová vd. (2006) tarafından akar türlerinden *Ornithodoros moubata*'dan izole edilmiş ve 10^9 bakteri/ml konsantrasyonda zararlı üzerinde %100 ölüm meydana getirmiştir. Buna rağmen, *S. nonagrioides*'ten izole edilen *C. indologenes* (Sn6) zararlı üzerinde $1,8 \times 10^9$ bakteri/ml konsantrasyonda %45 öldürücü etkiye neden olmuştur (Eski vd., 2015). Bu çalışmada izole edilen *C. indologenes* Se7 izolatu *S. exigua* üzerindeki insektisidal etkisi ise %36,66 olarak belirlenmiştir.

Se9 numaralı izolatu kırmızı pigment üreten *Serratia* cinsi bir bakteri olduğu ve *S. marcescens*, *S. nematodiphila* ve *S. ureilytica* ile %99 benzerlik gösterdiği belirlendi. Üreaz ve adonitol testleri negatif olduğu için izolatu *S. marcescens* olduğu belirlendi. *S. marcescens*'in habitatları toprak, su, bitkiler ve hayvanlardır. Bakteri, farklı takımlara ait çeşitli böceklerden izole edilmiş ve biyolojik mücadelede kullanılabilirliği araştırılmıştır. Sezen ve Demirbag (1999) tarafından yapılan çalışmada Coleoptera takımına ait *Balaninus nucum* (Fındıkkurdu)'dan izole edilmiş ve insektisidal aktivite çalışmalarında zararlı üzerinde %100 ölüm meydana getirmiştir. Eski vd. (2015) tarafından, Lepidoptera takımından *S. nonagrioides* (Mısır koçankurdu)'den izole edilmiş ve zararlı üzerinde %71

ölüm meydana getirmiştir. Ragvendran ve Natarajan (2017) tarafından ise topraktan izole edilen *S. marcescens* Diptera takımından *Aedes aegypti* (Sarı humma sivrisineği) ve *Culex quinquefasciatus* (Diptera)'in kontrolü için kullanılmış ve *A. aegypti* larvalarına karşı 400 ppm konsantrasyonda %94,44, *C. quinquefasciatus* larvalarına karşı %93,33 ölüm etkisi göstermiştir. Bu tez çalışmasında ise *S. marcescens* Se9 suşunun *S. exigua*'ya karşı insektisidal aktivitesi %73,33 olarak belirlendi. Bakterinin insektisidal aktivitesinin ürettiği kitinaz enzimlerinden kaynaklandığı bilinmektedir. Danismazoglu vd. (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *H. armigera* (Yeşilkurt)'dan izole edilen *S. marcescens*'in kitinaz proteinlerinin ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve kitinaz A, B ve C proteinleri *M. neustria* (Yüzük kelebeği) üzerinde sırasıyla %47, %50 ve %66 insektisidal aktivite, *H. armigera* (Yeşilkurt) üzerinde ise sırasıyla %80, %45 ve %50 insektisidal aktivite göstermiştir.

Se1, Se8, Se13 ve Se14 numaralı izolatların *Bacillus cereus* grubu bakteriler oldukları belirlendi. Se1 numaralı izolatın kolonileri petri üzerinde rizoid oluşturmadığından *Bacillus mycoides* olmadığı, lam lamel arası preperasyonda ışık mikroskopunda kristal proteinler görülmediğinden *Bacillus thuringiensis* olmadığı, metil α -D glukopiranosit testi negatif olduğundan *B. toyonensis* olmadığı, izolatın *Bacillus cereus* olduğu belirlendi. Se8 numaralı izolatın, metil α -D glukopiranosit testi pozitif olduğundan *B. toyonensis* olduğu belirlendi. Se13 ve Se14 numaralı izolatların ise PCR ile *cry* gen içeriğinin araştırılması sonucu *cry1* ve *cry2* genini içerdiği tespit edilerek, izolatların *Bacillus thuringiensis* olduğuna karar verildi. Biyokimyasal testlerindeki bazı farklılıklardan dolayı izolatların *B. thuringiensis*'in farklı alttürleri olabileceği düşünülmektedir.

Bugüne kadar *Bacillus thuringiensis*'in birçok alttürü farklı böceklerden izole edilerek zararlıların biyolojik mücadelesinde kullanımı araştırılmıştır. Sezen vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada, *Xyleborus dispar* (Dalkıran)'dan izole edilen *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* (Xd3), $1,8 \times 10^9$ cfu/ml konsantrasyonda *Agelastica alni* (Kızılağaç böceği), *Amphimallon solstitiale* (Mayıs böceği) ve *Melolontha melolontha* (Mayıs böceği) üzerinde test edilmiş ve test edilen tüm zararlılar üzerinde %100 insektisidal aktivite göstermiştir. Sezen ve Demirbag (1999) tarafından çalışmada *B. thuringiensis* spp. *kurstaki* (BnBt), *B. nucum*'dan izole edilmiştir. Bu izolat kullanılarak gerçekleştirilen insektisidal aktivite çalışmalarında $1,8 \times 10^9$ cfu/ml konsantrasyonda *A. lineatus* (Tel kurdu) üzerinde %100 (Danışmazoğlu vd., 2012), *S. littoralis* (Pamuk yaprakkurdu) üzerinde %100 (Çakıcı vd., 2014), *A. alni* üzerinde %72,3 (Eski vd., 2017) ölüm meydana getirdiği bildirilmiştir. Yılmaz vd. (2012) *Ephestia kuehniella* (Değirmen güvesi) ve *Plodia*

interpunctella (Kuru meyve güvesi) üzerinde yaptıkları çalışmada *B. thuringiensis* SY49.1 suşunun insektisidal etkinliğini araştırmış ve spor-kristal karışımlarının zararlıların larvaları üzerinde %90'dan fazla ölüm meydana getirdiğini rapor etmiştir. Bizim çalışmamızda izole edilen *B. thuringiensis* Se13 suşu, $1,8 \times 10^9$ cfu/ml konsantrasyonda *S. exigua*'nın 3. dönem larvalarında uygulamadan 48 saat sonra %75 ölüm, 7 gün sonra ise %100 ölüm meydana getirmiştir.

S. exigua'nın mikrobiyal mücadelesinde de *B. thuringiensis* ve toksinleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar mevcuttur. Cry1Ac ve Cry1C toksinleri kullanılarak *S. exigua*'nın yumurtadan yeni çıkan larvaları üzerinde gerçekleştirilen çalışmada Cry1Aa toksinleri için LC₅₀ değeri 3,93 mg/g, Cry1C toksinleri içinse 1,466 mg/g olarak belirlenmiştir. Toksinlerin eşit oranda karıştırılması ile yapılan çalışmada ise LC₅₀ değerinin 0,537 mg/g'a düştüğü, toksinlerin sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir (Xue et al., 2005). Yumurtadan yeni çıkan larvalar üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise Cry9Aa1 ve Cry9Aa5 proteinlerinin etkisi araştırılmıştır. Cry9Aa1 proteini zararlı üzerinde toksik etki göstermezken, Cry9Aa5 zararlı üzerinde toksik etki göstermiştir ve LC₅₀ değeri 774 ng/cm² olarak belirlenmiştir (Naimov vd., 2014). *B. thuringiensis* Se13 izolatının 3. dönem larvalar üzerindeki denemeler sonucu LC₅₀ değeri 7.5×10^4 cfu/ml olarak hesaplanmıştır. Hernández-Martínez vd. (2008) ise 9 farklı *B. thuringiensis* toksinini zararlı üzerinde test etmiş, Cry1Ca, Cry1Da ve Cry1Fa toksinlerinin zararlı üzerinde oldukça etkili, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ba ve Cry2Aa toksinlerinin ise kısmen etkili olduğunu belirtmiştir. Bunun aksine, Kim vd. (2017) 30 µg/ml konsantrasyonda Cry1Ac toksininin *S. exigua*'nın 3. dönem larvaları üzerinde %100 ölüme neden olduğu tespit edilmiştir. Yuan vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada ise Cry2Aa toksininin zararlı üzerinde yüksek derecede toksik olduğu belirlenmiştir. Kim vd. (2017) ve Yuan vd. (2017)'nin yaptığı çalışmalara benzer şekilde, Cry1Ac ve Cry2Aa toksinlerini içeren *B. thuringiensis* Se13'ün zararlı üzerinde oldukça toksik olduğu belirlendi.

B. thuringiensis'in kitlesel üretimi için en çok tercih edilen yöntem sıvı kültür fermentasyonudur. Bakteri, büyümesi için gerekli karbon, azot ve eser elementleri içeren sıvı besiyerine inoküle edilerek kesikli fermentasyon ile üretimi gerçekleştirilir. Besiyeri ve fermentasyon koşulları hem bakterinin büyümesini hem de metabolitlerin üretilmesini etkiler. *B. thuringiensis*'in insektisidal aktivitesi de spor ve kristal miktarıyla doğrudan ilgilidir. Bu sebeple, birçok bilim insanı yüksek miktarda spor-kristal üretmek amacıyla fermentasyon koşullarının optimizasyonu üzerine çalışmalar yapmaktadır. Bu çalışmada

Taguchi metodu kullanılarak inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, besiyeri başlangıç pH'sı ve besiyeri içeriğinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyon süresinin spor-kristal üretimini önemli ölçüde etkilediği bilinmektedir. *B. thuringiensis* kültürlerinde maksimum hücre miktarı 18. saatte görülür. Ancak sporulasyon, kristal üretimi ve lizis için daha fazla süre gereklidir. Dulmage vd. (1990) tarafından *B. thuringiensis israelensis* için logaritmik faz 16-18 saat, sporulasyon 20-24 saat, hücre lizisi 35-40 saatte tamamlanır. Ancak Lepidopterler üzerinde etkili olan *B. thuringiensis* izolatları için fermentasyon süresi değişkenlik gösterebilir. Fermentasyon süresi Beegle vd. (1991) tarafından 40-44 saat, Lisansky vd. (1993) tarafından 57 saat, Couch ve Jurat-Fuentes (2014) tarafından ise 62-92 saat olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda izole edilen *B. thuringiensis* Se13 suşundan maksimum spor-kristal üretimi için inkübasyon süresi 72 saat olarak belirlendi. İnkübasyon süresi uzun tutulduğunda delta-endotoksinlerin ortamdaki proteazlar tarafından degrade olduğu gözlemlenmiştir. Spor-kristal üretimi ile proteolitik aktivite arasında negatif bir korelasyon olduğu, proteolitik aktivite arttığında delta-endotoksinlerin proteazlarca hidrolize uğradığı ve konsantrasyonunun düştüğü belirlenmiştir (Ennouri vd., 2013).

