

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOİNSEKTİSİT ÖZELLİĞİ OLAN MİKROBİYAL
FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ, SERA VE TARLA
KOŞULLARINDA KULLANIM OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

MÜNEVVER MÜGE YAZICI

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ADİL M. ALLAHVERDİYEV**

İSTANBUL, 2011

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOİNSEKTİSİT ÖZELLİĞİ OLAN MİKROBİYAL
FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ, SERA VE TARLA
KOŞULLARINDA KULLANIM OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI

Münevver Müge YAZICI tarafından hazırlanan tez çalışması 28.12.2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN

Yeditepe Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Meral BİRBİR

Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Sevil YÜCEL

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Yaşar Ali ÖNER

İstanbul Üniversitesi

Bu alışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 'nın TBAG-U/170 (105T339) numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında bilgi ve desteğiyle bana yardımcı olan, beni yönlendiren ve çalışmada bana rehberlik eden sayın danışmanlarım Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e ve Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans eğitimimde ilk danışmanım olan merhum Prof. Dr. Mehmet Mustafa AKDESTE 'ye teşekkürü bir borç bilip kendisini rahmetle anıyorum.

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek içten fikirleri ile çalışmamı değerlendiren değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Meral BİRBİR ve Sayın Doç. Dr. Sevil YÜCEL'e,

Doktora tezime mali destekte bulunan TÜBİTAK'a, Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına, Fen Bilimleri Enstitüsüne, Biyomühendislik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK 'a ve bölümümüzün değerli öğretim üyeleri ile öğrencileri Rabia ÇAKIR KOÇ, Serhat ELÇİÇEK, Serap YEŞİLKIR BAYDAR ve Emrah Şefik ABAMOR 'a,

Çalışmalarına destek veren ve yardımcı olan değerli Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA 'ya,

Tez çalışmamı değerlendiren değerli hocam Prof. Dr. Yaşar Ali ÖNER'e,

Çalışmanın yerine getirilmesine imkân sağlayan Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'ne ve bölümdeki değerli öğretim üyeleri ile asistan arkadaşlarıma ve özellikle desteği ve yardımları için Gülin BOZTAŞ'a,

Tez çalışmam boyunca benden yardımını ve desteğini esirgemeyerek hep yanımda olan değerli arkadaşım Olga Nehir ÖZTEL'e,

Bitki örneklerinin elde edilmesi ve seçimindeki yardımları için Salih GÜÇ'e,

Ayrıca doktora dönemim boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen amcalarım İbrahim YAZICI ve Hayri YAZICI'ya,

Manevi desteği ve yardımlarıyla yanımda olan abim Cüneyt YAZICI'ya,

Yaşamım boyunca benden desteğini esirgemeyen, doğruluk ve dürüstlüğü bana öğreten ve inancıyla bugünlere gelmemi sağlayan Anneme ve merhum Babama ve tez çalışmama emeği geçmiş herkese en içten teşekkürlerimi sunarım.

Aralık, 2011

Münevver Müge YAZICI

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ.....	V
KISALTMA LİSTESİ	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ	IV
ÖZET	X
ABSTRACT.....	XII
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özeti.....	1
1.2. Tezin Amacı.....	17
1.3. Hipotez.....	17
BÖLÜM 2	
DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	18
2.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	18
2.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	18
2.1.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerler.....	19
2.1.2.1 Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltilerin Hazırlanışları	20
2.2. Hastalıklı Zararlı Örneklerinin Toplanması ve Mikroorganizmaların İzole Edilmesi	21
2.3. İzole Edilen Mikroorganizmaların Tanısı	22
2.3.1. Bakterilerin MIS sistemi ile Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesi.....	22
2.3.2. Bakterilerin BIOLOG Sistemi ie Metabolik Enzim Profillerinin Belirlenmesi	24
2.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Baz Dizi Analizi	24
2.4. Bitki Özütlерinin Hazırlanması	26
2.5. Potansiyel Biyoajanların Laboratuvar, Sera ve Arazi Koşullarında Belirlenmesi (Biyoaktivite Testleri).....	29

2.6. Potansiyel Biyoajanların Sivrisinek Larvaları Üzerine Etkinliklerinin Belirlenmesi	32
2.7. Sera Zararlıları Üzerinde Etkinliği Belirlenen Potansiyel Biyoajan Mikroorganizmaların Toksisitelerinin Araştırılması	32
2.8. Sera Zararlıları ve Sivrisinek Larvaları Üzerinde Etkinliği Belirlenen Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Ticari Formülasyonlarının Geliştirilmesi	33
BÖLÜM 3	
DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR	34
3.1. Hastalıklı Zararlı Örneklerinin Toplanması ve Mikroorganizmaların İzole Edilmesi	34
3.2. İzole Edilen Mikroorganizmaların Tanı Sonuçları	39
3.3. Potansiyel Biyoajanların Laboratuvar, Sera ve Arazi Koşullarında Belirlenmesi (Biyoaktivite Testleri).....	46
3.4. Potansiyel Biyoajanların Sivrisinek Larvaları Üzerine Etkinliklerinin Belirlenmesi	63
3.5. Sera Zararlıları Üzerinde Etkinliği Belirlenen Potansiyel Biyoajan Mikroorganizmaların Toksisitelerinin Araştırılması	66
3.6. Sera Zararlıları ve Sivrisinek Larvaları Üzerinde Etkinliği Belirlenen Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Ticari Formülasyonlarının Geliştirilmesi	72
BÖLÜM 4	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR	78
EK-A	83
ÖZGEÇMİŞ	84

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
CFU	Bakteri hucresi
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
sa	Saat
sn	Saniye
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre

KISALTMA LİSTESİ

ABÖ	Aseton Bitki Özütü
AMÖ	Metanol Bitki Özütü
BIOLOG	Metabolik Profillere Göre Mikroorganizma Tanısı
dH ₂ O	Steril su
FAO	Gıda ve Tarım Teşkilatı
IPM	Entegre Mücadele Yöntemleri
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MIS	Mikroorganizma İdentifikasyon Sistemi
NA	Nutrient agar
PAGE	Poliakrilamide Jel Elektroforezi
PDA	Patates Dekstroz Agar
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic Detection
Rep-PZR	Repetitive Extragenic Palindromic Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TSA	Triptik Soy Agar

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1	Beyazsineğin steromikroskop görüntüsü 9
Şekil 1.2	Afitlerin steromikroskop görüntüsü..... 10
Şekil 1.3	Kırmızı örümcek steromikroskop görüntüsü 12
Şekil 1.4	MIS ve BIOLOG sistemleri..... 15
Şekil 2.1	MIS sistemi ile Yağ Asitlerinin Gaz Kromatografi Analizi 23
Şekil 2.2	Karışık bitki özütünde bulunan bitki türleri 27
Şekil 2.3	Ekstraksiyon ve Evaporasyon..... 28
Şekil 2.4	Sera koşullarında kültür bitkileri üzerinde beslenen beyazsinek ve kırmızı örümcek popülasyonları 30
Şekil 3.1	Sera koşullarında beyazsinek, kırmızı örümcek ve afit popülasyonu oluşturmak için yetiştirilen patlıcan, hıyar, domates ve biber bitkileri .. 35
Şekil 3.2	Sera koşullarında kültür bitkileri üzerinde oluşturulan zararlı (beyazsinek) k.örümcek ve afit) popülasyonu 36
Şekil 3.3	FS 51 (MBI5) bakterisinin MIS sonucu 40
Şekil 3.4	BS6 (MBI6) bakterisinin MIS sonucu 41
Şekil 3.5	BS7 (MBI7) bakterisinin MIS sonucu 42
Şekil 3.6	FS51, BS6 ve BS7 bakterilerin BIOLOG sonuçları 44
Şekil 3.7	16 S rDNA Baz Dizi Analizine Göre Filogenetik Akrabalık Şeması 45
Şekil 3.8	Laboratuvar koşullarında petriler içerisinde potansiyel biyoajan organizmalar ile test edilen sera zararlıları 47
Şekil 3.9	MY51, MY19, FS227 ve FS33 bakteriyel solüsyonların hıyar yaprağı üzerinde bulunan beyazsineklere sprey edildikten 48 saat sonra alınan steromikroskop görüntüleri 48
Şekil 3.10	Laboratuvar ortamında plastik kutular içinde bitki yaprakları üzerinde beslenen beyazsinek, k.örümcek ve afit popülasyonları üzerine potansiyel biyoajan bakteri ve fungus izolatlarının inokulasyonu 49
Şekil 3.11	Laboratuvar koşullarında plastik kutular içerisinde potansiyel biyoajan bakteriler ile test edilen afit örneklerinin stero mikroskop görüntüleri... 50
Şekil 3.12	Biyoaktivite testlerinde etkili bulunan fungus izolatlarının enfekteli afit örnekleri üzerindeki steromikroskop görüntüleri..... 51
Şekil 3.13	<i>Chryseobacterium balustinum</i> FS33 uygulamasından önce (üst) ve sonraki (alt) beyazsinek ve kırmızı örümcek örneklerinin steromikroskop görüntüleri 52

Şekil 3.14	<i>Chryseobacterium balustinum</i> FS33 uygulamasından sonraki ölen beyazsinek ve kırmızı örümcek örneklerinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri 53
Şekil 3.15	ABÖ: aseton bitki özütü ile MBÖ: metanol bitki özütünün konukçu hıyar yaprağı üzerinde bulunan kırmızı örümceklere karşı sprey edildikten 24 saat sonra alınan görüntüleri 54
Şekil 3.16	ABÖ: aseton bitki özütü ile MBÖ: metanol bitki özütünün konukçu hıyar yaprağı üzerinde bulunan afitlere karşı sprey edildikten 24 saat sonra alınan görüntüleri 54
Şekil 3.17	ABÖ+ FS51: aseton bitki özütü ile FS51 karışımı, MBÖ+ FS51: metanol bitki özütü ile FS51 karışımı, ABÖ: aseton bitki özütü, AMÖ: metanol bitki özütünün konukçu hıyar yaprağı üzerinde bulunan kırmızı örümceklere karşı sprey edildikten 24 saat sonra alınan görüntüleri..... 55
Şekil 3.18	Yeditepe Üniversitesi Araştırma Seraları 58
Şekil 3.19	Biyoaktivite testlerinde kullanılan üstte bitki büyütme kabinlerinde ve altta serada biber patlıcan, domates ve hıyar bitkileri 59
Şekil 3.20	Sera koşullarında potansiyel biyoajan bakteriler ile test edilen afit örneklerinin stero mikroskop görüntüleri 60
Şekil 3.21	Biyoaktivite testlerinde etkili bulunan fungus izolatlarının enfekteli afit örnekleri üzerindeki steromikroskop görüntüleri 61
Şekil 3.22	Adana'da YALTIR A.Ş. organik çilek üretim alanlarında yapılan çalışma 61
Şekil 3.23	Sivrisinek larvalarına karşı mikrobiyal formülasyonların laboratuvar koşullarında test edilmesi 63
Şekil 3.24	Sivrisinek larvaları üzerinde mikrobiyal formülasyonların larvasit etkisinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri 65
Şekil 3.25	Wistar sıçanlar üzerinde test edilen <i>Bacillus</i> spp. FS51 ve <i>Bacillus sphaericus</i> BS6 ve BS7 suşlarının karaciğer, dalak, akciğer, böbrek, mide ve bağırsak dokularındaki patoloji sonuçları (Soldan sağa doğru Grup 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) 71
Şekil 3.26	Efervesan granüller ve liyofilize edilen bakteri ile süt karışımının eklenmesiyle elde edilen ürün 74