B. thuringiensis'lerin toksin üretimi genellikle 30°C'de gerçekleşir ancak suşlara göre farklılık gösterir. *B. thuringiensis israelensis* HD500 suşundan Cry4Ba toksinin sentezi optimum 25°C'de gerçekleşirken, Cry11Aa toksin sentezi 30°C'de gerçekleşir (Özkan vd. 2003). Ayrıca toksin sentezinin 35°C'de olumsuz etkilendiği Lacey (1984) ve Yousten vd. (1984) tarafından bildirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan *B. thuringiensis* Se13 suşu için optimum sıcaklık 30°C olarak belirlendi.

B. thuringiensis'lerin hem büyümesi hem de toksin sentezi için kullanılan besiyeri ortamının pH'sı nötral ya da alkali olmalıdır. Zayıf asidik ortam (pH=5) bakteri büyümesine imkan tanırken, delta-endotoksin üretimini direk etkileyen metabolik yolağın çalışmasını engelleyebilir. Buna rağmen İçgen vd. (2002) ise yaptıkları çalışmada *B. thuringiensis* 81 suşunun pH 5,5-6,5 aralığındaki besiyerinde delta-endotoksin üretimi gerçekleştiğini belirlemiştir. Zou vd. (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, kuvvetli asit (pH=3) ve kuvvetli baz (pH=11) ortamlarda endotoksin miktarının düşük miktarda olduğu, pH7 ve pH9 ortamlarda ise yüksek olduğu belirlenmiştir. *B. thuringiensis* Se13'ün spor kristal üretimi için en uygun besiyeri başlangıç pH'sı 9 olarak belirlenmiştir.

İnkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı ve pH'ın yanında kullanılan besiyeri ve içeriğindeki maddelerin konsantrasyonu da spor-kristal üretimi üzerinde etkilidir. Çalışmada kullanılan dört farklı besiyeri arasından azot kaynağı olarak %5 soya unu, karbon kaynağı olarak %5 glukoz ve eser elementler olarak %0,3 KH_2PO_4 , %0,1 K_2HPO_4 ve %0,4 MgSO_4 içeren M4 besiyeri spor-kristal üretimi için en uygun besiyeri olarak belirlendi.

Fermentasyon sonucu elde edilen spor-kristal karışımı laboratuvar koşullarında zararlı böcekler üzerinde etkili olurken, arazi koşullarında etkinliği önemli ölçüde düşebilmektedir. Çünkü, çevre koşulları (güneş ışınları, ultraviyole ışınlar, yağmur ve rüzgar) *B.thuringiensis*'in insektisidal aktivitesini önemli derece etkiler (Ignoffo 1992). Bu nedenlerle *B. thuringiensis*'in spor ve kristallerini çevre koşullarından korumak amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Tamez-Guerra vd. 1996, 2000). Püskürterek kurutma yöntemi ile enkapsülasyon, en çok kullanılan ve en ekonomik yöntemdir. Spor ve kristalleri fotodegradasyondan korur ve stabilitesini artırır.

Enkapsülasyonda kaplama materyali olarak karbonhidrat polimerleri, proteinler ve yağlar kullanılır. Kolay kullanılabilirliği, düşük maliyeti, düşük toksisitesi ve düşük viskozitesinden dolayı genellikle doğal polimerler olan nişasta, jelatin, selüloz, sodyum alginat, maltodekstrin, lignin, soya unu vb. polimerler kullanılır (Côté vd., 2001; Cocero vd., 2009; Amoura vd., 2009). Tamez-Guerra vd. (1996) *B. thuringiensis kurstaki* spor ve kristallerinin kapsülasyonunda jelatinize mısır nişastasası, jelatinize mısır unu, ksantan gam ve lignin kullanmış ve bunlardan lignin ve jelatinize mısır ununun spor ve kristallerin aktivitesini koruduğunu belirtmiştir. Ramírez-Suero vd. (2005) ise nikstamalize mısır nişastasası, mısır nişastasası ve maktodekstrin arasından nikstamalize mısır nişastasını *B. thuringiensis israilensis*'in enkapsülasyonunda kullandığında formulasyonun biyolojik aktivitesinin yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Çalışmamızda ise *B. thuringiensis* Se13 suşunun enkapsülasyonunda kaplama materyali olarak en uygun polimer maltodekstrin olarak belirlendi.

Püskürterek kurutma yönteminde kaplama materyalinin yanı sıra kullanılan sprej kurutucunun giriş ve çıkış sıcaklıklarının elde edilen ürünün spor sayısını etkilediği bilinmektedir. Sprej kurutucunun giriş sıcaklığı 180-215°C, çıkış sıcaklığı ise 70-80°C arasında olmalıdır. Giriş sıcaklığı 250°C, çıkış sıcaklığı 97°C'ye ayarlandığında elde edilen ürünün spor sayısının önemli ölçüde düştüğü görülmüştür (Xueyong vd., 2008). Teera-Arunsiri vd. (2003) tarafından *B. thuringiensis aizawai*'nin enkapsülasyonu gerçekleştirilerek farklı çıkış sıcaklıklarının etkisi araştırılmış ve 60-85°C arasında elde

edilen ürünlerin spor sayısında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir. Ancak, çıkış sıcaklığının 85°C'nin üzerine çıkmasının canlı spor sayısını düşürdüğü görülmüştür. *B. thuringiensis* Se13'ün enkapsülasyonunda optimum spor sayısı için için sprej kurutucunun giriş sıcaklığı 70°C, çıkış sıcaklığı ise 160°C olarak belirlendi. *B. thuringiensis* Se13 ile optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon çalışmasından sonra spor sayısı $1,42 \times 10^{12}$ cfu/g olarak belirlenmişken, sprej kurutma sonrası yaklaşık 2 kat azalmayla spor sayısının $8,1 \times 10^{11}$ cfu/g'ye düştüğü görüldü. Bu düşüşe rağmen entomotoksisitede istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Ayrıca Lisansky vd. (1993) tarafından *B. thuringiensis* içerikli bir üründe en az 1×10^{10} cfu/g canlı spor olması gerektiği belirtilmiştir.

Püskürterek kurutma yönteminde sprej kurutucunun giriş ve çıkış sıcaklıklarının spor sayısını etkilediği gibi elde edilen ürünün nem içeriğini de etkilediği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda çıkış sıcaklığından çok giriş sıcaklığının nem içeriğini etkilediği belirlenmiştir. *B. thuringiensis* içerikli toz formülasyonların nem içeriğinin %5-8 arasında olmasının ürünün raf ömrünü uzattığı, %5'in altına düştüğünde ise insektisidal aktivitenin önemli ölçüde düştüğü görülmüştür (Couch 2000). Çalışmamızda elde edilen ürünün nem içeriği %7,2 olarak belirlendi.

B. thuringiensis içerikli toz formülasyonlar için ıslanabilirlik <30 s, süspansibilite >%60, ortalama partikül büyüklüğü <100 µm olmalıdır (Lisansky vd., 1993). Eski vd. (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *B. thuringiensis tenebrionis*'in nişasta ile enkapsülasyonu sonucu elde edilen ürünün ıslanma süresi 21 saniye, süspansen olma yüzdesi ise %86 olarak belirlenmiştir. *B. thuringiensis* Se13'ün maltodekstrin ile enkapsülasyonu sonucu elde edilen ürün için ıslanma süresi 25,22 saniye, süspansen olma yüzdesi %77,66, ortalama partikül boyutu ise 13.462 µm olarak belirlendi.

Katı veya sıvı formülasyonu hazırlanan ürünün ruhsatlandırılabilmesi için ekotoksikoloji testlerinin gerçekleştirilmesi gerekir. Bugüne kadar balıklar, amfibiler, kuşlar, fareler, sıçanlar ve tavşanlar üzerinde *B. thuringiensis*'in enfektivitesi ve patojenitesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

B. thuringiensis'in farklı suşları farklı böcek takımları üzerinde toksik etki gösterirken, hedef dışı organizmalar üzerindeki etkisi çok azdır ya da yoktur. *B. thuringiensis*'in memeliler üzerindeki etkisi ilk kez Fisher ve Rosner (1959) tarafından gönüllü insanlar üzerinde araştırılmıştır. Yapılan çalışmada, 1000 mg thuricide (*B. thuringiensis thuringiensis*) 5 gün boyunca 18 insana verilmiş ve sonunda denekler fiziki ve klinik incelemeye tabi tutulmuş, çalışmaya katılan insanlarda herhangi bir anormallik

gözlemlenmemiştir. Ignoffo (1973) tarafından sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada ise 10^9 *B. thuringiensis* sporu içeren besinle 730 gün boyunca beslenen sıçanlarda herhangi bir olumsuz etki tespit edilmemiştir. de Barjac vd. (1980) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise 20 diş fareye $8,5 \times 10^7$ cfu/ml *B. thuringiensis israelensis* kültürü subkutan inokülasyon yoluyla verilmiş ve farelerde enfeksiyon belirtisi veya ölüm gözlemlenmemiştir.