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1.1	Dünyada kullanılan bazı biyopestisitler ve ticari isimleri 7
Çizelge 1.2	Beyaz sinekler ile örtü altı entegre programında tavsiye edilen ilaçlar ve dozları 9
Çizelge 1.3	Yaprakbitleri ile örtü altı entegre programında tavsiye edilen ilaçlar ve dozları..... 11
Çizelge 1.4	Kırmızı örümcekler ile örtü altı entegre programında tavsiye edilen ilaçlar ve dozları 12
Çizelge 3.1	Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgelerinde sera koşullarında yetiştirilen sebzelerde zararlı olan beyazsinek ve kırmızı örümcek popülasyonlarından toplanan hastalıklı veya ölü böcek örnekleri 37
Çizelge 3.2	Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgelerinde sera koşullarında yetiştirilen sebzelerden toplanan böcek örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar 38
Çizelge 3.3	Potansiyel biyoajan fungus izolatlarının tanı sonuçları 39
Çizelge 3.4	FS51, BS6 ve BS7 bakterilerin yağ asidi profili sonuçlarının bilinen ile karşılaştırılması 43
Çizelge 3.5	Laboratuvar koşullarında test edilen biyoajan, bitki özütü ve organik biyoinsektisit uygulamalarının hıyar bitkisi üzerindeki konukçu popülasyon üzerine etkileri 56
Çizelge 3.6	Potansiyel biyoajan bakteri, fungus izolatları ve bitki özütlerinin laboratuvar koşullarında sera zararlıları üzerine etkileri 57
Çizelge 3.7	Temiz ve kirli su ortamında FS 51, BS 6, BS7 ve B.sphaericus (Ref), suşlarının <i>Culex</i> sp. larvalarına etkisi 64
Çizelge 3.8	Kan değerleri 67
Çizelge 3.9	FS51 karaciğer enzim analizleri 68
Çizelge 3.10	BS6 ve BS7 suşlarının karaciğer enzim analizleri 69
Çizelge 3.11	FS51 Karaciğer enzim analizleri 70
Çizelge 3.12	Kan lökosit değerleri 71

ÖZET

BİYOİNSEKTİSİT ÖZELLİĞİ OLAN MİKROBİYAL FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ, SERA VE TARLA KOŞULLARINDA KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Münevver Müge YAZICI

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Eş Danışman: Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN

Doğada tarımda kullanılan kültür bitkileri üzerinde ekonomik zararlara neden olan çok sayıda zararlı bilinmektedir. Bu zararlılar ile mücadelede, çoğunlukla farklı ülkelerin hukuki sınırlamaları dikkate alınarak kimyasallar kullanılmaktadır. Ancak, zirai mücadelede kimyasalların ağırlıklı olarak kullanılmasının birçok dezavantajları bulunmaktadır. Zirai mücadelede kullanılan kimyasalların maliyetlerinin yüksek ve etkilerinin düşük olması, bazı kültür bitkilerinde toksik etki göstermeleri, sürekli ve aşırı kullanımları sonucu kimyasallara dayanıklı popülasyonların gelişmesi ve çevre kirliliğine neden oldukları için zamanla insan ve çevre sağlığını tehdit etmeleri kimyasalların bilinen bazı olumsuz yan etkileridir. Bu nedenle, tarımda zararlıların kontrolünde en uygun yöntemin, çevre dostu olan biyolojik mücadele yöntemi olduğu düşünülmektedir. Daha önce yapılmış birçok bilimsel çalışmalarda bazı potansiyel entomopatojenlerin belirlendiği ve bunlardan mikrobiyal pestisit geliştirilebileceği rapor edilmiştir. Bu durum dikkate alındığında, entomopatojenlerden geliştirilecek mikrobiyal pestisitler ile sera ve tarla koşullarında zararlılara karşı etkili bir biyolojik mücadelenin mümkün olabileceği ve bu tür mikrobiyal pestisitlerin tarımsal üretimde kullanımı ile insan ve çevre sağlığını tehdit eden kimyasalların kullanım miktarlarının azaltılacağı veya tamamen elemine edileceği kabul edilmektedir.

Şimdiye kadar geliştirilen biyoinsektisitler geniş kullanım alanı bulamamıştır. Buna göre çalışmanın amacı sera ve tarla koşullarında şiddetli zararlara neden olan böceklere karşı mikroorganizma ve bitki özütlerinden biyoinsektisit geliştirmek olmuştur.

Bu çalışmada; hastalıklı zararlı böcek (beyazsinek, afit, kırmızı örümcek) örnekleri toplandı. Böceklerden mikroorganizmalar izole edilerek tanımlandı. Elde edilen sonuçlara göre bu çalışmada toplam 282 mikroorganizma (236 bakteri suşu + 46 fungus izolatu) izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Potansiyel biyoajanları belirlemek için laboratuvar ve sera koşullarında zararlılar üzerinde biyoaktivite testleri yapıldı.

Bu mikroorganizmalardan üç adet bakteri suşu (*Bacillus* spp. FS51 *Bacillus sphaericus* BS6, BS7) ve dört adet fungus türüne ait izolatlar (*Cladosporium cladosporioides* MY1, MY4 ve *Penicillium italicum* var. *italicum* MY3, MY7) laboratuvar ve sera koşullarındaki biyoaktivite testlerine göre afitlere karşı potansiyel biyoajan olarak seçilmiştir. Seçilen biyoajan bakteri suşlarının memeliler üzerinde direkt ve endirekt yan etkilerinin olmadığı wistar sıçanlar üzerinde yapılan toksikoloji çalışmaları ile saptandı.

Ayrıca FS51, BS6 ve BS7 suşlarının dünya için yeni birer *Bacillus sphaericus* alt türü olduğu belirlendi ve patent hakları koruma altına alındı. Böylece bu çalışmada FS51, BS6 ve BS7 suşlarından oluşan biyoinsektisit bildirilmiştir. Seçilen bakteri suşlarından (FS51, BS6 ve BS7) yeni bir ticari formülasyon geliştirilmiştir. Bu tezde elde edilen sonuçlar patent ve tescil konusunda teşvik ederek, gelecekte etkili zararlı yönetiminde kullanılabileğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik kontrol, Organik tarım, Sera zararlıları, Mikrobiyal pestisit, *Bacillus* spp., *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium italicum*.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF BIOINSECTICIDE MICROBIAL FORMULATIONS AND INVESTIGATION OF THEIR APPLICATIONS UNDER GREENHOUSE AND FIELD CONDITIONS

Münevver Müge YAZICI

Department of Bioengineering
PhD. Thesis

Advisor: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Co-Advisor: Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN

There are many pests, which are causing economic damages on plants used in agriculture including vegetable and field crops, fruit and forest trees and/or pasture. Control of these pests is most commonly carried out on the basis of application of chemicals, which are recommended according to the specific legal restrictions of each country. However, the use of chemical applications for pest management is limited due to economic cost, low efficiency, and phytotoxicity to plants, development of resistance and risks for human and animal health. Therefore, it is thought that the most sustainable and environmentally acceptable control of plant pests can be achieved through biocontrol agents. Many of the previous studies have reported a number of entomopathogen organisms with a potential in use of microbial pesticides. Hence, it is possible to develop and apply these kinds of organisms for controlling pests in greenhouse and field conditions by eliminating or reducing chemicals in agricultural crop production threatening human and environmental health. However, bioinsecticides developed to date have not found wide application area.

The purpose of this study has been to develop bioinsecticide from microorganisms and plant extracts against to pests that caused severe damages in greenhouse and field conditions.

In this study, unhealthy pests (white fly, aphid and red spider) were collected. All isolated microorganisms were identified from pests. According to the results, total of 282 microorganisms (236 bacterial strains and 46 fungi isolates) were isolated and identified. Bioassay tests were performed to determine the potential bioagents under the laboratory, greenhouse and field conditions.

Among these microorganisms due to the bioassay studies of laboratory and greenhouse, three strains of one bacterial species (*Bacillus* spp. FS51 and *Bacillus sphaericus* BS6 and BS7), and four isolates of two fungi species (*Cladosporium cladosporioides* MY1, MY4, and *Penicillium italicum* var. *italicum* MY3, MY7) were selected as potential biocontrol agents for aphids. Toxicological studies on wistar rats for the selected bacterial strains suggested that they have no adverse effects and (warm-blooded) mammalian system.

Moreover, FS51, BS6 and BS7 strains were determined as a new sub-type of *Bacillus sphaericus* for all around the world and their patent rights were protected. Therefore, in this study FS51, BS6, BS7 strains were reported as bioinsecticide. A new commercial formulation was developed from the selected bacterial strains (FS51, BS6 and BS7). The results of this thesis can lead to effective pest management and promote patent and registration issues.

Keywords: Biological control, Organic farming, Greenhouse pests, Microbial pesticides, *Bacillus* spp. *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium italicum*.

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Günümüzde dünyanın en önemli problemlerinden birisi şüphesiz açlıktır. Özellikle, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde açlık hala ölümlere sebep olmaktadır. Dünyada, yeryüzünün %12'si ürün yetiştirmek amacıyla kullanılmakta ve bu alanın ise ancak, %26'sında gıda üretimi yapılmaktadır. Hızla artan nüfusu besleyebilmek için yeni tarım alanlarının açılması gerekirken maalesef erozyon, yeni yerleşim alanlarının açılması, yeni fabrikaların kurulması, trafiğin rahatlama amacıyla yeni yolların açılması gibi sebeplerle tarımsal üretime elverişli sahalar giderek azalmaktadır. Bu durum karşısında yapılacak iş, birim alandan elde edilecek ürün miktarının artırılmasıdır. Bu sebeple, modern tarım teknikleri ve girdilerinin kullanılması artık zorunlu hale gelmiştir. Ayrıca, zararlı ve hastalıklara karşı zirai mücadele ilaçlarının kullanımı ise bazen kaçınılmazdır. Kültür bitkilerinin verim ve kalitesini azaltan organizmalar arasında hastalık etmeni patojenler (fungus, bakteri, virüs gibi) ve zararlılar olarak bilinen hayvansal organizmalar, böcekler, akarlar, nematodlar, salyangozlar, sümüklü böcekler, kemirgenler, memeliler ve kuşlar sayılabilir. Bu organizmalar kültür bitkileri ve ürünlerini kemirip yemek, bitki özsuyunu emmek, bitki dokularını çürütmek, bitki hastalık etmenlerini sağlam bitkilere taşımak, salgıları veya pislikleri ile ürünleri kirletmek ve kaliteyi düşürmek suretiyle ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Gıda ve Tarım Teşkilatı (Food and Agriculture Organization (FAO) tarafından yayınlanan istatistiklerine göre her yıl dünya tarım ürünlerinin en az %12'lik bir bölümü (tarla ve depo şartlarında) patojen mikroorganizmaların neden olduğu bitki hastalıkları ve % 20'lik bir bölümü ise böceklerden dolayı kaybedilmektedir [1]. Bu oran, az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde daha fazladır. Sürekli artış gösteren insan nüfusuna

paralel olarak artan gıda açığını karşılamak amacıyla mevcut tarımsal ürünlerin verim kapasitesinin artırılmasının yanı sıra, bu ürünlerin verim ve kalitesini azaltan faktörlerin de mümkün olabildiğince asgariye indirilmesinin gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Beslenme ve patolojik faktörlere bağlı hastalıklar ve zararlılardan dolayı sera ve tarla koşullarında yetiştirilen tarım ürünlerindeki nicelik ve nitelikteki azalmayı ortadan kaldırmak için, etkili zirai mücadele metotlarının uygulanması zorunludur. Hastalık ve zararlılar ile mücadele günümüze kadar geleneksel tarımsal savaş yöntemleri (dayanıklılık, kimyasal ve kültürel) kullanılarak yürütölmekteydi. Fakat, kimyasal mücadelenin olumsuz yan etkilerinin anlaşılması nedeniyle, zirai mücadelede alternatif ve/veya tamamlayıcı yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur [2]. Bu durum dikkate alınarak, tarımsal üretimde sentetik gübreler ile bitki beslenmesi ve kimyasal pestisitler ile bitki koruma uygulamalarını yasaklayan yeni tarım politikaları (sürdürülebilir veya organik tarım) geliştirilmiştir. Organik tarım sisteminde hastalık ve zararlılar ile mücadelede biyolojik kontrol oldukça fazla ilgi görmeye başlamıştır. İnsan ve çevre üzerine olumsuz etkileri olmayan, maliyeti düşük, geniş spektrumlu ve her türlü çevre koşullarında kullanım imkanı olan biyoajan ve entomopatojenler belirlenerek, sera ve tarla koşullarında hastalık ve zararlıların kontrol edilmesi, biyolojik mücadelenin temel prensibi ve hedefidir [3 ve 4]. Gelişmekte olan veya az gelişmiş ölkelerde, halkının geçim kaynağı çoğunlukla tarıma dayalı ve bir tarım ölkesi kimliği taşıyan Türkiye’de, organik tarım yapmak veya en azından kimyasal pestisitlerin kullanımını azaltmak için alternatif olabilecek biyolojik savaş stratejilerini geliştirmeyi hedefleyen ciddi bilimsel çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle son yıllarda yürütölen araştırmalar sonucunda bazı mikrobiyal formölasyonlar geliştirilmiştir. Özellikle organik, ancak konvensiyonel tarım sistemlerinde de alternatif bitki besleme ve koruma preparatı olarak kullanılma potansiyelleri olan bu formölasyonların ticari üretimlerinin yapılması için gerekli girişimler başlatılmıştır [5-8]. Fakat şimdiye kadar organik ve sürdürülebilir tarım sistemlerinde özellikle sera koşullarında ekonomik kayıplara neden olan zararlılara karşı biyolojik mücadelede kullanılabilecek etkili ve geniş spektrumlu bir mikrobiyal insektisit geliştirilememiştir. Bu nedenle sera zararlılarının kontrolü için biyolojik preparatların geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Seralar, kültür bitkileri için optimum çevre şartlarının olduğu alanlardır. Bu alanlar, aynı zamanda bitki zararlısı böcek ve kırmızı örümceklerin yaşaması için de çok uygun ortamlardır. Doğal ortamdaki predatörler, parazitoitler ve hastalık etmenleri gibi faktörlerin de olmayışı birçok zararlı böcek ve akar türlerinin popülasyonlarının daha fazla artmasına ve ekonomik zararlara neden olmaktadır [9].