B. thuringiensis Se13 izolatının toksikoloji/patojenite testleri sonucunda yapılan örneklemelemlerde, bakterinin varlığına rastlanmasına rağmen literatürdeki çalışmalara benzer bir şekilde sıçanlar üzerinde toksisite ve patojenitesinin olmadığı görülmüştür. Konuyla ilgili çalışmaların birçoğunda uygulama sonrası yapılan örneklemelemlerde *B. thuringiensis* varlığına rastlanmış ancak olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Tsai vd. (1997) tarafından sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada intratrakeal uygulamadan 21 gün sonra akciğer örneklerinde bakteri varlığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde inhalasyon ile *B. thuringiensis*'e maruz kalan farelerin akciğer örneklerinde 2,5 gün sonra bakteriye rastlanmıştır (Siegel vd., 1987). Ayrıca *B. thuringiensis kurstaki* farelere intraperitoneal enjeksiyonla uygulanmış, 37 gün sonra dalaklarından tekrar izole edilmiştir (Siegel, 2001).

B. thuringiensis'ler tarafından üretilen insektisidal kristal proteinler, yüksek dozda oral yolla memelilere verilse dahi toksik etki göstermediği, mide sıvısı tarafından hızlıca degrade edildiği belirlenmiştir. Ayrıca Cry proteinlerinin böcek bağırsak hücrelerindeki spesifik reseptörlere bağlandığı bilinmektedir. İmmüno kimyasal analizler sonucunda Cry proteinlerinin bağlandığı spesifik reseptörlerin memelilerde bulunmadığı belirlenmiştir (Noteborn et al., 1993).

B. thuringiensis sporlarının farelerde ölüme neden olduğuna dair ilk çalışma Hernandez vd. (1998) tarafından gerçekleştirilmiştir. *B. thuringiensis konkukian*, *kurstaki*, *israelensis* ve *thompsoni* suşları 10^8 spor konsantrasyonda intranasal yolla farelere verildiğinde, sırasıyla %100, %80, %40 ve %0 ölüm meydana getirmiştir. Farelerde kullanılan 10^8 spor konsantrasyonunun insanlarda eşdeğeri 10^{11} spordur ve bu konsantrasyonda bir bulaşmanın imkansız olduğu düşünülmektedir (Rubio-Infante ve Moreno-Fierros, 2016).

Lemos vd. (2013) tarafından *B. thuringiensis aizawai* içerikli ticari biyopestisit (XenTari) gebe albino sıçanlara oral yolla uygulanmış ve karaciğer, böbrek ve akciğer dokularında lezyonlara rastlanmıştır. Buna rağmen bireylerde herhangi bir zehirlenme belirtisi görülmemiştir. Aynı zamanda doğan yavru bireylerde de herhangi bir sakatlık veya kusur tespit edilmemiştir. Ticari ürünlerde dispersant, yüzey aktif madde ve adjuvant olarak

kullanılan maddelerin toksik olabileceği ve sekonder enfeksiyona yol açabileceđi belirtilmiştir (Mesnage vd., 2013).

Bu çalışmada, tarama testlerinde zararlı üzerinde oldukça etkili olduğu tespit edilen Se13 izolatının *B. thuringiensis* olduğu tespit edilerek izolatın fermentasyon koşulları maksimum spor-kristal üretimi için optimize edildi ve püskürterek kurutma yöntemiyle enkapsülasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ürünün memeliler üzerinde gerçekleştirilen toksisite/patojenite çalışmalarında sıçanlar üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi.

Sonuç olarak, pamuk, mısır, yer fıstığı, şeker pancarı, ayçiçeği ve tütün gibi birçok bitkide önemli ekonomik kayıplara neden olan çizgili yaprakkurdu ile mücadelede kullanılabilecek ülkemize ait evre dostu ve güvenilir bir mikrobiyal mücadele preparatı geliştirilmesi yolunda yeni adımlar atılmış oldu.

5. SONUÇLAR

Çalışma sonucunda *S. exigua*'dan 15 bakteriyel izolat elde edildi. İzolatlar fenotipik ve genotipik özelliklerine göre tanımlandı. İzolatların zararlı üzerindeki insektisidal etkileri belirlenerek en etkili izolattan biyopestisit üretimi gerçekleştirildi.

- 1- Elde edilen 15 bakteriyel izolatın fenotipik ve genotipik özelliklerine göre karakterizasyonları yapıldı. Böylece *S. exigua*'nın kültürü edilebilir bakteriyel florası; *Bacillus cereus* (Se1), *Lysinibacillus macroides* (Se2), *Paenibacillus geniculata* (Se3), *Paenibacillus tylopili* (Se4), *Staphylococcus succinus* (Se5), *Acinetobacter soli* (Se6), *Chryseobacterium indologenes* (Se7), *Bacillus toyonensis* (Se8), *Serratia marcescens* (Se9), *Paenibacillus amylolyticus* (Se10), *Paenibacillus xylanexedens* (Se11), *Enterobacter ludwigi* (Se12), *Bacillus thuringiensis* (Se13), *Bacillus thuringiensis* (Se14) ve *Lysinibacillus sphaericus* (Se15) olarak belirlendi.
- 2- Flora üyelerinin *S. exigua* üzerindeki tarama testleri sonucunda en etkili izolatlar sırasıyla *B. thuringiensis* Se13 (%100), *B. thuringiensis* Se14 (%83,33) ve *S. marcescens* Se9 (%73,33) olarak belirlendi.
- 3- En etkili izolat olan *B. thuringiensis* Se13, biyotestler gerçekleştirildikten 48 saat sonra zararlı üzerinde %75 ölüm meydana getirdi. Uygulamadan 7 gün sonra ise ölüm oranı %100'e ulaştı.
- 4- *Bacillus thuringiensis* Se13 izolatı ile 10^9 cfu/ml konsantrasyonda gerçekleştirilen biyotestte medyan ölüm zamanı 1,59 gün olarak belirlendi. Bu izolat ile gerçekleştirilen doz denemeleri sonucunda izolatın medyan lethal konsantrasyonu ise 7.4×10^4 cfu/ml olarak belirlendi.
- 5- *B. thuringiensis* Se13 izolatının ışık ve elektron mikroskopisi ile insektisidal kristal proteinleri içerdiği, PCR ile yapılan çalışmalarda ise bunların *cry1* ve *cry2* genleri oldukları belirlendi.
- 6- *B. thuringiensis* Se13 izolatının maksimum spor-kristal üretimi için fermentasyon koşulları Taguchi metodu ile belirlendi. Buna göre inkübasyon süresi 72 saat, inkübasyon sıcaklığı 30°C, besiyerinin başlangıç pH'sı 9 ve M4 besiyeri optimum koşullar olarak belirlendi.

- 7- M4 besiyeri içeriğinin Taguchi metodu ile optimizasyonu sonucu %5 soya unu, %5 glukoz, %0,3 KH₂PO₄, %0,1 K₂HPO₄ ve %0,4 MgSO₄ içeren besiyeri optimum koşullar olarak belirlendi.
- 8- Optimum koşullar kullanılarak fermentörde spor-kristal üretimi gerçekleştirildi ve canlı spor sayısı 1.42×10^{12} cfu/g olarak belirlendi.
- 9- Fermentasyon sonucu elde edilen spor-kristal karışımının enkapsülasyonu püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Enkapsülasyon işlemi Taguchi metodu ile optimize edildi ve kaplama materyali olarak maltodekstrin, sprey kurutucunun giriş ve çıkış sıcaklığı olarak 160°C ve 70°C optimum koşullar olarak belirlendi.
- 10- Üretilen toz formülasyonun ıslanma süresi 25.22 ± 1.75 saniye, süspanse olma yüzdesi %77.66, nem içeriği $\%7.29 \pm 0.16$, ortalama partikül boyutunun ise 13.462 µm olarak belirlendi.
- 11- Formülasyon laboratuvar koşullarında, 10^9 cfu/ml konsantrasyonda zararlı üzerinde %100 mortalite gösterirken, medyan letal zamanı 0,8 gün olarak belirlendi. Medyan letal konsantrasyonu ise $1,6 \times 10^4$ cfu/ml olarak belirlendi.
- 12-Saksı denemelerinde 1 g/l konsantrasyonda uygulanan ürün zararlı üzerinde %93 ölüm meydana getirirken, medyan letal zamanı ise 2,53 gün olarak belirlendi.
- 13-Enkapsüle *B. thuringiensis* Se13'ün medyan letal konsantrasyonu (LC₅₀) *H. cunea* larvaları için $1,12 \times 10^6$ cfu/ml, *M. neustria* larvaları için $6,71 \times 10^5$ cfu/ml olarak belirlendi.
- 14-Sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen patojenite/toksisite çalışmaları ile ürünün memeliler üzerinde olumsuz herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, böcek orjinli *B. thuringiensis* Se13 suşu kullanılarak *S. exigua* ile mücadelede kullanılacak çevre dostu ve güvenilir bir bakteriyel biyopestisit geliştirilmiş oldu. Çalışmadan elde edilen sonuçlar neticesinde gelecek çalışmalara yönelik olarak aşağıdaki hususlar belirlenmiştir.

1. Formülasyon arazi koşullarında *S. exigua* üzerinde test edilecektir.
2. *S. exigua* ile aynı ortamı paylaşan diğer zararlılar üzerinde test edilecektir.
3. *S. exigua*'nın doğal düşmanları üzerindeki etkinliği belirlenecektir.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18, 265–267.
- Adang, M.J., Crickmore, N. ve Jurat-Fuentes, J.L., 1991. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. In: Dhadialla, T.S. ve Gill, S. (edt), *Advances in insect physiology*. Academic Press, 39–87.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A. ve Fujiwara, T., 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, 1117–1125.
- Alavanja, M.C.R., Hoppin, J.A. ve Kamel, F., 2004. Health effects of chronic pesticide exposure: Cancer and neurotoxicity. Annual Review of Public Health, 25, 155–197.
- Amoura, M., Brayner, R., Perullini, M., Sicard, C., Roux, C., Livage, J. ve Coradin, T. 2009. Bacteria encapsulation in a magnetic sol–gel matrix. Journal of Materials Chemistry, 19, 1241.
- Andrews, R.E., Faust, R.M., Wabiko, H., Raymond, K.C. ve Bulla L.A., 1987. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. Critical Reviews in Biotechnology, 6, 163–232.
- Assadpour, E. ve Jafari, S.M., 2016. Spray drying of folic acid within nano-emulsions: Optimization by Taguchi approach. Drying Technology, 35, 1152-1160.
- Bahar, A.A. ve Demirbağ, Z., 2007. Isolation of pathogenic bacteria from *Oberea linearis* (Coleoptera: Cerambycidae). Biologia Bratislava, 62, 13–18.
- Baida, G.E. ve Kuzmin, N.P., 1995. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. Biochimica et Biophysica Acta, 1264, 2, 151–154.
- Banerjee-Bhatnagar, N., 1999. Inorganic phosphate regulates CryIVA protoxin expression in *Bacillus thuringiensis israelensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 262, 359–364.
- Beegle, C., Rose, R. ve Ziniu, Y., 1991. Mass production of *Bacillus thuringiensis* and *B. sphaericus* for microbial control of insect pests. In: Maramorosch, K. (edt), *Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors*. CRC Press, Boca Raton, 195–216.
- Ben-Dov, E., Boussiba, S. ve Zaritsky, A., 1995. Mosquito larvicidal activity of *Escherichia coli* with combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Journal of Bacteriology, 177, 2851–2857.