Gerling [10], böceklerden sera zararlısı olarak Homoptera takımına ait Aleyrodidae (beyazsinekler), Aphididae (afitler), Pseudococcidae ve Coccidae familyalarına ait bazı türlerin seralarda çok büyük ekonomik kayıplara sebep olduğunu belirtmektedir. Aynı araştırmada, *Trialeuroides vaporarium* (Westw.), *Bemisia tabasi* Gen. ve *Bemisia argentifolii* türlerinin polifag olduğunu ve her bir türün 300 kadar konukçu bitkide beslenip önemli ekonomik kayıplara neden olduklarını bildirmektedir. Yine, bu türlerin domates ve hıyarda çok büyük zararlar yaptığı ve direkt zararları yanında bazı bitki virüs hastalıklarının da vektörü olduklarını kaydetmektedir. Seralarda beyazsinek türlerinin kontrolü için yapılan çalışmalarda bazı parazitoit ve predatörler saptanmıştır. Nitekim, Avrupa'da 4.000 hektardan daha fazla bir alanda zararlı olan *Trialeuroides vaporarium* (Westw.)'un kontrolünde *Encarsia formosa* Gahan'nın başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmektedir [3]. *Aschersonia aleyrodis*, *Verticillium lecanii* ve *Paecilomyces fumosoroseus* gibi entomopatojen funguslar, beyazsinekleri, deriden enfekte ederek, nem oranının yüksek olduğu seralarda başarılı bir şekilde kontrol ettikleri belirtilmektedir [11].

Afitler, sera ve tarla alanlarında çok önemli bir zararlı grubudur. Polifag olan afit türlerinden *Aphis gossypii* Glover, Cucurbitaceae familyası bitkilerinde, *Macrosiphium rosae* (L.) Solanaceae ve Rosaceae familyası bitkilerinde, *Myzus persicae* (Sulz)'nın ise çok geniş bir konukçu spektrumuna sahip olduğu ve özellikle biberlerde çok fazla zararlara neden olduğu kaydedilmektedir [5]. Sera şartlarında çok yüksek üreme kapasitesine sahip olan afitlerin kontrolünün çok zor olduğu ve bunların kontrolü için seçici kimyasalların yanında dayanıklı bitki tür ve çeşitlerinin, kültürel ve biyolojik kontrol stratejilerinden oluşan kontrol yöntemlerinin kullanılmasının gerektiği belirtilmektedir [12]. Cebello ve Canero [13], dünyada sera alanlarının artış göstermesine paralel olarak hastalık ve zararlı sayısında da artışların olduğunu belirtmiştir.

Nitekim Avrupa’da son 25 yılda seralarda 40 yeni zararlı türün kaydedildiğini, hastalık ve zararlılara karşı yoğun kimyasal mücadele başlatıldığını, yeni geliştirilen kimyasallara karşı birkaç yıl sonra zararlı böcek ve patojenlerin direnç kazandıkları bildirilmektedir.

Aynı araştırmacılar, mücadele maliyetlerinde de büyük artış olduğunu ve Kuzey İspanya’da 1992 yılında mücadele maliyetinin m²’de 0,14 ABD doları olduğunu ve bunun toplam ürün maliyetinin %16,5’ine tekabül ettiğini belirtmektedirler. Lenteren [4], Hollanda da sera sebzelerinde zararlı ve hastalık kontrol maliyetinin daha düşük olmasına rağmen yine de toplam ürün üretim maliyetinin %3’ünü oluşturduğunu belirtmektedir.

Helyer ve Wardlow [14], *Verticillium lecanii* fungus türünün seralarda ve nem oranının yüksek olması sebebiyle afitlere karşı uygulandığında oldukça başarılı sonuçlar verdiğini bildirmektedirler. Ülkemizde, Doğu Akdeniz Bölgesi’nde (Adana, İçel ve Hatay) yaprak bitlerinde hastalık oluşturan fungusların belirlenmesi ve patojenitelerinin tespit edilmesine yönelik yapılan bir çalışmada toplam 20 izolat elde edilmiş ve bu izolatlar, pamukta *Aphis gossypii* Glov. ve *Myzus persicae*’den, turuçgillerde *Aphis gossypii* Glov.’den, marulda ise *Nasanovia ribis-nigri* (Mosley)’den elde edilmiştir [15].

Seralarda zarar oluşturan akarlar Tetranychidae, Tarsonemoidea ve Eriophyoidea familyalarına mensupturlar. Tetranychidae türlerinden özellikle *Tetranychus urticae* Koch seralarda yetiştirilen tüm bitkilerde zarar oluşturmaktadır.

Bunun yanında bazı virüs hastalıklarına da vektörlük yapmakta ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Yoğun kimyasal ilaç uygulanmasıyla başarılı mücadele yapılmakta, fakat son yıllarda ilaçlara karşı direnç oluşturduğu belirtilmektedir [16].

Dünyada 104 bakteriyel biyopreparatın zararlılara karşı ticari amaçla kullanıldığı ve bunların çoğunluğunun *Bacillus* ve *Coccobasillus* cinsleri içerisinde yer aldığı, özellikle, *Bacillus thuringiensis*’e ait biyopreparatların yaygın olarak Diptera ve Lepidoptera takımlarına ait zararlılarının larvalarına karşı kullanıldığı belirtilmektedir [17, 18]. Yine, aynı araştırmacılar, dünyada 12 fungus türünün biyopreparatının zararlılara karşı ticari amaçlı olarak kullanıldığını kaydetmektedirler.

Ülkemizde seralardaki zararlı ve faydalı fauna ile ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır [19-23].

Özbek [24], değişik yazarlara atfen, ülkemizde seralarda, *Tetranychus urticae* Koch (Acarina, Tetranychidae); *Gryllotalpa gryllotalpa* (Orthoptera Gryllotalpidae); *Thrips tabaci* Lind, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera, Thripidae); *Liriomyza strigata* (Meigen) (Diptera, Agromyzidae); *Aphis gossypii* (Glover), *Myzus persicae* (Sulz), *Macrosiphium euphorbiae* (Thomas) (Homoptera, Aphididae); *Bemisia tabaci* Gen. ve *Trialeuroides vaporarium* (Westw.) (Homoptera, Aleyrodidae) en çok rastlanan zararlılar olduğunu belirtmektedir. Aynı araştırmacı, ülkemizde bu zararlıların kontrolünde kimyasal mücadelenin kullanıldığını kaydetmektedir. Bu durumda göstermektedir ki özellikle ülkemizin de aralarında bulunduğu az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerdeki sera zararlılarının kontrolü için biyolojik preparatların geliştirilmesi ve kullanılmasına ihtiyaç olduğu açıkça görülmektedir.

Sera Zararlıları İle Mücadele Yöntemleri

Günümüzde gelişmiş ülkelerde tarım ve ormancılıkta ürün miktarı ve kalitenin artırılmasına yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur. En önemli çalışmalar; zararlı böceklerin, zararlıların ortadan kaldırılmasını veya en aza indirilmesine yönelik olarak yapılan zirai mücadele çalışmalarıdır. Fakat şu ana kadar uygulanan yöntemlerin çevre üzerinde olumsuz etkiler meydana getirdiği çok iyi bilinmektedir.

Günümüzde zararlı böceklerle mücadele çeşitli yöntemlerle yapılmasına rağmen, çevreye daha az zararları olan, daha etkili ve daha ekonomik mücadele yöntemleri halen araştırılmaktadır. Genelde birden fazla yöntemin bir arada kullanıldığı entegre mücadele yöntemlerinin (IPM) uygulanması gerekmektedir.

Zararlı böcekler ile yapılan mücadele çeşidi ise, kitle üremesi yapan veya yapma yeteneğinde olan böcek popülasyonlarının sayısının artmasını engellemek için uygulanan mücadele olarak bilinir. Tarımda ve ormancılıkta uygulanan çeşitli zirai mücadele yöntemleri aşağıda yer almaktadır.

Doğal Mücadele: Doğal kuvvetler ile insanın herhangi bir yardımı olmadan böcek popülasyonlarının kontrol altında tutulmasıdır.

Mekanik Mücadele: Feromonlar kullanmak, gıda değişimi yapmak, yem tuzakları kurmak, pusuya düşürmek, tuzak odunları hazırlamak veya böcekleri çeşitli yöntemlerle toplamak suretiyle yapılır.

Yasal Mücadele: Muayene, ambargo, karantina veya sertifika uygulamaları gibi yasal yollardan yararlanılarak zararlıların çoğalmalarını önler.

Fiziksel Mücadele: Radyoaktivite veya elektrik kullanılarak böceklerin kısırlaştırılması, nem ve sıcaktan yararlanılarak böceklerin öldürülmesi ile yapılan mücadeledir.

Kültürel Mücadele: Yabancı ot ve atıkların temizlenmesi, toprak işlenmesi, bakımı ve gübrelenmesi ve bitki nöbetleşmesi gibi toprakla ilgili yapılması gereken işleri içine alır.

Kimyasal Mücadele: Çeşitli kimyasal maddelerin toz veya sulu halde kullanılması ile yapılan mücadeledir. Çevreye verdiği negatif etkilerden dolayı günümüzde gelişmiş ülkelerde yavaş yavaş vazgeçilmektedir. Fakat ülkemizde halen çok yaygındır.

Biyolojik Mücadele: Böceklerin zararlarını azaltmak için canlı organizmalardan (mikroorganizmalar, feromonlar, böcek büyüme düzenleyicileri, omurgalılar, omurgasızlar, predatörler, parazitoid böcekler, bitkisel maddeler ve genetik kontroller) faydalanılarak yapılan ekonomik, güvenilir ve başarılı bir mücadele seçeneğidir.

Biyolojik mücadele çeşidi olan mikrobiyal mücadele; tarım ve ormancılıkta zarar oluşturan bir organizmanın zararlı etkisinin mikroorganizmalar veya mikroorganizmaların ürünleri kullanılarak ortadan kaldırma işlemidir. Mikrobiyal mücadele genellikle böcek patojeni mikroorganizmalar kullanılarak uygulanmaktadır. Potansiyel biyoajan olan bu mikroorganizmalar genellikle hastalıklı topraktan veya böceklerden elde edilir [25].

Biyolojik kontrolde amaç ajanın; sadece hedef sera ve tarla zararlılarına karşı çevreye ve insan sağlığına zararı olmadan etkili olmasıdır. Biyolojik mücadele yöntemlerinden bir ya da birkaçını birlikte kullanarak etkili olan mikrobiyal formülasyonlara biyoinsektisit denir. Biyoinsektisit özelliğinde olan formülasyonlar biyolojik kontrol ajanlarından biridir. Mikroorganizma içinden toprak grubu bakteriler en çok gelecek vaat eden biyolojik kontrol ajanlarıdır. Özellikle Bacillus grubu bakteriler önemli olup Diptera (sinekler, sivisinekler), Lepidoptera (kelebekler) ve Coleoptera (kın kanatlılar)'ların mücadelesinde kullanılmaktadır.

Günümüzde ticari preparatı yapılarak kullanılan biyoajanlar, bunların ticari formülasyonlarının isimleri ve etkili olduğu zararlı grubunu içeren bilgilerden bazıları aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 1.1 Dünyada kullanılan bazı biyopestisitler ve ticari isimleri [26]

Fungal biyoajanlar	Ticari adı	Kontrol ettiği zararlı/hastalık/patojen
<i>Beauveria bassiana</i>	Boverol	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	GMF	<i>Oryctes rhinoceros</i>
<i>Verticillium lecanii</i>	VERTALEC	<i>Aphis</i> spp.
<i>V. lecanii</i>	MYCOTAL	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>
<i>Hirsutella thompsonii</i>	MYCAR	<i>Phyllocaptruta oleivora</i>
<i>Trichoderma harzianum</i>	AG-2	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i>
<i>Trichoderma harzianum</i>	(ATCC-20476)	Ağaçta odun çürüklüklerine
<i>Trichoderma harzianum</i> -39	TRICHODEX	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Trichoderma harzianum</i> -1295-22	T-22	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Trichoderma harzianum</i> -22	ROOTSHIELD	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma polysporum</i>	BINAB-T	<i>Heterobasidion annosum</i> , <i>Chondrostereum purpureum</i>
<i>Trichoderma lignorum</i>	TRICHODERMIN-3	<i>R. solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Colletotrichum</i> sp.
<i>Trichoderma polysporum</i>	ATCC-20475	Odun çürüklüğü
<i>Trichoderma</i> sp.	F-STOP	Bezelye ve mısırdaki çökerten
<i>Gliocladium virens</i>	GL-21	Süs bitkilerinde çökerten
<i>G. virens</i>	GLIOGARD	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i>
<i>Phlebia gigantea</i>	PG-SUSPENSION	<i>Heterobasidion annosus</i>
<i>Coniothyrium minitans</i>	MICON	<i>S. sclerotiorum</i>

Bu çalışmada geliştirilen formülasyonlar üç tip sera zararlısına (Beyazsinekler, Yaprak Bitleri, Kırmızı Örümcekler) karşı denenmiştir. Her bir zararlının yaptığı zarar ve yapıları birbirinden farklılık göstermektedir. Aşağıda çalışmalarda kullanılan zararlılardan beyazsinekler, yaprak bitleri ve kırmızı örümcekler hakkında genel bilgi verilmiştir.

Beyazsinekler

Beyazsinekler seralardaki sebzelerde, ortamın nemine ve sıcaklığına bağlı olarak mevsim boyunca yaşamlarını sürdürebilirler. Yaşam döngüleri yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere dört evredir. Gelişimi sırasında yumurtaları kısa bir sap ile yaprağın alt epidermisine tutunur. Yumurtadan çıkan larvalar oval yapılı, hareketli, şeffaf ve beyazımsı sarı renktedir. Larvalar kısa bir süre sonra kendini yaprağa sabitleştirir ve hareketsiz duruma geçer. Üç larva dönemi bulunur, larvanın renginin koyulaştığı (koyu sarı) ve şişkinleştiği son dönem pupa dönemi olarak kabul edilir. Beyazsinek erginleri ise yaklaşık 1 mm boyunda ve genel görünüşü beyaz renktedir.

Erginlerinin 10°C'nin altında faaliyetleri, 14°C'nin altında ise yumurta bırakması yavaşlar. Her dişi ortalama 200–300 yumurta bırakır. Yılda ortalama 9–10 döl verebilir. Polifag bir zararlı olup, özellikle biber, hıyar, fasulye, patlıcan ve domateste zararı önemlidir.

Beyazsinek erginleri yumurta bırakma, beslenme, dinlenme için yaprakların alt yüzeyini ve bitkilerin alt kısımlarını tercih ederler. Larva ve erginler bitki özsuğunu emerek yaprakta küçük lekeler halinde sararma oluştururlar. Bitki zayıflar, meyve verimi azalır, zamanla kurur. Ayrıca beslenme sırasında salgıladıkları tatlı ve yapışkan bir madde üzerinde fumajin mantarları gelişerek siyah bir tabaka oluşmasına neden olurlar. Sonuç olarak bitki özümleme yapamaz halen gelir ve verim düşer. Ayrıca ürünün pazar değerinin düşmesine neden olur. Ayrıca beyazsinek erginleri bazı virüs hastalıklarının taşınmasında da önemli rol oynarlar.

Beyazsineklerle mücadelede aşağıda çizelgede görülen ilaçlar kullanılmaktadır. Biyolojik mücadele yöntemlerinin başında ise *Macrolophus caliginosus* ile *Encarsia formosa* gelir. Doğal düşmanları beyazsineklerin yumurta, larva ve pupasından beslenerek, onları baskı altında tutabilmektedir [27].



Şekil 1.1 Beyazsineğin steromikroskop görüntüsü

Çizelge 1.2 Beyazsinekler ile örtü altı entegre programında tavsiye edilen ilaçlar ve dozları [27]

Etkili Madde Adı ve Oranı	Form. tipi	Doz (Preparat)	İlaçlama-Hasat Arası süre (gün)
Öncelikli olarak tavsiye edilen ilaçlar			
Pymetrozine, %50	WG	60 g/hl- Patlıcan(Sera)	Patlıcan: 3
Pymetrozine, %25	WP	80 g/da-Patlıcan	Domates: 3 Patlıcan: 14
Pyridaphenthion, 400 g/l	EC	300 ml/da	Sebzeler: 15
Buprofezin, 250g/l	SC	150 ml/da	Patlıcan: 1
Acetamiprid, %20	SP	30 g/da-Domates	Domates: 3
Amitraz, 200 g/l	EC	300 ml/da	Sebzeler: 7
İkinci derecede tavsiye edilen ilaçlar			
Thiamethoxam, 240 g/l	SC	30ml/da-Patlıcan	Domates: 5 Patlıcan: 5
Formathion, 36 g/l	EC	150 ml/da	Sebzeler: 21
Primiphos-methyl, 500 g/l	EC	200 ml/da	Sebzeler: 4
İmidacloprid, 350g/l	SC	100ml/da- Domates, Patlıcan(Serada damla	Patlıcan: 7

		sulama)	
Pyridaben, %20	WP	100 g/hl- Domates (Sera)	Domates: 3

Yaprak Bitleri

Yaprak bitlerinin (Afitler) vücutları 1.5-3.0 mm. boyunda oval biçimde ve yumuşaktır. Özellikle bitkilerin taze sürgün ve dallarında koloni oluştururlar. Yaprak bitleri yaşayışlarına göre “İki konukçulu” ve “Tek konukçulu” olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bazı türleri kışı döllenmiş yumurta olarak geçirir. Kışı geçiren yumurtalardan çıkan afitlerden itibaren, sonbaharda gerçek dişiler ve erkek afitler oluşana kadar döllenmesiz olarak (partenogenetik) çoğalırlar ve canlı doğururlar. Kışı ılık olan yerlerde ve bazı türler seralarda yıl boyunca partenogenetik olarak çoğalmalarını sürdürürler ve zorunlu kışlamaya gerek duymazlar. Türleri ve sera koşullarına göre yılda 10–16 döl verirler.

Yaprak bitlerinin zararı bitki özsuynunu emerek olur. Emgi nedeniyle yapraklar büzüşerek, kıvrılmış bir hal alır. Sonuçta bitki zayıflar, gelişme durur, ürünün verim ve kalitesi bozulur. Ayrıca virüs hastalıklarının taşıyıcılığını yaparak sağlıklı bitkilere bulaştırmak suretiyle büyük zararlara neden olurlar. Afitlerin salgıladıkları tatlı maddelerde fumajin mantarı gelişir, bitki yüzeyini örter, özümleme ve solunuma engel olmaları sonucunda zarar oluştururlar. Polifag bir zararlıdır. Özellikle hıyar, domates, patlıcan ve kabakta zararı önemlidir. Biyolojik mücadelede predatörlerden *Coccinellid*, *Chrysopid* ve *Syrphid*’ler; parazitoitlerden de *Aphidius* türleri kullanılır [27].



Şekil 1.2 Afitlerin steromikroskop görüntüsü

Çizelge 1.3 Yaprak bitleri ile örtü altı entegre programında tavsiye edilen ilaçlar ve dozları [27]

Etkili Madde Adı ve Oranı	Form. tipi	Doz (Preparat)	İlaçlama-Hasat Arası Süre (gün)
Öncelikli olarak tavsiye edilen ilaçlar			
Pymetrozine, %25	WP	80 g/da-Patlıcan	Domates: 3
Bromophos, 360 g/l	EC	150 ml/da	Sebzeler: 7
İkinci derecede tavsiye edilen ilaçlar			
Beta-cyfluthrin, 25 g/l	EC	50ml-Domates	Sebzeler: 14
Thiamethoxam, 240 g/l	SC	15 ml/da-Domates	Domates: 5

Kırmızı Örümcekler

Kırmızı örümcekler yaprakların alt yüzeyine ördükleri ipek ağlar arasında, ergin, nimf ve yumurtaları ile birlikte bulunurlar. Ergin büyüklükleri 0.5-0.7 mm'dir. Birinci dönem larva üç çift bacaklı, nimf ve erginler ise dört çift bacaklıdır. Yumurtaları küreseldir, başlangıçta cam gibi şeffaftır ve açılmaya yakın koyulaşırlar. Polifag bir zararlıdır. Özellikle domates, patlıcan, fasulye, hıyar, ve kabakta zararı önemlidir.

Dişiler, yumurtalarını yaprak alt yüzeyinde damarları boyunca yaptıkları ağlar arasına bırakırlar. Yumurtadan çıkan larva, protonimf ve deutonimf dönemlerinden sonra ergin olur. Larvalar ergin geçişine kadar 3 gömlek değiştirirler. Bir dişi 100–200 yumurta bırakabilir. Yılda 10–12 döl verebilmektedir. Döl sayısı seranın koşullarına ve konukçusuna bağlı olarak değişir. Kırmızı örümcekler, beslenmelerini ağız parçaları içinde bulunan styletleri ile bitki dokusunu zedelemeleri sonucunda çıkan bitki özsuyla yaparlar [27].



Şekil 1.3 Kırmızı örümcek steromikroskop görüntüsü

Çizelge 1.4 Kırmızı örümcekler ile örtü altı entegre programında tavsiye edilen ilaçlar ve dozları [27]

Etkili Madde Adı ve Oranı	Formülasyon	Doz (Preparat)	İlaçlama-Hasat Arası Süre (gün)
Öncelikli olarak tavsiye edilen ilaçlar			
Tetradifon, 72 g/l	EC	150ml/hl	Sebzeler: 7
Hexythiazox, 50 g/l	EC	50ml/da	Patlıcan: 1
Bromophos, 360 g/l	EC	150ml/hl	Sebzeler: 7
İkinci derecede tavsiye edilen ilaçlar			
Etoxazole, 110 g/l	SC	35ml/hl-Domates	Domates: 3
Tebufenprayd, %20	WP	75g/hl-Fasulye	Sebzeler: 7
Quinomethionate, %25	WP	50 g/hl	Sebzeler: 7

Potansiyel Biyoajan Olan Mikroorganizmaların Tanılanması ve Karakterizasyonu

Taksonomik grupları önceden belirlenmiş bakteriyel türler ile karşılaştırarak bakteri türlerinin belirlenmesine tanı denir. Tanılanmak istenen bakteriler ile bilinen bakteri türlerine ait referans türlerinin genotipik ve/veya fenotipik özellikleri arasındaki benzerlikler araştırılır. Günümüze kadar mikroorganizmaların tanısı klasik yöntemler ile yapılmaktaydı.

Fakat mikroorganizmaların biyokimyasal, fizyolojik, morfolojik, patojenik ve serolojik özelliklerinin belirlenmesine dayanan konvensiyonel testlerin birçok dezavantajı bulunmaktadır. Bunlar; uzun zaman alması, fazla iş gücü gerektirmesi ve tek başlarına mikroorganizma tanısında yeterli olmamasıdır. Son yıllarda kullanıma sunulan moleküler biyoloji teknikleri sayesinde mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonunda yeni bir çağır açılmıştır. Genetik profillemeye, baz dizilimi analizi (RAPD, RFLP, PCR, Rep-PCR), serolojik tipleme, protein ve lipopolisakkarit profillemeye (SDS-PAGE) metabolik profillemeye (BIOLOG) ve yağ asit profillemeye (Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi=MIS) son yıllarda sık kullanılan moleküler metotlardır [28-37].

Bu çalışmada metabolik profillemeye (BIOLOG), yağ asit profillemeye (Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi=MIS) ve baz dizilimi analizi tanı yöntemi olarak seçilmiştir (Şekil 1.4).

Moleküler tekniklerden metabolik profillemeye (BIOLOG); ilk defa 1989 yılında BIOLOG (Biolog Inc, Hayward, CA. USA) firması tarafından geliştirilmiştir. BIOLOG yönteminde; farklı karbon kaynaklarına dayalı mikroorganizmaların tanısı, sınıflandırılması ve karakterizasyonunda kullanılmak üzere bir mikropate sistemi bulunmaktadır. Bu sistem 3 ana parçadan (Turbidimetre, Kinetik Okuyucu, Bilgisayar Sistemi) oluşmaktadır.