- Berliner, E., 1911. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe. Zeitschrift für Gesamte Getreidewesen, 3, 63–70.
- Berliner, E., 1915. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* sp. Zeitschrift für Angew Entomol 2, 29–56.
- Bhowmik, A., Mourin, M., Shishir, A., Khan, S.N. ve Hoq, M.M., 2015. Development of a cost effective medium for enhanced production of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin. Bangladesh Journal Microbiology, 32, 1–6.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248–254.
- Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D. ve Valéro, J.R., 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Process Biochemistry, 41, 323–342.
- Bravo, A., 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. Journal of Bacteriology, 179, 2793–2801.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S. ve Soberon, M., 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochimica et Biophysica Acta, 1667, 38–46.
- Bravo, A., Soberón, M. ve Gill, S.S., 2005. *Bacillus thuringiensis*: Mechanisms and Use. In: Gilbert, L.I., ve Gill, S.S. (edt), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Academic Press, London, 247-277.
- Burch, G.J., Ferguson, C.H.R., Cartwright, G. ve Kwong, F.Y.P., 1995. Application of Taguchi experimental design to the optimisation of a baculovirus expression system. Biochemical Society Transactions, 23, 1, 107.
- Burešová, V., Franta, Z. ve Kopáček, P., 2006. A comparison of *Chryseobacterium indologenes* pathogenicity to the soft tick *Ornithodoros moubata* and hard tick *Ixodes ricinus*. Journal of Invertebrate Pathology, 93, 96–104.
- Caetano-Anollés, G., Schlarbaum, S.E. ve Trigiano, R.N., 1999. DNA amplification fingerprinting and marker screening for pseudo-testcross mapping of flowering dogwood (*Cornus florida* L.). Euphytica, 106, 209–222.
- Cappuccino, J.G. ve Sherman, N., 2011. *Microbiology: A laboratory manual*, ten edition. Benjamin-Cummings Pub Co, New York.
- Cardoza, Y.J., Vasanthakumar, A., Suazo, A. ve Raffa, K.F., 2009. Survey and phylogenetic analysis of culturable microbes in the oral secretions of three bark beetle species. Entomologia Experimentalis et Applicata, 131, 138–147.

- Chandel, K., Mendki, M.J., Parikh, R.Y., Kulkarni, G., Tikar, S.N., Sukumaran, D., Prakash, S., Parashar, B.D., Shouche, Y.S. ve Veer, V., 2013. Midgut microbial community of *Culex quinquefasciatus* mosquito populations from India. PLoS One, 8, 11, e80453.
- Chenthamarakshan, A., Parambayil, N., Miziriya, N., Soumya, P.S., Kiran-Lakshami, M.S., Ramgopal, A., Dileep, A. ve Nambisan, P., 2017. Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of design of experiments. BMC Biotechnology, 17, 12.
- Claus, D., 1992. A standardized Gram staining procedure. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 8, 451–452.
- Cobb, B.D. ve Clarkson, J.M., 1994. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. Nucleic Acids Research 22, 3801–3805.
- Cocero, M.J., Martín, Á., Mattea, F. ve Varona, S., 2009. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. The Journal of Supercritical Fluids, 47, 546–555.
- Coorevits, A., Dinsdale, A.E., Heyrman, J., Schumann, P., Van Landschoot, A., Logan, N.A. ve De Vos, P., 2012. *Lysinibacillus macroides* sp. nov., nom. rev. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62, 1121-1127.
- Côté, J., Vincent, C., Son, K. ve Bok, H., 2001. Persistence of insecticidal activity of novel bioencapsulated formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). Phytoprotection, 82, 73–82.
- Couch, T. ve Jurat-Fuentes, J., 2014. Commercial production of entomopathogenic bacteria. In: Morales-Ramos, J., Guadalupe, R. ve Shapiro-Ilan, D. (eds), *Mass Production of Beneficial Organisms*. Academic Press, San Diego, 415–435.
- Couch, T.L., 2000. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*. Springer Netherlands, Dordrecht, 297–316.
- Çakici, F.Ö, Sevim, A., Demirbağ, Z. ve Demir, İ., 2014. Investigating internal bacteria of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and some *Bacillus* strains as biocontrol agents. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38, 99–110.
- Damgaard, P.H., 1995. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 12, 245–249.
- Damgaard, P.H., Jacobsen, C.S. ve Sørensen, J., 1996. Development and application of a primer set for specific detection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil using magnetic capture hybridization and PCR amplification. Systematic and Applied Microbiology, 19, 436–441.

- Danişmazoğlu, M., Demir, İ., Sezen, K., Muratoğlu, H. ve Nalçacıoğlu, R., 2015. Cloning and expression of chitinase A, B, and C (*chiA*, *chiB*, *chiC*) genes from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities. Turkish Journal of Biology, 39, 78–87
- Danismazoglu, M., Demir, İ., Sevim, A., Demirbag, Z. ve Nalcacioglu, R., 2012. An investigation on the bacterial flora of *Agriotes lineatus* (Coleoptera: Elateridae) and pathogenicity of the flora members. Crop Protection, 40, 1–7.
- de Barjac, H., Larget, I. ve Benichou, L., Cosmao, V., Viviani, G., Ripouteau, H. ve Papion, S., 1980. Test d'innocuité sur mammifères avec du sérotype H 14 de *Bacillus thuringiensis*. Geneva, World Health Organization (WHO/VBC/80.761).
- De Maagd, R.A., Bravo, A. ve Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genetics, 17, 193–199.
- Devi, P.S.V., Ravinder, T. ve Jaidev, C., 2005. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. Journal of Invertebrate Pathology, 88, 163–168.
- Devidas, P.C., Pandit, B.H. ve Vitthalrao, P.S., 2014. Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*. The Scientific World Journal, 2014, 273030.
- Dulmage, H.T., 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. Journal of Invertebrate Pathology, 15, 232–239.
- Dulmage, H.T. ve de Barjac, H., 1973. HD-187 A new isolate of *Bacillus thuringiensis* that produces high yield of delta-endotoxin. Journal of Invertebrate Pathology, 22, 273–277
- Dulmage, T., Yousten, A., Singer, S. ve Lacey, L., 1990. Guildelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. UNDP/World Bank/WHO
- El-Bendary, M.A., Moharam, M.E., Mohamed, S.S. ve Hamed, S.R., 2016. Pilot-scale production of mosquitocidal toxins by *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* under solid-state fermentation. Biocontrol Science and Technology, 26, 980–994.
- Emami, J., Mohiti, H., Hamishehkar, H. ve Varshosaz, J., 2015. Formulation and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for pulmonary delivery of budesonide using Taguchi and Box-Behnken design. Research in Pharmaceutical Sciences, 10, 17–33.
- Ennouri, K., Ben Khedher, S., Jaoua, S. ve Zouari, N., 2013. Correlation between delta-endotoxin and proteolytic activities produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* growing in an economic production medium. Biocontrol Science and Technology, 23, 756–767.

- Eski, A., Demir, İ., Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2017. A new biopesticide from a local *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Xd3) against alder leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33, 95.
- Eski, A., Özkan Çakıcı, F., Güllü, M., Muratoğlu, H., Demirbağ, Z. ve Demir, İ., 2015. Identification and pathogenicity of bacteria in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae). Turkish Journal of Biology, 39, 31–48.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M., Nye, G.J., Craig, J.A. ve Koziel M.G., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, 93, 5389–5394.
- Farkaš, J., Šebesta, K., Horská, K., Samek, Z., Dolejš, L. ve Sorm, F., 1977. Structure of thuringiensin, the thermostable exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 42, 909–929.
- Farrera, R.R., Pérez-Guevara, F. ve de la Torre, M., 1998. Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. Applied Microbiology and Biotechnology 49, 758–765.
- Finney, D.J., 1971. Probit Analysis, Third Edit. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, London
- Fisher, R. ve Rosner, L., 1959. Insecticide safety, toxicology of the microbial insecticide, thuricide. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 7, 686–688.
- Flint, M.L., van den Bosch, R., 1981. Introduction to Integrated Pest Management. In: van den Bosch, R. (ed) Introduction to Integrated Pest Management, 1st ed., Springer, US.
- Gilmore, M.S., Cruz-Rodz, A.L., Leimeister-Wächter, M., Kreft, J. ve Goebel, W., 1989. A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. Journal of Bacteriology, 171, 744–753.
- Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A. ve Yuan, Z.C., 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review introduction to *Paenibacillus*. Microbial Cell Factories, 15, 203.
- Güler, Ç. ve Çobanoğlu, Z., 1997. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi, Pestisitler. İlköz Matbaası, Ankara, 14.
- Hernández-Martínez, P., Ferré, J. ve Escriche, B., 2008. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology, 97, 245–250.