Bu mikropateler üzerinde toplam 96 çukurcuk bulunmaktadır. Mikropateler üzerindeki çukurcuklardan bir tanesi negatif kontrol olarak sadece su ile diğer 95 farklı çukurcuğun her birisi ise farklı bir karbon kaynağı ile (şekerler, alkol, deterjan ve amino asit türlerinden oluşan toplam 95 karbon kaynağı) kodlandıktan sonra üzerine de redoks boyası olarak tetrazolium violet ilave edilerek hazırlanmıştır.

Ayrıca mikroorganizmalar gruplandırılarak (fungus, maya, anaerobik bakteri, GN bakteri, GP bakteri), her bir mikroorganizma grubu için belirleyici olan karbon kaynaklarından oluşan farklı mikropateler hazırlanmıştır.

Çünkü mikroorganizmalar yaşamlarını sürdürmek ve çoğalmak için biyolojik enerjiye ihtiyaç duyarlar. Bu amaçla mikroorganizmalar sahip oldukları metabolik enzimler ile çeşitli karbon kaynaklarını (karbonhidratlar, deterjanlar, karboksilik asitler ve aminoasit türevleri) oksitleyerek enerji kaynağı olarak tüketir.

Mikroorganizma grupları arasında akrabalık derecelerine bağılı olarak cins, tür veya alt tür seviyelerinde metabolik enzimler ve kullandıkları karbon kaynakları bakımından farklılıklar bulunduğı ortaya konulmuştur [38-42].

BIOLOG yöntemi ile her bir gruba ait çok sayıda mikroorganizma mikroplatelerin üzerine inokule edilerek 4 saatlik bir inkübasyondan sonra metabolik profilleri belirlenebilmektedir. Elde edilen bu verileri kullanarak, mikroorganizmaların ait oldukları grup içerisinde cins, tür ve alt tür seviyesinde tanılayabilen kütüphanede bulunmaktadır.

Diğer bir yöntem olan yağ asidi profillerine göre mikroorganizmaları tanılayan sistem ilk defa 1985 yılında ABD'de MIDI, Inc. firması tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem; Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS) olarak isimlendirilmiştir. Bu sistem üç ana parçadan oluşur; 1) Gaz kromatografi, 2) Kromatografiyi besleyen gaz tankları (hidrojen, azot ve kuru hava), 3) Bilgisayar Sistemi.

Bu yöntem genetik olarak aynı olan mikroorganizmaların hücrelerindeki yağ asitlerinin sayısı, çeşitliliğı ve % olarak miktarlarının aynı olması ve çevre şartları aynı olduğu sürece değişmemesini esas alır.

Yağ asitleri mikroorganizmaların hücrelerinde sitoplazma ve diğer hücresel organellerin çift tabakalı membranlarında, fosfolipid, glikolipid veya lipopolisakkarit formunda yapı molekülü olarak bulunan hidrokarbon yapısında olan makromoleküllerdir.

Yağ asitleri; tek zincirli yağ asitleri ve dallanmış zincir oluşturan yağ asitleri olarak 2 ana grup altında toplanır. Biyolojik sistemlerde tek zincirli yağ asitleri yaygın görülse de; prokaryotlarda dallanmış zincir oluşturan yağ asitlerine de oldukça sık rastlanır.

Yağ asitleri içerdikleri karbon atomlarının sayısına, karbon atomları arasındaki çift bağ sayısı, hangi karbon atomları arasında çift bağ olduğu ve karbonların hidrojen atomları tarafından doyurulmuş olup olmamalarına göre farklı isimlendirilirler. Bu yağ asitlerinin dağılımı mikroorganizmaların genetik olarak akrabalıklarının göstergesi olduğundan; kültür ortamında çoğalabilen mikroorganizmaların gerek tanısı ve onların taksonomik sınıflandırılmasının yapılabilmesi için yağ asitleri profillerinin kullanılabileceğı birçok bilimsel çalışmada bildirilmektedir [43-50].



Şekil 1.4 MIS ve BIOLOG sistemleri

Diğer bir tanı yöntemi olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) bu amaçla kullanıma sunulan en etkili moleküler metotlardan birisidir. Burada genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş bir veya birden çok bölgenin *in-vitro* şartlar altında *Taq* polimeraz ve oligonükleotit primer kullanılarak otomatik termocycle sistem ile çoğaltılması yapılır.

Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforez ile yürütülerek birbirinden ayrıştırılır ve U.V. transuliminatör ile görüntülenir. Mikroorganizmaların özellikle konukçuları arasındaki ilişkileri belirleyen genlerin (toksin, enzim ve hormon) baz dizilimlerinden faydalanılarak sentezlenen oligonükleotid (primer) çiftleri ile tanıları yapılır. Ayrıca virüs ve viroidlerin dışında normal hücre yapısına sahip mikroorganizmaların rDNA genlerinin kromozomal DNA üzerindeki dağılımları ve tekrarlanma sıklıkları bu organizmaların taksonomik sınıfları ve tanıları için belirleyicidir. Bu amaca yönelik bakteriyel mikroorganizmalarda 16S-23S rDNA genleri arasındaki intergenik bölgelerin çoğaltılması ile elde edilen DNA bant profili mikrobiyal tanıda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bakteriyel mikroorganizmaların 16S rDNA bölgelerinin baz dizi analizi için daha hassas ve güvenilir olduğu anlaşılmıştır. Baz dizi analizi için MicroSeq rDNA mikrobiyal tanı sistemi Perkin-Elmer Applied Biosystems Division firması tarafından geliştirilmiştir.

Bu sistem ile tanılanacak mikroorganizmalardan izole edilen genomik DNA üzerindeki 16S rDNA genleri amplifiye edilir. Elde edilen ampikonların baz dizileri otomatik DNA sequencer ile saptanır ve kütüphanesi ile karşılaştırarak bilinmeyen mikroorganizmaların tanılarını yapar [51, 52].

1.2 Tezin Amacı

Ülkemizin de içinde bulunduğu az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerdeki sera zararlılarının kontrolü için biyolojik preparatların geliştirilmesi ve kullanılmasına ihtiyaç olduğu literatür bilgilerinde açıkça görülmektedir. Tüm bunlar dikkate alınarak yapılan bu çalışmada; sera zararlılarından Aleyrodidae (beyazsinekler), Aphididae (afitler) ve Tetranychidae (akarlar) türlerine mensup zararlılara karşı biyolojik mücadelede kullanılabilecek biyoajanların saptanması, potansiyel biyoajanların sera denemeleri yapılarak, zararlılara karşı yüksek etkinliğe sahip formülasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece ülkemizin ve dünyanın en önemli problemlerinden olan zirai mücadele ilaçlarında kimsayal ürün tercihi yerine; maliyeti düşük, insan ve çevre sağlığı açısından tehdit oluşturmeyen, doğal düşmanlara ve yararlı faunaya zarar vermeyen, hedef sera zararlılarına karşı biyolojik mücadelede kullanılabilecek etkili ve geniş spektrumlu bir mikrobiyal insektisit geliştirilmesi ve ticari ürün haline getirilerek pazara sunulması sağlanacaktır.

1.3 Hipotez

Bu çalışmanın amacını yerine getirmek için sırasıyla; hastalıklı zararlı (beyazsinek, afit, kırmızı örümcek) örneklerinin toplanması ve mikroorganizmaların izole edilerek tanımlanması, potansiyel biyoajanların belirlenmesi için laboratuvar ve sera koşullarında sera zararlıları üzerine etkilerinin araştırılması ile belirlenen potansiyel biyoajan mikroorganizmaların toksisitelerinin araştırılarak uygun bir formülasyon geliştirilmesi planlanmıştır.

BÖLÜM 2

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

2.1.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Deneyisel çalışmalarımızda aşağıdaki cihazlar kullanıldı.

- Taramalı elektron mikroskobu (Carl Zeiss Evo 40)
- Döner Buharlaştırıcı (Heildolph)
- Thermal Cycler-PZR (BIORAD)
- Jel görüntüleme sistemi (BIORAD)
- Balon ısıtıcısı (Gerhardt)
- Steril kabin (Heal Force, Class II)
- Santrifüj (BECKMAN)
- Manyetik karıştırıcı (Heildolph)
- Otoklav (Hiramaya)
- Hassas terazi (Ohaus)
- Inkubatör (Memmert)
- Biolog mikropate okuyucusu (Biolog, U.S.A.)
- Biolog türbidite (Biolog, U.S.A.)

- Mikroskop (Leica, DM500)
- Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIDI, Inc., Newark, DE)
- Su banyosu (Grant OLS 200)
- Otomatik pipetler (Eppendorf, GERMANY)
- pH metre (Mettler Toledo)
- Derin dondurucu (Thermo Electron Corporation)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Saf Su cihazı (Sartorius)
- Stereo Mikroskop (Leica MZ 16 FA)

2.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

Nutrient agar (Merck)

Nutrient broth (Merck)

Triptik soy agar (Merck)

Patates dekstroza agar (Merck)

Gliserol (Sigma)

Metil alkol (J.T. Baker)

Hidroklorik asit (Merck)

Hekzan (Merck)

Sodyum hidroksit (Merck)

Aseton (Merck)

Biolog Universal Growth Agar + %0.025 Maltoz (BUG+M) ((Biolog, U.S.A.)

DNA polimeraz (Fermentas, ABD)

2.1.2.1 Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltilerin Hazırlanışları

Çalışma boyunca kullanılan besi yerlerinin ve çözeltilerin hazırlanışı ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir:

%30 'luk Gliserol: 30 ml gliserol 70 ml sdH₂O'ya ilave edilerek karışım hazırlandı ve otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi.

Nutrient Agar: Hassas terazide 20 g nutrient agar karışımı (Merck) tartılarak 1 L dH₂O içerisine aktarıldı. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilerek soğumaya bırakıldı. Besiyeri 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere döküldü.

Nutrient Broth: Hassas terazide 8 g nutrient broth besiyeri tartılarak (Merck) 1 L dH₂O içerisine ilave edildi. Hazırlanan besi yeri otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildikten sonra soğumaya bırakıldı.

Patates Dekstroz Agar: Hassas terazide 39 g patates dektroz agar karışımı (Merck) tartılarak 1 L dH₂O içerisine aktarıldı. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilerek soğumaya bırakıldı. Besiyeri 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere döküldü.

Triptik Soy Agar: Hassas terazide 40 g patates dektroz agar karışımı (Merck) tartılarak 1 L dH₂O içerisine aktarıldı. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilerek soğumaya bırakıldı. Besiyeri 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere döküldü.

Hücre Parçalama (Saponification) çözeltisi: 150 ml sdH₂O ve 150 ml metil alkol (HPLC Grade) 1 L'lik renkli çözelti şişesine aktarıldı. Sonra katı formdaki sodyum hidroksit (ACS Grade)' den hassas terazide 45 g tartılarak çözeltiliye ilave edildi. Çözelti iyice çözülünceye kadar karıştırıldı.

Metilleştirme (Methylation) çözeltisi: 275 ml metil alkol (HPLC Grade) ve 325 ml hidroklorik asit (6 N) 1 L'lik renkli çözelti şişesi içerisine ilave edildi. Çözelti iyice çözülünceye kadar karıştırılarak hazırlandı.**Saflaştırma (Extraction) çözeltisi:** 200 ml metil-tert-butil-eter (HPLC Grade) 200 ml hekzan (HPLC Grade) üzerine ilave edilerek 1 L'lik renkli çözelti şişesine aktarıldı. Hazırlanan çözelti iyice çözülünceye kadar karıştırıldı.

Bazik yıkama (Base Wash) çözeltisi: Hassas terazide katı formdaki sodyum hidroksitden (ACS Grade) 10,8 g tartılarak 900 ml sdH₂O içerisinde iyice çözülünceye kadar karıştırıldı. Karışım 1 L'lik renkli çözelti şişesine aktarıldı.

2.2 Hastalıklı Zararlı Örneklerinin Toplanması ve Mikroorganizmaların İzole Edilmesi

Bilindiği gibi sera zararlıları ile mücadele çoğunlukla pestisitler ile yapılmaktadır. Son yıllarda alınan sonuçlara göre özellikle kırmızı örümcek popülasyonu uygulanan pestisitlere karşı direnç göstermeye başlamıştır. Bu çalışmanın amacı ise tamamen biyolojik preparatlardan oluşan biyoinektisit hazırlayarak ucuz fiyat ve yüksek etkinlik göstermesi sebebiyle sorun olan sera ve tarlalarda üreticinin kullanıma teşvik edilmesidir. Bu amaçla ilk olarak potansiyel biyoajan olabilecek mikroorganizmaların izolasyonu yapılmıştır.