- Hernandez, E., Ramisse, F., Ducoureau, J.P., Cruel, T. ve Cavallo J.D., 1998. *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (Serotype H34) superinfection: Case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. Journal of Clinical Microbiology, 36, 2138–2139.
- Hotha, S. ve Banik, R.M., 1997. Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H 14 in aqueous two-phase systems. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 69, 5–10.
- İçgen, Y., İçgen, B. ve Özcengiz, G., 2002a. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. Research in Microbiology, 153, 605–609.
- İçgen, Y., İçgen, B. ve Özcengiz, G., 2002b. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. Research in Microbiology, 153, 599–604.
- Ignoffo, C.M., 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Florida Entomologist, 75, 516–525.
- Ignoffo, C.M., 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates. Annals of the New York Academy of Sciences, 217, 141–172.
- Ishiwata, S., 1901. On a kind of severe flacherine (sotto disease). Dainihon Sanshi Kaiho 114, 1–5.
- Jeney, C., Dobay, O., Lengyel, A., Adam, E. ve Nasz, I., 1999. Taguchi optimisation of ELISA procedures. Journal of Immunological Methods, 223, 137–146.
- Kallel, H., Zaïri, H., Rourou, S., Essafi, M, Barbouche, R., Dellagi, K. ve Fathallah, D.M., 2002. Use of Taguchi's methods as a basis to optimize hybridoma cell line growth and antibody production in a spinner flask. Cytotechnology, 39, 9–14.
- Kesmen, Z., Yetiman, A.E., Gulluce, A., Kacmaz, N., Sagdıç, O., Cetin, B., Adiguzel, A., Sahin, F. ve Yetim, H., 2012. Combination of culture-dependent and culture-independent molecular methods for the determination of lactic microbiota in sucuk. International Journal of Food Microbiology, 153, 428–435.
- Khoudoli, G.A., Porter, I.M., Blow, J.J. ve Swedlow, J.R., 2004. Optimisation of the two-dimensional gel electrophoresis protocol using the Taguchi approach. Proteome Science, 2, 6.
- Kim, H.S., Noh, S. ve Park, Y., 2017. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Ca toxicity against *Spodoptera exigua* (Hübner) by suppression of a *chitin synthase B* gene in midgut. Journal of Asia-Pacific Entomology, 20, 199–205.
- Knowles, A., 2005. New developments in crop protection product formulation. Agrow Reports UK: T and F Informa UK Ltd., 153-156.

- Kornoşor, S. ve Oyartı, L., 1989. Mısırdaki zararlı çizgili yaprakkurdu *Spodoptera exigua* Hbn.(Lepidoptera, Noctuidae) larvalarına karşı *Bacillus thuringiensis* Berliner'in etkinliğinin saptanması. Türk Entomoloji Dergisi, 13, 91–101.
- Kurt, A., Özkan, M. ve Özcengiz, G., 2005. Inorganic phosphate has a crucial effect on Cry3Aa δ -endotoxin production. Letters in Applied Microbiology, 41, 303–308.
- Lacey, L.A., 1984. Production and formulation of *Bacillus sphaericus*. Mosquito news, 44, 153–159.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
- Lemos, A.J., Siqueira, H.A., Wanderley-Teixeira, V., Maia, F.C., Texeira, A.A., Silva, E.J. ve Oliveira, J.V., 2013. Effect of sub-lethal doses of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and deltamethrin with regard to fertility and organ toxicity in pregnant albino rats. Experimental and Toxicologic Pathology, 65, 489–495.
- Li, J.D., Carroll, J. ve Ellar, D.J., 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature, 353, 815–821.
- Lisansky, S.G., Quinlan, R. ve Tassoni, G., 1993. The *Bacillus thuringiensis* production handbook: Laboratory methods, manufacturing, quality control, registration. CPL Press.
- Mancebo, A., Molier, T., González, B, Lugo, S., Riera, L., Arteaga, M.A., Bada, A.M., Gonzales, Y., Pupo, M., Hernandez, Y., Gonzales, C., Rojas, N.M. ve Rodriguez, G., 2011. Acute oral, pulmonary and intravenous toxicity/pathogenicity testing of a new formulation of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* SH-14 in rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 59, 184–190.
- Manguin, S., Ngo, C.T., Tainchum, K., Juntarajumnong, W., Chareonviriyaphap, T., Michon, A.N. ve Jumas-Bilak, E., 2013. Bacterial biodiversity in midguts of *Anopheles* mosquitoes, malaria vectors in Southeast Asia. In: Manguin, S. (ed) *Anopheles* mosquitoes-New insights into malaria vectors. InTech, 549–576.
- Mesnage, R., Bernay, B. ve Seralini, G.E., 2013. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. Toxicology, 313, 122–128.
- Montiel, M.D., Tyagi, R.D. ve Valero, J.R., 2001. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Water Research, 35, 3807–3816.
- Naimov, S., Nedyalkova, R., Staykov, N., Weeman-Hendriks, M., Minkov, I. ve de Maagd, R.A., 2014. A novel Cry9Aa with increased toxicity for *Spodoptera exigua* (Hübner). Journal of Invertebrate Pathology, 115, 99–101.

- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P. ve Hens, L., 2016. Chemical pesticides and human health: The urgent need for a new concept in agriculture. Frontiers in Public Health, 4, 148.
- Noteborn, H.P.J., Rienenmann-Ploum, M.E., van den Berg, J.H.J., Alink, G., Zolla, L. ve Kuiper, H.A., 1993. Food safety of transgenic tomatoes expressing the insecticidal crystal protein Cry1Ab from *Bacillus thuringiensis* and the marker enzyme APH(3') II. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 58/4b.
- Nováková, D., Sedláček, I., Pantůček, R., Stetina, V., Svec, P. ve Petras, P., 2006. *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens, Journal of Medical Microbiology, 55, 523–528.
- Öncüer, C., 2000. Tarımsal zararlılarla savaş yöntemleri ve ilaçları. Adnan Menderes Üniversitesi Yayın ve Basımevi, Aydın.
- Özkan, M., Dilek, F.B., Yetis, Ü. ve Özcengiz, G., 2003. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. Research in Microbiology, 154, 49–53.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Morillo, J. ve Cabellero, P., 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. Toxins, 6, 3296–3325.
- Phi, Q.T., Park, Y.M., Seul, K.J., Ryu, C.M., Park, S.H., Kim, J.G. ve Ghim, S.Y., 2010. Assessment of root-associated *Paenibacillus polymyxa* groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper. Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 1605–1613.
- Pearson, D. ve Ward, O.P., 1988. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. Biotechnology Letters, 10, 451–456.
- Place, R.B., Hiestand, D., Burri, S. ve Teuber, M., 2002. *Staphylococcus succinus* subsp. *casei* subsp. nov., a dominant isolate from a surface ripened cheese. Systematic and Applied Microbiology, 25, 353–359.
- Poopathi, S. ve Abidha, S., 2009. A medium for the production of biopesticides (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) in mosquito control. Journal of Economic Entomology, 102, 1423–1430
- Qiu, L., Zhang, B., Liu, L., Ma, W., Wang, X., Lei, C. ve Chen, L., 2016. Proteomic analysis of Cry2Aa-binding proteins and their receptor function in *Spodoptera exigua*. Scientific Reports, 7, 40222.
- Ragvendran, C. ve Natarajan, D., 2017. *Serratia marcescens* (Enterobacteriaceae): An alternate biocontrol agent for mosquito vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). PTB Reports, 3, 14–20.

- Ramírez-Suero, M., Robles-Olvera, V. ve Ramírez-Lepe, M., 2005. Spray-dried *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* formulations for control of *Aedes aegypti* larvae. Journal of Economic Entomology, 98, 1494–1498.
- Reynolds, J., Moyes, R. ve Breakwell, D.P., 2009. Differential staining of bacteria: endospore stain. Current Protocols in Microbiology, Appendix 3.
- Rubio-Infante, N. ve Moreno-Fierros, L., 2016. An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals. Journal of Applied Toxicology, 36, 630–648.
- Sampson, M.N. ve Gooday, G.W., 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. Microbiology, 144, 2189–2194.
- Saydi, D. ve Hatamipour, M.S., 2012. Analysis of the effective parameters on potato powder quality produced by a spray dryer. Iranian Journal of Chemical Engineering, 9, 55–62.
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2007. Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from common cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 35, 79–85.
- Sezen, K. ve Demirbag, Z., 1999. Isolation and insecticidal activity of some bacteria from the hazelnut beetle (*Balaninus nucum* L. [Curculionidae]). Applied Entomology Zoology, 34, 85–89.
- Sezen, K., Kati, H., Nalcacioğlu, R., Muratoglu, H. ve Demirbağ, Z., 2008. Identification and pathogenicity of bacteria from European shot-hole borer, *Xyleborus dispar* Fabricius (Coleoptera: Scolytidae). Annals of Microbiology, 58, 173–179.
- Sharma, A., Thakur, D.R., Kanwar, S. ve Chandla, V.K., 2013. Diversity of entomopathogenic bacteria associated with the white grub, *Brahmina coriacea*. Journal of Pest Science, 86, 261–273.
- Siegel, J.P., 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. Journal of Invertebrate Pathology, 77, 13–21.
- Siegel, J.P., Shaddock, J.A. ve Szabo, J., 1987. Safety of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for mammals. Journal of Economic Entomology, 80, 717–23.
- Smits, P.H., Velden, M.C., Vrie, M. ve Vlak, J.M., 1987. Feeding and dispersion of *Spodoptera exigua* larvae and its relevance for control with a nuclear polyhedrosis virus. Entomologia Experimentalis et Applicata, 43, 67–72.
- Snyman, M., Gupta, A.K., Bezuidenhout, C.C., Claassens, S., van den Berg, J., 2016. Gut microbiota of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32, 115.