Bunun için Antalya, Muğla, Bursa ve Yalova illerindeki seralarda yetiştirilen hıyar, domates, biber ve patlıcan bitkileri üzerinde araştırmalar yapıldı. Araştırmalar için epidemi görülmeyen ve pestisit uygulanmayan seralarda yetiştirilen kültür bitkileri kullanılmıştır. Tespit edilen zararlılar bitki örnekleri üzerinde toplanıp, etiketlendikten sonra polietilen torbalar içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda hastalıklı veya ölü oldukları tespit edilen zararlılar ışık mikroskobu kullanılarak fungus ve bakteri ile enfekteli olmak üzere iki gruba ayrılarak, uygun kültür ortamlarında (bakteriler için genel besi yeri (Nutrient Agar), funguslar için Patates Dekstroz Agar (PDA) mikrobiyal izolasyonlar yapılmıştır.

Enfekteli olan böcek örnekleri önce % 95'lik etil alkol ile yüzeysel sterilizasyon yapıldıktan sonra Nutrient Agar (NA) ve Patates Dekstroz Agar (PDA) besi ortamında izolasyon çalışmaları yapılmıştır. İnokule edilen besi yerleri 25°C de 3–5 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra gelişen her bir bakteriyel ve fungal koloniden ekim yapılarak saf kültürler elde edildi.

Saf kültürlerden stok kültür oluşturmak için her bir bakterinin saf kültüründen bir öze dolusu alınarak içerisinde 500 µl %30'luk gliserol ile 500 µl %8'lik nutrient broth bulunan vida kapaklı tüplere aktarılmıştır. Bu tüpler etiketlenip, vortekste karıştırıldıktan sonra -80°C'de saklanmıştır.

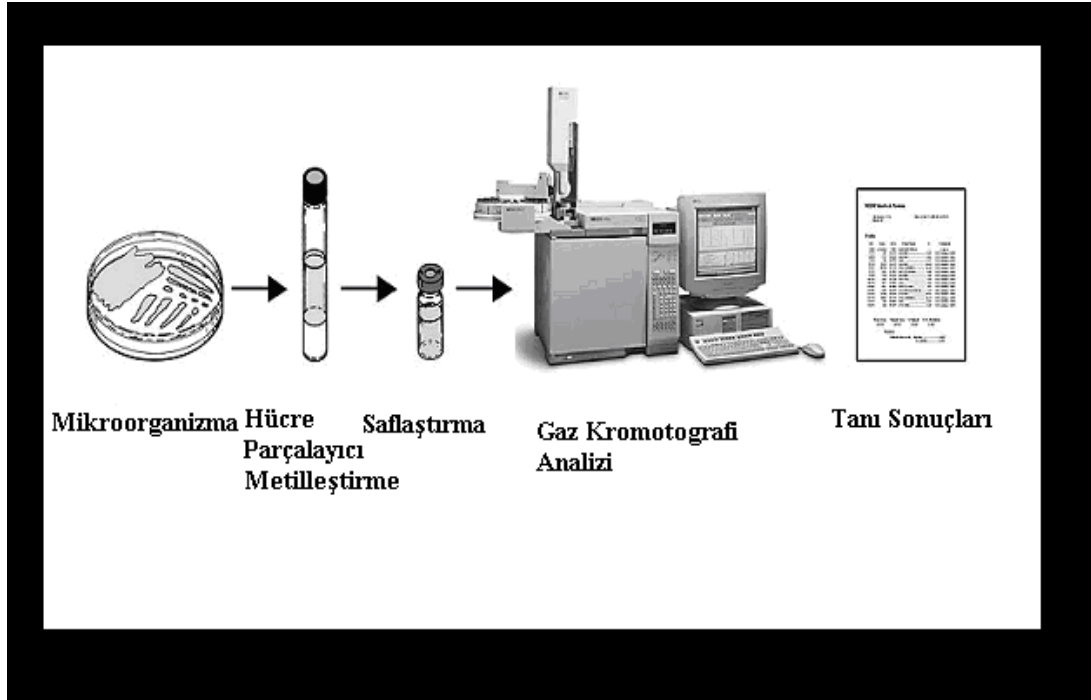
2.3 İzole Edilen Mikroorganizmaların Tanısı

2.3.1 Bakterilerin MIS sistemi ile Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesi

Yağ asidi metil esterlerinin saflaştırılmasında aşağıdaki prosedür uygulanmıştır (Şekil 2.1).

1. Steril öze ile aerobik bakterinin tek bir kolonisinden Triptik Soy Agar (TSA) besiyerlerine 4 fazlı ekimleri yapılır. Ekim yapılan petriler 28°C’ de 48 saat inkübasyona bırakılır.
2. 4 fazlı çizim yapılmış petrilerin 3 ve 4 numaralı fazlarından canlı bakteri hücreleri steril öze ile toplanarak, steril cam tüpe aktarılır.
3. Her bir test tüpüne hücre parçalayıcı olan çözeltiden 1 ml ilave edilir ve 10 saniye çalkalanır. Sonra 5 dakika süreyle 100°C’lik su banyosunda bekletilir. Tekrar 5–10 saniye çalkalanan test tüpleri 25 dakika süreyle 100°C’lik su banyosunda inkübasyona bırakılır. Bu işlem ile canlı hücreler parçalanarak, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanır.
4. Sonraki aşamada test tüplerine metilleştirme çözeltisinden 2 ml eklenir. 5-10 saniyelik çalkalamadan sonra 80°C’lik su banyosunda 10 dakika bekletilir ve bitiminde 2 dakika süreyle buz veya soğuk su içerisinde soğutulur. Bu sayede serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenmiş olur ve yağ asitlerinden yağ asit metil esterler elde edilir. Böylece yağ asitlerine yüksek sıcaklıklarda buharlaşma özelliği kazandırılmış olur.
5. Soğutulmuş tüplere 1.25 ml saflaştırma çözeltisi eklenir ve 10 dakika boyunca çalkalanır. Bu aşamada tüp içinde iki faz oluşur. Alt kısımda asidik, üst kısımda organik sıvı fazları oluşur. Yağ asit metil esterleri ise asidik fazdan ayrılarak organik fazda toplanır. Bu nedenle alt kısımdaki asidik faz pastör pipeti kullanarak atılır.
6. Son olarak her tüpe 3 ml bazik yıkama çözeltisinden eklenerek, 5 dakika çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir. Bazik yıkama solüsyonu serbest yağ asit metil esterlerini daha saf olarak elde etmemizi sağlar. Tüp içerisinde yine iki faz oluşur.

7. Üst fazda toplanan ve yağ asit metil esterlerini içeren faz pastör pipeti ile alınarak 2 ml gaz kromatografi tüplerine transfer edilir. Daha sonra MIS cihazı kullanılarak her bir izolat yağ asit profillerine göre tanınır.



Şekil 2.1 MIS sistemi ile yağ asitlerinin gaz kromatografi analizi

2.3.2 Bakterilerin BIOLOG Sistemi ile Metabolik Enzim Profillerinin Belirlenmesi

Metabolik profillemeye (BIOLOG) yöntemi ile yapılan mikroorganizma tanısında yapılan işlemler aşağıda yer almaktadır.

1. Hücre yapıları, gram reaksiyon özellikleri, büyüme ve koloni tiplerine göre gruplara ayrılan mikroorganizmalar için uygun Biolog standart besi ortamlarına ekimleri yapıldı.
2. Besi ortamında 16–24 saat süreyle çoğaltılan canlı hücreler salina tampon çözeltisi ile süspanse edildi.
3. Sonraki adımda Turbitimetre ile konsantrasyon ayarlamaları yapıldı.
4. Konsantrasyonları ayarlanan mikroorganizma solüsyonlarından uygun mikropate üzerindeki her bir çukurcuğa 150 µl eklendikten sonra plateler 4 saat inkübasyona bırakıldı.
5. Bu süre sonunda gelişen metabolik reaksiyon profilleri Biolog kinetik okuyucu ile okundu.
6. Elde edilen metabolik profiller sistemin programındaki bilinen mikroorganizmaların metabolik profilleri ile karşılaştırılarak tanıları yapıldı.

2.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Baz Dizi Analizi

Bakteri örneklerinden DNA izolasyonu

Bakterilerden total genomik DNA Jimenez'in anlattığı metot ile yapıldı [26].

- 1- Saflaştırılmış bakteriler Nutrient Agar (NA) katı besiyerinde 16–20 saat 27°C'de inkübe edildikten sonra tek bir koloniyi 10 ml Nutrient Broth ile kontamine edilerek 3-4 saat 27°C'de karıştırıcılı inkübatörde absorbansı 660nm'de 1 olana kadar inkübe edildi.
- 2- Bakteri hücreleri 2000 g'de 10dk santrifüj edildi ve besiyeri uzaklaştırıldı.
- 3- Hücreler 1ml Tris-EDTA buffer (10mM Tris Base, 1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9.0) içinde süspanse edildi ve 2ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı. 15 sn vorteksledikten sonra 14000 g'de 2dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.

- 4- 3. aşama üç kez tekrarlandı.
- 5- Son süpernatant uzaklaştırılmasından sonra 300 µl Tris-EDTA buffer ve 20 µl Proteinaz K eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- 6- 56 C°'de 10dk karıştırıcılı ısıtıcıda inkübe edildi.
- 7- 94 C°'de 30dk karıştırıcılı ısıtıcıda inkübe edildi.
- 8- 14000 G'de 2dk santrifüj edildi ve süpernatanttan 200 µl alındı ve ileriki PZR çalışmaları için -20 C°'de saklandı.

16S rRNA PZR amplifikasyonu ve purifikasyonu

Bakteri DNA izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi PZR amplifikasyonu saflaştırılmış DNA ile 27f ve 1492r üniversal primerleri ile yapıldı. *Bacillus sphaericus* benzeri bakterilerin 16S rRNA sekanslarına spesifik FAM1 ve FAM2 primerleri dizayn edildi. PZR amplifikasyonları toplam 50 µl hacim içinde 0.2 mM 27f, 1492r, FAM1, FAM2 primerleri, 1 U *pfu* DNA polymeraz, 0.2mM her bir deoxynucleosid trifosfat (dNTP), 1 mM MgSO₄, 10 mM Tris ve 50 ng kalıp DNA ile yapıldı. PZR protokolü; toplam denatürasyon 94°C de 5 dk; denatürasyon 94°C de 30 sn; primerlerin bağlanması 55°C de 40sn; uzama 72°C de 2 dk 34 döngü ve son tamamlanma için 72°C de 10 dk son amplifikasyon yapıldı.

Bacillaceae ailesinin *Bacillus sphaericus* benzeri üyelerine spesifik 16S rRNA gen bölgesinin 550 bp'lik bölgesine iki yeni primer dizayn edildi. Bakteri DNA izolatlarının 16S rRNA 550 bp gen bölgesi PZR amplifikasyonu saflaştırılmış DNA ile dizayn edilen FAM1 ve FAM2 primerleri ile yapıldı. PCR amplifikasyonları toplam 50 µl hacim içinde 0.2 mM FAM1 ve FAM2 primerleri, 1 U *pfu* DNA polymeraz, 0.2mM her bir deoxynucleosid trifosfat (dNTP), 1 mM MgSO₄, 10 mM Tris ve 50 ng template DNA ile yapıldı. PZR protokolü; toplam denatürasyon 94°C de 5 dk; denatürasyon 94°C de 30 sn; primerlerin bağlanması 51°C de 40 sn; uzama 72°C de 45 sn 34 döngü ve son tamamlanma için 72°C de 10 dk son amplifikasyon yapıldı. Amplifiye edilmiş PZR ürünlerinin; ethidium bromid'li %1 agaroz jel'de elektroforez sonrası Biorad jel görüntüleme sisteminde fotoğrafları alındı.