- Sudharsan, N.M. ve Ng, E.Y., 2000. Parametric optimization for tumour identification: bioheat equation using ANOVA and the Taguchi method. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, 214, 505–512.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M.R., Behle, R.W., Shasha, B.S. ve Wong, L.J., 2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology, 93, 219–225.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M.R., Medrano-Roldan, H., Galan-Wong, L.J., Shasha, B.S. ve Vega, F.E., 1996. Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology, 89, 1424–1430.
- Tanfous, N.G.B., Kallel, H., Jarboui, M.A. ve Fathallah, D.M., 2006. Expression in *Pichia pastoris* of a recombinant scFv form of MAAb 107, an anti human CD11b integrin antibody. Enzyme and Microbial Technology, 38, 636–642.
- Teera-Arunsiri, A., Suphantharika, M. ve Ketunuti, U., 2003. Preparation of spray-dried wetttable powder formulations of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. Journal of Economic Entomology, 96, 292–299.
- Tokcaer, Z., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü., Özcengiz, G. ve Alaaddinoğlu, N.G., 2006. Response surface optimization of anti-dipteran delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD 500. Process Biochemistry, 41, 350–355.
- Trabelsi, K., Rourou, S., Loukil, H., Majoul, S. ve Kallel, H., 2006. Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor. Journal of Biotechnology, 121, 261–271.
- Tranchida, M.C., Riccillo, P.M., Micieli, M.V., Garcia, J.J. ve Rodriguez, M.S., 2011. Isolation, characterization and evaluation of mosquitocidal activity of *Lysinibacillus* strains obtained from *Culex pipiens* larvae. Annals of Microbiology, 61:575–584.
- Tsai, S., Wang, L. ve Wang, S., 1997. Clearance and effects of intratracheal instillation to spores of *Bacillus thuringiensis* or *Metarhizium anisopliae* in rats. Chinese Journal of Veterinary Science, 23, 515–522.
- T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2011. Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı, Mısır Entegre Mücadele Teknik Talimatı, Ankara, 113.
- URL-1, http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001
- URL-2, <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>
- URL-3, <https://bku.tarim.gov.tr/BKURuhsat/Index>
- Von Der Weid, I., Artursson, V., Seldin, L. ve Jansson, J.K., 2005. Antifungal and root surface colonization properties of GFP-tagged *Paenibacillus brasilensis* PB177. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21, 1591–1597.

- Wakisaka, Y., Masaki, E. ve Nishimoto, Y., 1982. Formation of crystalline delta-endotoxin or poly-beta-hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology, 43, 1473–1480.
- Wei, Y.H., Lai, C.C. ve Chang, J.S., 2007. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Process Biochemistry, 42, 40–45.
- Xia-Ling, Z., Cong, X.P., Wang, X.P. ve Lei, C.L., 2011. A review of geographic distribution, overwintering and migration in *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of the Entomological Research Society, 13, 39–48.
- Xue, J.L., Cai, Q.X., Zheng, D.S. ve Yuan, Z.M., 2005. The synergistic activity between Cry1Aa and Cry1c from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. Letters in Applied Microbiology, 40, 460–465.
- Xueyong, Z., Jianping, D., Jianbao, G. ve Ziniu, Y., 2008. Activity-loss characteristics of spores of *Bacillus thuringiensis* during spray drying. Food and Bioproducts Processing 86, 37–42.
- Yadav, K.K., Bora, A., Datta, S., Chandel, K., Gogoi, H.K., Prasad, G.B. ve Veer, V., 2015. Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. Parasites and Vectors, 8, 641.
- Yilmaz, S., Ayvaz, A., Akbulut, M., Azizoğlu, U. ve Karabörklü, S., 2012. A novel *Bacillus thuringiensis* strain and its pathogenicity against three important pest insects. Journal of Stored Products Research, 51, 33–40.
- Yousten, A.A., Wallis, D.A. ve Singer, S., 1984. Effect of oxygen on growth, sporulation, and mosquito larval toxin formation by *Bacillus sphaericus* 1593. Current Microbiology, 11, 175–178.
- Yuan, X., Zhao, M., Wei, J., Zhang, W., Wang, B., Khaing, M.M. ve Liang, G., 2017. New insights on the role of alkaline phosphatase 2 from *Spodoptera exigua* (Hübner) in the action mechanism of *Bt* toxin Cry2Aa. Journal of Insect Physiology, 98, 101-107.
- Zarei, M., Aminzadeh, S., Zolgharnein, H., Safahieh, A., Ghoroghi, A., Motallebi, A., Daliri, M. ve Lotfi, A.S., 2010. *Serratia marcescens* B4A chitinase product optimization using Taguchi approach. Iranian Journal of Biotechnology, 8, 252–262.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R. ve Bulla, L.A., 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103, 9897–9902.
- Zhou, K., Yamagishi, M. ve Osaki, M., 2008. *Paenibacillus* BRF-1 has biocontrol ability against *Phialophora gregata* disease and promotes soybean growth. Soil Science and Plant Nutrition, 54, 870–875.

- Zhu, C., Ruan, L., Peng, D., Yu, Z. ve Sun, M., 2006. Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against *Spodoptera exigua*. Letters in Applied Microbiology, 42, 109–114.
- Zou, H., Ding, S., Zhang, W., Yao, J., Jiang, L. ve Liang, J., 2016. Study on influence factors in *Bacillus thuringiensis* production by semi-solid state fermentation using food waste. Procedia Environmental Sciences, 31, 127–135.
- Zouari, N., Ali, S.B.S. ve Jaoua, S., 2002. Production of delta-endotoxins by *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various insecticidal activities towards lepidoptera and diptera in gruel and fish meal media. Enzyme and Microbial Technology, 31, 411–418.



8. EKLER

Ek 1. Besiyeri, Ayıraç, Boyalar ve Kimyasalların Hazırlanışı

Ek 1. 1. Besiyerlerinin Hazırlanışı

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

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

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

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

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

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

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

Terrific Broth (TB): 500 ml besiyeri için 6 g tripton, 12 g yeast extract tartılarak saf su ile 500 ml ye tamamlanır. Üzerine 2 ml gliserol eklenir, otoklavlanarak steril edilir.

Ek 1.2. Ayıraçlar ve Boyaların Hazırlanışı

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

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

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

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

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

Ek 1.3. Kimyasalların Hazırlanışı

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

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

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

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

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

Ek 2. Elde Edilen İzolatların 16S rRNA Gen Sıraları

>KX959974.1 *Bacillus cereus* strain Se1 16S ribosomal RNA gene

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACA
 TGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
 ACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGG
 CGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGA
 GGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
 AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
 AGGCTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAA
 TAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
 AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTA
 AAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG
 TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAT
 TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGGCGAA
 GCGGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA
 GAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
 GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
 CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
 GACATCCTCTGACACCCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGAC
 AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
 GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAA
 GGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA
 TGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCT
 GCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGT
 AGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
 TGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGT
 ACCA
 T

>KX959975.1 *Lysinibacillus macroides* strain Se2 16S ribosomal RNA gene

AGATAACGAGTTGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTA
 TTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACAT
 GCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAA
 CCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGAC
 GGTTTCGGCTGTGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
 CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAA
 GGTTTTTCGGATCGTAAA ACTCTGTTGTAAGGGAAGAGCAAGTACAGTAGTAAC
 TGGCTGTACCTTGACGGTACCTCATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA

GCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTG
 GAGGGTCATTGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATC
 CAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG
 CGACTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGG
 GGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA
 GTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCG
 GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA
 CATCCCGTTGACCACTGTAGAGAAATAGTTTCCCCTTCGGGGGCAACGGTGAC
 AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
 GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAG
 GTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
 GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGATACAAACGGTTG
 CCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGTA
 GGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAT
 GCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTA
 CCAT

>KX959976.1 *Pseudomonas geniculata* strain Se3 16S ribosomal RNA gene

ATTTTAGAGTTTGATCATGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACA
 TGCAAGTCGAACGGCAGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGGCGAGTGGCG
 GACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGG
 AAACCTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGATCTTCGG
 ACCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAG
 GCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTG
 GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG
 ACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCG
 GGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTG
 GGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC
 GGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCG
 TAGGTGGTTCGTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGC
 AGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGTTGTA
 GCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACC
 TGGACCAGCACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATT
 TGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGT
 CGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGT
 ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCG
 AGAACTTTCAGAGATGGATGGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTGC
 ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC
 GCAACCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACC
 GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCT
 TACGGCCAGGGCTACACACGTAACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGC
 CGGCGACGGTAAGCCAATCCCAGAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTG
 CAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTG
 CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTACCAT
 AATCGAATTCCCGCGGCCCGCCATGGCGGCCGGAGCTTGCAATTTCCGGTATCCC

>KX959977.1 *Paenibacillus tylophilus* strain Se4 16S ribosomal RNA gene

GGTACGAGTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTATTC
 TAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCA
 AGTCGAGCGGACTTGAAGAGAAGCTTGCTTCTCGGATGGTTAGCGGCGGACGG
 GTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCTCAAGCTTGGGACAACCTACCGGAAACG
 GTAGCTAATACCGAATACTTGTCTTCTCGCCTGAAGAGAACTGGAAAGACGG
 AGTAATCTGTCACTTGGGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
 AACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGGTGATCGGCCA
 CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
 CTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGG
 TTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTTGGGAGAGTAACTG
 CTCTCAAGGCGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCA
 GCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
 GCGCGCAGGCGGTCATGTAAGTCTGGTGTAAATCCCAGGGGCTCAACCCCGGA
 TCGCACTGGAAACTGTGTGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACG
 TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGCAAGGCGAC
 TCTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
 TTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGT
 TTCGATAACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
 CGGTGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTG
 GAGTATGTGGTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
 CCAACTAACGAGGCAGAGATGCGTTAGGTGCCCTTCCGGGAAAGTTGAGACA
 GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 AACGAGCGCAACCCTTATATTTAGTTGCCAGCACTTCCGGGTGGGCACTCTAGA
 TAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
 GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTAACAATGGCCGGTACAACGGGCAG
 CGAAATCGCGAGATGGAGCCAATCCCAACAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGC
 AGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
 TGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTCACACACGGT
 ACCATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAG
 CTCCCAACGCGTTGATGTCATGGTCCT

>KX959978.1 *Staphylococcus succinus* strain Se5 16S ribosomal RNA gene

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACA
 TGCAAGTCGAGCGAACGGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGAAGTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTTCGGGAAA
 CCGGAGCTAATGCCGGATAACATATAGAACCGCATGGTTCTATAGTGAAAGAT
 GGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGT
 AATGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
 CACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
 CTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
 TTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGCGTAAGTAACTG
 TGCGCATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
 GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
 GCGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGA
 GGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCA
 TGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGCGCAAGGCG

ACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGG
 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGG
 GTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
 ACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGT
 GGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACA
 TCCTTTGAAAACCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAG
 GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC
 ACGAGCGCAACCCCTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGGT
 GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
 CCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCT
 AAACCGCGAGGTCATGCAAATCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGT
 CTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGC
 TACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTACC
 AT

>KX959979.1 *Acinetobacter soli* strain Se6 16S ribosomal RNA gene

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACA
 TGCAAGTCGAGCGGAGTGATGGTGCTTGCCTATCACTTAGCGGCGGACGGGT
 GAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATCTCGAAAGGGAT
 GCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCACTTGTGACCTTG
 CGTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTAC
 CAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG
 GGGGGAACCCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGT
 AAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTCTTTTGGTTAATACCCAAGATGAGTGG
 ACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 ACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGC
 GGCCAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTCG
 AACTGGTTGGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGT
 GAAATGCGTAGAGATCTGGACGAATACCGATGGAGAAGGCAGCCATCTGGCC
 TAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
 CTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGAGCCTTTGAGGCTT
 TAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAG
 ACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG
 TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATAGTAGAACT
 TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAATCTACATACAGGTGCTGCATGGCT
 GTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
 CTTTTCCTTACTTGCCAGCATTTCGGATGGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGG
 CAAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCA
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAG
 GATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGAC
 TCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATAC
 GTTCCCAGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTACCAT

>**KX959980.1** *Chryseobacterium indologenes* strain Se7 16S ribosomal RNA gene

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGGAGGCCTAACACA
 TGCAAGCCGAGCGGTAGAGATCTTTCGGGATCTTGAGAGCGGCGTACGGGTGC
 GGAACACGTGTGCAACCTGCCTTTATCTGGGGGATAGCCTTTCGAAAGGAAGA
 TTAATACCCATAATACTGGATGGCATCATTCCGGTATTGAAAACCTCTGGTGG
 ATAGAGGTGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGTCTGCGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGGTGATCCCCCACACTGGTACTGAG
 ACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGG
 TGAGAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTA
 AACTTCTTTTGTATAGGGATAAACCTACCCTCGTGAGGGTAGCTGAAGGTA
 ATACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
 GTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGATCTGT
 AAGTCAGTGGTGAAATCTCACAGCTTAACTGGAAACCTGCCATTAATACTGCA
 GGTCTTAAGGGTTGTTGAAGTAGCTGAAATAAGTAGGGTAGCGGTGAAATGCA
 TAGATATTACTTGGACCACCAATGGCGAAGGCAGGTTACTAAGCACCAACTGA
 CGCTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGACCAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
 CACGCCGTAACGATGCTAACTCGTTTTTGGAGCGCAAGCTTCAGAGACTAAG
 CGAAAGTGATAAGTTAGCCACCTGGGGAGTACGAACGCAAGTTTGAAACTCA
 AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGATTATGGGGTTTAATTTCGATG
 ATACGCGAGGAACCTTACCAAGGCTTAAATGGGAAATGACAGGTTTAGAAAT
 AGACTTTTCTTCGGACATTTTTCAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGC
 CGTGAGGTGTTAGGTTAAGTCCTGCAACGAGCGCAACCCCTGTCACTAGTTGC
 CATCATTAAGTTGGGGACTCTAGTGAGACTGCCTACGCAAGTAGAGAGGAAGG
 TGGGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGCCCTGGGCCACACACGTAAT
 ACAATGGCCGGTACAGAGGGCAGCTACACTGCGAAGTGATGCAAATCTCGAA
 AGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCTATGAAGCTGGAAT
 CGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
 ACACACCGCCCGTCACACACGGTACCATA

>**KX959981.1** *Bacillus toyonensis* strain Se8 16S ribosomal RNA gene

CCGACATAAAATCAAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCTGCAGGC
 GGCCGCGAATTCAGTAGTGATTATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAA
 CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGC
 TCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATA
 AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACC
 GCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGC
 GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGC
 CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC
 AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGTTAGGGA
 AGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG
 CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA
 TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
 AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTG
 CAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATG
 GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCG
 CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA

ACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACG
 CATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAA
 TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
 GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTC
 TCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTG
 GAGATGTTGGGTAAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAT
 CATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
 GGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
 AATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAA
 ACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATC
 GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 ACACCGCCCGTCACACACGGTACCATAATCGAATTCCCGCGGCCCGCCATGGCG
 GCCGGAGCATGCGACTCGTAACTC

>KX959982.1 *Serratia marcescens* strain Se9 16S ribosomal RNA gene

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACA
 TGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGGAGCTTGCTCCCTGGGTGACGAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGG
 AAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCG
 GGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAT
 GGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACT
 GGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
 CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTC
 GGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAACCTAATACGTTTCAT
 CAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC
 GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC
 GCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG
 CATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGT
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
 CTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
 GATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTG
 AGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCC
 GCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA
 TGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGA
 GAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCA
 TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCG
 CAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGC
 CAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
 GAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCG
 CGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA
 CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGT
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACACGGTACCATA

>KX959983.1 *Paenibacillus amylolyticus* strain Se10 16S ribosomal RNA gene

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACA
 TGCAAGTCGAGCGGACTTGAAGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGGTTAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCTCAAGTTTGGGACAACCTACCGGA
 AACGGTAGCTAATACCGAATAATTGTTTTCTTCGCCTGAAGAAAACCTGGAAAG
 ACGGAGCAATCTGTCACTCGGGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
 AGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
 GAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATGCCGCGTGAGTGATG
 AAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTTGGGAGAGTA
 ACTGCTCTCAAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCC
 AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
 AAGCGCGCGCAGGCGGTCATTTAAGTCTGGTGTTTAATCCCGGGGCTCAACCC
 CGGATCGCACTGGAAACTGGGTGACTTGAGTGCAGAAGAAGAGAGTGGAATT
 CCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
 GCGACTCTCTGGGCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTA
 GGGGTTTCGATGCCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGG
 GAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG
 CAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAGCCTTACCAGGTCTT
 GACATCCCTCTGATCGATGCAGAGATGTATCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGAC
 AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
 GCAACGAGCGCAACCCTTATATTTAGTTGCCAGCACTTCGGGTGGGCACTCTA
 GATAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC
 ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTAATAATGGCCGGTACAACGGGC
 TGCGAAATCGCGAGATGGAGCCAATCCCAACAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATT
 GCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAG
 CATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACACG
 GTACCAT

>KX959984.1 *Paenibacillus xylanexedens* strain Se11 16S ribosomal RNA gene

GCTTTACGCATCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAT
 TCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATG
 CAAGTCGAGCGGAGTTGATAGGAAGCTTGCTTCCTTGATACTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCTCAAGTTTGGGACAACCTACCGGAAA
 CGGTAGCTAATACCGAATAGTTGTTTTCTTCGCCTGAAGGAAACTGGAAAGAC
 GGAGCAATCTGTCACTTGGGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
 CCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCGTAGGGAA
 TCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAG
 GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGCTTGGGAGAGTAACT
 GCTCTCAAGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC
 AGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
 CGCGCGCAGGCGGTCATTTAAGTCTGGTGTTTAATCCCGGGGCTCAACCCCGG
 ATCGCACTGGAAACTGGGTGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCA
 CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG

ACTCTCTGGGCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGG
 GTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
 TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAG
 TGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
 ATCCCTCTGATCGATGCAGAGATGTATCTTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGG
 TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCTTATATTTAGTTGCCAGCACTTCGGGTGGGCACTCTAGATA
 GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
 CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTA CTACAATGGCCGGTACAACGGGCCGCG
 AAATCGCGAGATGGAGCCAATCCCAACAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGCAG
 GCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
 CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTAC
 CAT

>KX959985.1 *Enterobacter ludwigii* strain Se12 16S ribosomal RNA gene

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACA
 TGCAAGTCGAGCGGTAACACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGA
 CGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAA
 ACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGG
 CCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGG
 CTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGG
 AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA
 CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG
 GTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACCTCAGCA
 ATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG
 TAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
 AGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA
 TTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGC
 GGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGATTACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG
 GACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAG
 GCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
 AAGGTTAAA ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
 TGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGA
 ACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATG
 GCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
 ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCA
 GTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGA
 GTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG
 AGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACT
 CGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGA
 ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTACCAT

>KX959986.1 *Bacillus thuringiensis* strain Se13 16S ribosomal RNA gene

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACA
 TGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
 ACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGG
 CGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGA
 GGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
 AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
 AGGCTTTCGGGTTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAA
 TAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
 AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTA
 AAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG
 TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAT
 TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGCGCAA
 GCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTAAGTGTTA
 GAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
 GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAG
 CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
 GACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGAC
 AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
 GCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAA
 GGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA
 TGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCT
 GCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGT
 AGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
 TGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGT
 ACCATACACACCGCCCGTCACACACGGTACCATACACACCGCCCGTCACACAC
 GGTACCATAATCGAATTCGCGCGGCCGCCATGGCGGCGGAGCATGCGAC

>KX959987.1 *Bacillus thuringiensis* strain Se14 16S ribosomal RNA gene

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACA
 TGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
 ACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTAAAAGG
 CGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGCATCGCATTAGCTAGTTGGTGA
 GGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
 AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
 AGGCTTTCGGGTTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGATGAACAAGTGCTAGTTGAA
 TAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
 AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTA
 AtGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT
 GGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATT
 CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGCGGAAG
 GCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC

AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGTGCTAAGTGTTAG
 AGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG
 AGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
 GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAGAACCTTACCAGGTCTTG
 ACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACA
 GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC
 AACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGG
 TCACTGCCGGTGTCAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
 CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCA
 AGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGG
 CTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC
 CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACACGGTACC
 AATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCC
 AACGCGTGGA

>KX959988.1 *Lysinibacillus fusiformis* strain Se15 16S ribosomal RNA gene

AAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGG
 GTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACC
 GGGGCTAATACCGAATAATCTGTTTCACCTCATGGTGAAATATTGAAAGACGG
 TTTCCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
 AACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
 CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
 CTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG
 ATTTCCGGTTCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTG
 GCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
 GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGC
 GCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGA
 GGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAATTCCA
 AGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
 ACTATTTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGG
 GGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
 TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG
 TGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
 ATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATGGTTTCCCCTTCGGGGGCAACGGTGACA
 GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC
 AACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGT
 GACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
 CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGATACAAACGGTTGCC
 AACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGG
 CTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC
 CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAG
 TTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAA

Ek 3. *Bacillus thuringiensis* Se13 suşunun toksin genlerinin sıraları

**>MH121039 *Bacillus thuringiensis* strain Se13 insecticidal crystal protein
Cry1Ac gene, partial sequence**

AGTATAATAAGAGTTCCTATGTTCTCTTGGATACATCGTAGTGCTGAATTTAAT
AATATAATTGCATCGGATAGTATTACTCAAATCCCTGCAGTGAAGGGAACTT
TCTTTTTAATGGTTCTGTAATTTTCAGGACCAGGATTTACTGGTGGGGACTTAGT
TAGATTAAATAGTAGTGGAATAACATTCAGAATAGAGGGTATATTGAAGTTC
CAATTCACCTCCCATCGACATCTACCAGATATCGAGTTCGTGTACGGTATGCTT
CTGTAACCCCGATTACCTCAACGTTAATTGGGGTAATTCATCCATTTTTTCCA
ATACAGTACCAGCTACAGCTACGTCATTAGATAATCTACAATCAAGTGATTTT
GGTTATTTTGAAAGTGCCAATGCTTTTACATCTTCATTAGGTAATATAGTAGGT
GTTAGAAATTTTAGTGGGACTGCAGGAGTGATAATAGTCAGATTTGAATTTAT
TCCAGTTACTGCAACACTCGAGGCTGAATATAATCTGGAAAGAGCGCAGAAGG
CGGTGAATGCGCTGTTTACGTCTACAAACCAACTAGGGCTAAAAACAAATGTA
ACGGATTATCATATTGATCAAGTGTCCAATTTAGTTACGTATTTATCGGATGAA
TTTTGTCTGGATGAAAAGCGAGAATTGTCCGAGAAAGTCAAACATGCGAAGCG
ACTCAGTGATGAACGCAATTTACTCCAAGATTCAAATTTCAAAGACATTAATA
GGCAACCAGAACGTGGGTGGGGCGGAAGTACAGGGATTACCATCCAAGGAGG
GGATGACGTATTTAAAGAAAATTACGTCACACTATCAGGTACCTTTGATGAGT
GCTATCCAACATATTTGTATCAAAAAATCGATGAATCAAATTTAAAAGCCTTT
ACCCGTTATCAATTAAGAGGGTATATCGAAGATAGTCAAGACTTAGAAATCTA
TTAATTCGCTACAATGCAAAACATGAAACAGTAAATGTGCCAGGTACGGGTT
CCTTATGGCCGCTTTCAGCCCAAAGTCCAATCGGAAGGTGCGGTGAACCGAAT
CGATG

**>MH121040 *Bacillus thuringiensis* strain Se13 insecticidal crystal protein
Cry2Aa gene, partial sequence**

GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGGGTATTTTCAGCAGCAACATTACGTACGTAT
CGAGATTACCTGAGAAATTATACAAGAGATTATTCTAATTATTGTATAAATAC
GTATCAAACCTGCGTTTAGAGGGTTAAACACCCGTTTACACGATATGTTAGAAT
T
TAGAACATATATGTTTTTAAATGTATTTGAATATGTATCCATTTGGTCATTGTTT
AAATATCAGAGTCTTATGGTATCTTCTGGCGCTAATTTATATGCTAGCGGTAGT
GGACCACAGCAGACACAATCATTTACAGCACAAAACCTGGCCATTTTTATATTC
TCTTTTCCAAGTTAATTCGAATTATATATTATCTGGTATTAGTGGTACTAGGCTT
TCTATTACCTTCCCTAATATTGGTGGTTTACCGGGTAGTACTACAACCTCATTCA
TTGAATAGTGCCAGGGTTAATTATAGCGGAGGAGTTTCATCTGGTCTCATAGG
GGCGACTAATCTCAATCACAACTTTAATTGCAGCACGGTCCCTCCCTCCTTTATC
AACACCATTTGTTAGAAGTTGGCTGGATTCAGGTACAGATCGAGAGGGCGTTG
CTACCTCTACGAATTGGCAGACAGAATCCTTTCAAACAACTTTAAGTTTAAGGT
GTGGTGCTTTTTTCAGCCCGTGGAAATTCAAACCTATTCCAGATTATTTTATCC
G

>MH121041 *Bacillus thuringiensis* strain Se13 vegetative insecticidal protein Vip3Aa gene, partial sequence

TGCCACTGGTATCAAAGACATTATGAACATGATTTTTTAAAACGGATACAGGTG
GTGATCTAACCCCTAGACGAAATTTTAAAGAATCAGCAGTTACTAAATGATATT
TCTGGTAAATTGGATGGGGTGAATGGAAGCTTAAATGATCTTATCGCACAGGG
AAACTTAAATACAGAATTATCTAAGGAAATATTA AAAAATTGCAAATGAACAAA
ATCAAGTTTTAAATGATGTTAATAACAAACTCGATGCGATAAATACGATGCTT
CGGGTATATCTACCTAAAATTACCTCTATGTTGAGTGATGTAATGAAACAAAA
TTATGCGCTAAGTCTGCAAATAGAATACTTAAGTAAACAATTGCAAGAGATTT
CTGATAAGTTGGATATTATTAATGTAAATGTACTTATTA ACTCTACACTTACTG
AAATTACACCTGCGTATCAAAGGATTAAATATGTGAACGAAAAATTTGAGGAA
TTAACTTTTGCTACAGAACTAGTTCAAAAAGTAAAAAAGGATGGCTCTCCTGC
AGATATTCTTGATGAGTTAACTGAGTTAACTGAACTAGCGAAAAGTGTAACAA
AAAATGATGTGGATGGTTTTGAATTTTACCTTAATACATTCCACGATGTAATGG
TAGGAAATAATTTATTCGGGCGTTCAGCTTTAAAAACTGCATCGGAATTAATT
ACTAAAGAAAATGTGAAAACAAGTGGCAGTGAGGTCGGAAAATGTTTATAACTT
CTTAATTGTATTAACAGCTCTGCAAGCAAAGCTTTTCTTACTTTAACAACATG
CCGAAAATTATTAGGCTTAGCAGATATTGATTATACTTCTATTATGAATGAACA
TTTAAATAAGGAAAAAGAGGAATTTAGAGTAAACATCCTCCCTACACTTTCTA
ATACTTTTTCTAATCCTAATTATGCAAAAAGTTAAAGGAAGTGATGAAGATGCA
AAGATGATTGTGGAAGCTAAACCAGGACATGCATTGATTGGGTTTGAAATTAG
TAATGATTCAATTACAGTATTA AAAAGTATATGAGGCTAAGCTAAAACAAAATT
ATCAAGTCGATAAGGATTCCTTATCGGAAGTTATTTATGGTGATATGGATAAA
TTATTGTGCCAGATCAATCTGAACAAATCTATTATACAAATAACATAGTATTT
CCAAATGAATATGTAATTA ACTAAAATTGATTTCACTAAAAAAATGAAAACTTT
AAGATATGAGGTAACAGCGAATTTTTATGATTCTTCTACAGGAGAAATTGACT
TAAATAAGAAAAAAGTAGAATCAAGTGAAGCGGAGTATAGAACGTTAAGTGC
TAATGATGATGGGGTGTATATGCCGTTAGGTGTCATCAGTGAAACATTTTTGAC
TCCGATTAATGGGTTTGGCCTCCAAGCTGATGAAAATTCAAGATTAATTACTTT
AACATGTAAATCATATTTAAGAGAACTACTGCTAGCAACAGACTTAAGCAATA
AAGAACTAAATTGATCGTCCC GCCAAGTGGTTTTATTAGCAATATTGTAGAG
AACGGGTCCATAGAAGAGGACAATTTAGAGCCGTGGAAAGCAAATAACAAGA
ATGCATATGTAGATCATACAGGAGGA

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında İzmir’de doğdu. İlkokula Menemen Cumhuriyet İlkokulu’nda başlayarak ilköğretimine Akiş Öğütçü İlköğretim okulunda devam etti ve liseyi İzmir Vali Erol Çakır Lisesi’nde tamamladı. 2005-2006 Eğitim–Öğretim yılında Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında bu bölümden Biyolog ünvanıyla mezun oldu. 2010 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2013 yılında yüksek lisansını tamamlayarak aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Doktora öğrenimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir. Web of Science’da taranan dergilerde yayınlanmış üç adet makalesi mevcuttur.

Yayınları,

- Eski, A., Demir, İ., Güllü, M. ve Demirbağ, Z., 2018. Biodiversity and pathogenicity of bacteria associated with the gut microbiota of beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Microbial Pathogenesis, (in press).
- Eski, A., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2018. Improvement of delta-endotoxin production from local *Bacillus thuringiensis* Se13 using Taguchi’s orthogonal array methodology. Turkish Journal of Biochemistry, 43, 6. (in press).
- Eski, A., Demir, İ., Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2017. A new biopesticide from a local *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Xd3) against alder leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33:95.
- Eski, A., Özkan Çakıcı, F., Güllü, M., Muratoğlu, H., Demirbağ, Z., Demir, İ., 2015. Identification and pathogenicity of bacteria in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae). Turkish Journal of Biology, 39:31–48.