16S rRNA Genlerinin sekanslarının alınması ve Filogenetik Analiz

Jelden kesilerek saflaştırılmış PZR ürünleri Prism ABI 3100 Genetic Analyzer 16 *capillaries*, dideoxy terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) ile sekansları alındı. Üretici firma protokollerine aynen uyuldu. DNA'ların her iki ipliği için ayrı ayrı 27f, 1492r, FAM1 ve FAM2 primerleri ile sekansları alındı (Lane, 1991; Nakamura, 1996). NCBI Gen Bankasındaki *Bacillus sphaericus* benzeri bakterilerin 16S rRNA sekansları ile elimizdeki bakterilerin 16S rRNA sekansları Clustal V programı [52] yardımı ile karşılaştırıldı. Benzerlikleri ve farklılıkları çıkartıldı.

Genetik uzaklık Kimura'nın [53] iki parametrelili modeli ile hesaplandı ve neighbour-joining analizi için kullanıldı. Filogenetik dallar CLCGenomicsWorkbench_2_1_1 programı yardımı ile neighbour-joining ve maximum-parsimony metotları kullanılarak oluşturuldu. Her iki metod'da da benzer topolojiler ile dallar oluştu. Bu çalışma sonucu elde edilen her yeni 16S rRNA sekansı NCBI Gen Bankasına eklendi.

2.4 Bitki Özütlerinin Hazırlanması

Bitki özütü için ısırgan, lavanta, kekik, fesleğen, çörekotu, karanfil, pelin otu (*Urtica dioica*, *Lavandula angustifolia*, *Satureja hortensis*, *Ocimum basilicum*, *Nigella sativa*, *Syzgium aromaticum*, *Artemisia absinthium*) bitkileri kullanıldı (Şekil 2.2.). Bütün bitkiler güneş almayan, hava sirkülasyonu olan kapalı ortamda kurutuldu.

Kurutulan bitkilerden ekstarksiyon yöntemi ile bitki özütü elde edildi. Burada bitkiler ısırgan ve kekik 2 kat olmak üzere, diğerleri eşit oranlarda karıştırıldı. Karışımdan 15'er gram tartıldı ve 500 ml aseton veya metanol ile 24 saat ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktlardan çözücüler (aseton veya metanol) uzaklaştırıldı (Şekil 2.3).

Elde edilen özütün 1 ml'si 99 ml su ile seyreltildi. Elde edilen %1 'lik bitki özütleri zararlılara karşı denemelerde kullanıldı.



Şekil 2.2 Karışık bitki özütünde bulunan bitki türleri



Şekil 2.3 A. ekstraksiyon ve B. evaporasyon

2.5 Potansiyel Biyoajanların Laboratuvar, Sera ve Arazi Koşullarında Belirlenmesi (Biyoaktivite Testleri)

Bu çalışmada sera ve tarlalarda kültür bitkileri üzerinde verimi düşürerek ekonomik kayıplara neden olan zararlılardan beyazsinek, kırmızı örümcek ve afitlere karşı potansiyel biyoajanların etkinlikleri test edilmiştir. Biyoaktivite testleri her bir organizma için en az 2 defa 3 tekerrürlü olarak tekrarlanmıştır. Biyoaktivite testlerinde inokule edilen böcek türlerine ait popülasyonların herhangi birisinde %10 ve üzeri ölüme neden olan izolat/suşlar seçilerek potansiyel biyoajan olarak kabul edilmiştir (Çizelge 7).

Laboratuvar Testleri

İzolasyon ve tanıları yapılan her bir fungus izolatu ve bakteri suşunun nutrient agar besi ortamlarında alt kültürleri oluşturuldu. Hazırlanan alt kültürlerden 0.1 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde mikrobiyal süspansiyonlar türbidimetre ile (10^8 CFU bakteri/ml veya 10^4 fungus sporu/ml) hazırlandı. Biyoaktivite çalışmalarında pozitif kontrol olarak bir adet ticari bitkisel biyoinsektisit Kingbo (%0,2 Oxymatrine, % 4 Psoralen) ve araştırma amaçlı bir adet karışık bitki özütü (*Urtica dioica*, *Lavandula angustifolia*, *Satureja hortensis*, *Ocimum basilicum*, *Nigella sativa*, *Syzygium aromaticum*, *Artemisia absinthium*), ve negatif kontrol olarak su kullanılmıştır.

Sera koşullarında yetiştirilen konukçu bitki (domates, biber, hıyar ve patlıcan) yaprakları (Şekil 2.4) kopararak laboratuvar ortamında ilk olarak petri kutuları içerisine transfer edilerek biyoaktivite testleri yapıldı (Şekil 10). Hazırlanan mikrobiyal inokulumlar (10^8 CFU bakteri/ml veya 10^4 fungus sporu/ml) petrilerin içinde bulunan konukçu bitki yaprakları üzerinde beslenen *Bemisia* spp. (Beyazsinek), *Tetranychus urticae* Koch (Kırmızı örümcek) ve *Myzus* spp. (Afit) popülasyonları üzerine sprey edildi.

İkinci aşamada biyoaktivite testlerine plastik kutular ile devam edilmiştir. Plastik kutuların (5lt) tabanına yerleştirilen filtre kağıtlarına steril su emdirilerek çalışma süresince bitki yaprakları üzerindeki nisbi nem yüksek tutulmaya çalışılmıştır.

Petri ve plastik kutu kullanılarak yapılan biyoaktivite testlerinde inokule edilen böcek popülasyonları laboratuvar koşullarında 72 saat süreyle inkübe edildikten sonra mikroskopik inceleme yapılmış ve zararlı popülasyonun % ölüm oranları saptanmıştır.



Şekil 2.4 Sera koşullarında kültür bitkileri üzerinde beslenen beyazsinek ve kırmızı örümcek popülasyonları

Sera Testleri

Sera ve bitki büyütme kabinlerinde potansiyel biyoajanları belirlemek için patlıcan, domates, biber ve hıyar bitkilerinde biyoaktivite testleri yapıldı. Çalışma sırasında sera ve büyütme kabinlerinde sıcaklık 27 °C'ye, nem %80'e ayarlandı. Afit popülasyonu en çok patlıcan ve biber bitkileri üzerinde, beyaz sinek popülasyonu en çok hıyar bitkisinde, kırmızı örümcek popülasyonu ise domates ve hıyar bitkilerinde görülmüştür. Bu nedenle; afit üzerine olan etkilerini gözlemek için test edilecek bakteri suşları ve fungus izolatları patlıcan ve biber bitkilerine, beyaz sinek için patlıcan ve hıyar bitkilerine, kırmızı örümcek popülasyonu için domates ve hıyar bitkilerine uygulanmıştır. Uygulama için hazırlanan mikrobiyal inokulumlar (10^8 CFU bakteri/ml veya 10^4 fungus sporu/ml) konukçu bitki yaprakları üzerinde beslenen k.örümcek ve afit popülasyonları üzerine sprey edildi. İnokule edilen böcek popülasyonları 72 saat süreyle inkübe edildikten sonra mikroskopik inceleme yapılmış ve zararlı popülasyonun % ölüm oranları saptanmıştır.

Arazi Testleri

Adana YALTIR A.Ş. tarafından seçilmiş olan organik çilek üretim alanlarında epidemi oluşturan kırmızı örümcek popülasyonu ve Antalya Kumluca'da Makro Tarım A.Ş. hıyar üretimi yapan deneme seralarında epidemi oluşturan pestisitlere karşı dayanıklı kırmızı örümcek popülasyonu üzerinde uygulamalar yapılmıştır. Bu amaçla pozitif kontrol olarak Kingbo, negatif kontrol olarak distile su ve biyolojik ajan olarak 3 bakteri (*Bacillus* spp. FS51 *Bacillus sphaericus* BS6, BS7) ile 4 fungus izolatı (*Cladosporium cladosporioides* MY1, MY4 ve *Penicillium italicum* var. *italicum* MY3, MY7) test edilmiştir. Uygulama için mikrobiyal inokulumlar türbidimetre ile (10^8 CFU bakteri/ml veya 10^4 fungus sporu/ml) hazırlandı. Her iki denemede de uygulamalar tesadüfi deneme modeline göre 3 tekerrürlü olarak yapılmış ve her tekerrürde 40 bitki/uygulama şeklinde planlanmıştır. Uygulamalar sprey şeklinde yapılmıştır. Uygulamadan 48 saat sonra bitkilerden alınan yapraklar üzerinde ölü böcek sayısı tespit edilerek, kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

2.6 Potansiyel Biyoajanların Sivrisinek Larvaları Üzerine Etkinliklerinin Belirlenmesi

Literatürde *Bacillus sphaericus* suşlarının sivrisinek larvaları öldürme özelliği denilen larvasit etkinliği bildirilmektedir. Bu nedenle çalışmada izole edilen potansiyel biyoajan olan suşlardan *Bacillus* spp. (FS51), *Bacillus sphaericus* (BS6) ve *Bacillus sphaericus* (BS7) 'un *Culex* sp. türü sivrisinek larvalarına karşı öldürücü etkileri (Larvasit) olup olmadığı araştırıldı.

Bu çalışma için İstanbul'dan toplanan sağlıklı *Culex* sp. sivrisinek larvaları üzerinde laboratuvar koşullarında biyoaktivite çalışmaları yapıldı. Laboratuvar ortamında yapılan deneylerde; bakterilerden hazırlanan alt kültürlerden türbidimetre ile 0.1 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde mikrobiyal süspansiyonlar (10^8 CFU bakteri/ml) hazırlandı.

Deneyler her bir erlende 500 ml su içerisinde ortalama en az 40 adet sivrisinek larvası olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan mikrobiyal süspansiyonlardan 1ml alınarak larva bulunan erlenlere eklendi ve 72 saat boyunca gözlem yapıldı.

Çalışmada uygulama yapılmayan larva grubu negatif kontrol, ticari *Bacillus sphaericus* suşunun kullanıldığı larva grubu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Biyoaktivite testleri her bir mikroorganizma için en az 2 defa 3 tekerrürlü olarak tekrarlanmıştır.

2.7 Sera Zararlıları Üzerinde Etkinliği Belirlenen Potansiyel Biyoajan Mikroorganizmaların Toksisitelerinin Araştırılması

Laboratuvar ve sera testlerine göre seçilen biyoajanların çevre ve insan sağlığı üzerine olumsuz etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu denemeler için Yeditepe Üniversitesi, Kobay Hayvan Laboratuvarı'ndan hizmet alımı ile yapılmıştır. Aynı anne ve babadan meydana gelen (yakın genetik akraba) wistar sıçan yavrularının, 4 haftalık (yaklaşık 32-35 gr) oluncaya kadar anne sütü ile beslenmelerine müsaade edilmiştir. Daha sonra annesinden ayrılan bu yavruların cinsiyetleri belirlenerek, farklı cinslerden eşit sayılarda yavru sıçanı içine alan yedi farklı grup (en az dört sıçan) oluşturulmuştur. Çalışmada deney hayvanları akut toksisite, kronik toksisite ve kontrol olarak 3 gruba ayrıldı. Hazırlanan süspansiyonlar hayvanlara 4 hafta boyunca içme suyu olarak verildi.

Kontrol grubu toksikoloji testlerinde her bir uygulamada kullanılan her sıçan için dört haftalık uygulama periyodunu takiben makroskopik ve mikroskopik patolojik açıdan karaciğer, dalak, böbrek, mide ve ince barsakta herhangi bir değişiklik olup olmadığı belirlenmiştir. Uygulama sonrası kan değerleri ve karaciğer enzim miktarları da belirlenmiştir. Bu sıçanların her birisi beslenme süresince, yedi gün aralıklarla tartıldı ve gelişimleri takip edildi. Beslenen sıçanlar üzerinde günlük fenotipik incelemeler yapılarak, sıçanların derilerinde herhangi bir hastalık belirtisi, isal, idrarlarında kanama veya ani ölümlerin olup olmadığı belirlendi.

2.8 Sera Zararlıları ve Sivrisinek Larvaları Üzerinde Etkinliği Belirlenen Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Ticari Formülasyonlarının Geliştirilmesi

Çalışma sonucunda FS51, BS6 ve BS7 kodlu *Bacillus* spp. suşlarının ticari formülasyonları geliştirildi. Bu amaçla; efervesan granül hazırlama tekniği ile liyofilize edilmiş bakteriler ve taşıyıcı sistemin biraraya getirilmesiyle biyopestisit yapılmıştır. Geliştirilen formülasyon ile spor veya endotoksin elde etme sürecine gerek kalmadan, bakteriler direkt formülle karıştırılarak ürün haline gelmektedir. Tek kullanımlık şase şeklinde tasarlanan ürün bu şekilde ticari açıdanda kullanım kolaylığı sağlayacaktır. Aynı zamanda ürün stabilitesi içinde şase formu avantaj teşkil etmektedir. Formülasyonda minimum yardımcı madde kullanımına özen gösterilmiştir. Formülasyon ekonomik olup, yine uygun ve ekonomik ambalajlama tekniği (şase) kullanılmıştır.

DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

3.1 Hastalıklı Zararlı Örneklerinin Toplanması ve Mikroorganizmaların İzole Edilmesi

Çalışma kapsamında ilk olarak Antalya, Muğla, Bursa ve Yalova illerindeki seralarda yetiştirilen hıyar, domates, biber ve patlıcan bitkileri üzerinde araştırmalar yapılmıştır (Çizelge 3.1). Yapılan araştırmalar sonucunda toplam 74 adet beyazsinek ve 16 adet kırmızı örümcek örneği toplanmıştır. Toplanan her bir örnek ışık mikroskopu ile incelendi. Fungus ve bakteri ile enfekteli olan örnekler gruplandırıldı. Toplanan böcek örnekleri üzerinde virüs ve viroid enfeksiyonu saptanamamıştır.

İkinci olarak sera koşullarında afit populasyonları oluşturuldu (Şekil 2.2 ve 3.8.). Toplanan hastalıklı böcek örnekleri üzerinde yapılan incelemeler sonucunda bakteri ve fungus enfeksiyonu olduğu belirlenen örneklerden mikrobiyal izolasyonlar yapılmıştır. Enfekteli olan böcek örnekleri önce % 95'lik etil alkol ile yüzeysel sterilizasyon yapıldıktan sonra Nutrient Agar (NA) ve Patates Dekstroz Agar (PDA) besi ortamında seyreltme ekimleri yapıldı. İnokule edilen besi yerleri 25°C de 3–5 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra gelişen bakteriyel ve fungal kolonilerden saflaştırma ve stok kültürler oluşturuldu.



Şekil 3.1 Sera koşullarında beyazsinek, kırmızı örümcek ve afit popülasyonu oluşturmak için yetiştirilen patlıcan, hıyar, domates ve biber bitkileri



Şekil 3.2 Sera koşullarında kültür bitkileri üzerinde oluşturulan zararlı (beyazsinek, k.örümcek ve afit) popülasyonu

Çizelge 3.1 Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgelerinde sera koşullarında yetiştirilen sebzelerde zararlı olan beyazsinek ve kırmızı örümcek popülasyonlarından toplanan hastalıklı veya ölü böcek örnekleri

Bitki Türü/ Örnek sayısı	Antalya	Muğla	Bursa	Yalova	Toplam
Domates	14(3KÖ+11BS)	7 BS	13 BS	3 BS	37
Biber	3 BS	-	-	5 BS	8
Hıyar	8 BS	-	12 BS	9 (2KÖ+7BS)	29
Patlıcan	16 (11KÖ+5BS)	-	-	-	16
Toplam	41 (14KÖ+27BS)	7BS	25 BS	17 (2KÖ+15BS)	90 (16KÖ+74BS)

Böcek Türleri: KÖ=Kırmızı Örümcek, BS=Beyaz Sinek, A=Afit

Çizelge 3.2 Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgelerinde sera koşullarında yetiştirilen sebzelerden toplanan böcek örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar

Bitki Türü/Mikrobiyal İzolasyon	Antalya	Muğla	Bursa	Yalova	Toplam
Domates	56(35B+21F)	13(12B+1F)	42(32B+10F)	6 B	117(85B+32F)
Biber	9 (8B+1F)	-	-	17(16B+1F)	26 (24B+2F)
Hıyar	19 (17B+2F)	-	34 (28B+6B)	35 B	88 (80B+8F)
Patlıcan	51 B	-	-	-	51B
Toplam	135(111B+24F)	13(12B+1F)	76(60B+16F)	46(45B+1F)	282 (240B+42F)

Mikrobiyal İzolasyon: B=Bakteri; F=Fungus

Yapılan çalışmalar sonucunda 236 bakteri ve 46 fungal izolat (toplam 282 mikroorganizma) elde edilmiştir.

3.2 İzole Edilen Mikroorganizmaların Tanı Sonuçları

Çalışmada morfolojik karakterlerine göre izole edilen 42 fungal izolatın 15 *Fusarium* spp, 9 *Aspergillus* spp., 5 *Verticillium* spp., 7 *Botrytis* spp., 3 *Beauveria* spp. Ve 2 *Gliocladium* spp. olarak tanılandı. İzole edilen 236 bakteri suşlarının 35 *Kluyvera cryocrecens*, 29 *Salmonella* spp., 27 *Escherichia coli*, 25 *Klebsiella pneumoniae*, 24 *Bacillus* spp 21 *Enterobacter* spp., 16 *Photorhabdus luminescens*, 11 *Cedecea* spp., 8 *Stenotrophomonas maltophilia*, 7 *Pseudoxanthomonas broegbernensis*, 6 *Serratia* spp., *Enterobacter cancerogenus*, *Bacillus pumilus*, 2 *Bacillus sphaericus*, *Pantoea agglomerans*, *Salmonella choleraesuis*, 2 *Acinetobacter genomospecies*, 5 *Citribacter freundii*, 4 *Proteus mirabilis*, 3 *Shigella boydii*, 2 *Chryseobacterium balustinum*, 2 *Microbacterium barkeri*, 2 *Nesterkonia halobia*, ve 1 *Staphylococcus sciuri* olarak tanımlanmıştır. Yeditepe Üniversitesi seralarından biyoaktivite testleri yapılırken izole edilerek, tanımlanan iki adet fungusun sonuçları ise aşağıdaki çizelgede yer almaktadır.

Çizelge 3.3 Potansiyel biyoajan fungus izolatlarının tanı sonuçları

Fungus MY1, MY4	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
Fungus MY3, MY5, MY7	<i>Penicillium italicum</i> var. <i>italicum</i>

Tanımlanan bakterilerin içinden üç adet *Bacillus* cinsi bakterinin (FS51, BS6 ve BS7) hem sera zararlıları hem de sivrisineklerle mücadelede kullanılabilme potansiyeli olduğundan daha detaylı tanıları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda nükleik asit temelli 16S-rDNA PZR amplifikasyonu ile dizi analizleri sonucunda Dünya için yeni birer *Bacillus sphaericus* suşu olduğu belirlendi. Bu bakterilerin sırasıyla (FS51, BS6 ve BS7) yağ asidi profili, BIOLOG ve baz dizi analizi sonuçları aşağıda yer almaktadır.

Volume: DATA File: E119204.05A Samp Ctr: 3 ID Number: 7443
 Type: Samp Bottle: 2 Method: RTSBA6
 Created: 9/20/2011 10:00:40 AM
 Sample ID: MBI5

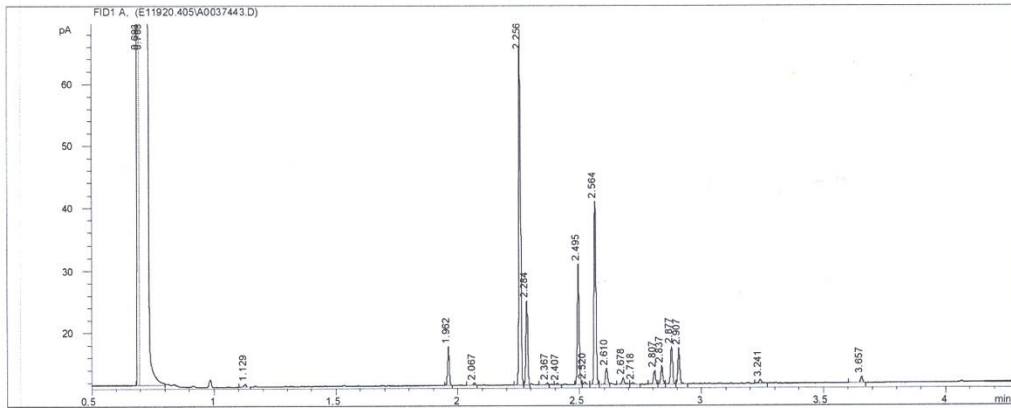
RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6934	2.312E+6	0.005	----	6.6779		----	< min rt	
0.7028	1.195E+9	0.016	----	6.7478	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.1289	765	0.011	----	9.8959		----		
1.9620	6314	0.008	0.980	13.6283	14:0 iso	3.96	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
2.0671	499	0.009	0.972	14.0011	14:0	0.31	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
2.2562	61542	0.009	0.962	14.6306	15:0 iso	37.85	ECL deviates -0.001	Reference -0.006
2.2840	14272	0.008	0.960	14.7232	15:0 anteiso	8.77	ECL deviates -0.002	Reference -0.006
2.3671	499	0.011	0.957	15.0000	15:0	----	ECL deviates 0.000	
2.4071	343	0.010	----	15.1288		----		
2.4950	21189	0.008	0.952	15.4116	16:1 w7c alcohol	12.91	ECL deviates -0.002	
2.5205	553	0.010	----	15.4933		----		
2.5644	32939	0.009	0.951	15.6346	16:0 iso	20.02	ECL deviates 0.002	Reference -0.003
2.6104	3201	0.010	0.949	15.7825	16:1 w11c	1.94	ECL deviates 0.000	
2.6784	1467	0.011	0.948	16.0015	16:0	0.89	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
2.7178	318	0.009	----	16.1270		----		
2.8075	2635	0.009	0.946	16.4132	17:1 iso w10c	1.59	ECL deviates -0.001	
2.8372	3428	0.009	0.945	16.5081	Sum In Feature 4	2.07	ECL deviates -0.004	17:1 anteiso B/iso l
2.8774	6966	0.009	0.945	16.6366	17:0 iso	4.21	ECL deviates 0.000	Reference -0.008
2.9074	6700	0.009	0.944	16.7322	17:0 anteiso	4.05	ECL deviates -0.001	Reference -0.008
3.2406	1061	0.011	0.943	17.7953	18:1 w9c	0.64	ECL deviates 0.001	
3.6566	1301	0.010	0.943	19.1520	18:1 2OH	0.78	ECL deviates 0.006	
----	3428	----	----	----	Summed Feature 4	2.07	17:1 iso l/anteiso B	17:1 anteiso B/iso l

ECL Deviation: 0.002
 Total Response: 165493
 Percent Named: 98.80%

Reference ECL Shift: 0.006 Number Reference Peaks: 8
 Total Named: 163515
 Total Amount: 156828

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.596	Bacillus-sphaericus-GC subgroup F
	0.581	Bacillus-sphaericus-GC subgroup E



Şekil 3.3 FS 51 (MBI5) bakterisinin MIS sonucu

Volume: DATA File: E119204.05A Samp Ctr: 4 ID Number: 7444
 Type: Samp Bottle: 3 Method: RTSBA6
 Created: 9/20/2011 10:09:04 AM
 Sample ID: MBI6

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6938	3.329E+6	0.005	----	6.6795		----	< min rt	
0.7035	1.189E+9	0.016	----	6.7518	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.1287	884	0.012	----	9.8931		----		
1.9623	2597	0.008	0.980	13.6284	14:0 iso	2.60	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
2.2565	48604	0.008	0.962	14.6311	15:0 iso	47.83	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
2.2847	9159	0.009	0.960	14.7249	15:0 anteiso	9.00	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
2.4955	13461	0.009	0.952	15.4126	16:1 w7c alcohol	13.12	ECL deviates -0.001	
2.5641	13300	0.009	0.951	15.6332	16:0 iso	12.94	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
2.6117	2154	0.012	0.949	15.7863	16:1 w11c	2.09	ECL deviates 0.004	
2.6785	830	0.010	0.948	16.0011	16:0	0.81	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
2.7178	411	0.010	----	16.1264		----		
2.8078	1419	0.009	0.946	16.4136	17:1 iso w10c	1.37	ECL deviates 0.000	
2.8375	2015	0.009	0.945	16.5085	Sum In Feature 4	1.95	ECL deviates -0.004	17:1 anteiso B/iso I
2.8774	3998	0.009	0.945	16.6357	17:0 iso	3.87	ECL deviates -0.001	Reference -0.008
2.9080	3219	0.009	0.944	16.7335	17:0 anteiso	3.11	ECL deviates 0.001	Reference -0.006
3.2408	1354	0.011	0.943	17.7958	18:1 w9c	1.31	ECL deviates 0.002	
----	2015	----	----	----	Summed Feature 4	1.95	17:1 iso I/anteiso B	17:1 anteiso B/iso I

ECL Deviation: 0.002

Reference ECL Shift: 0.005

Number Reference Peaks: 7

Total Response: 103404

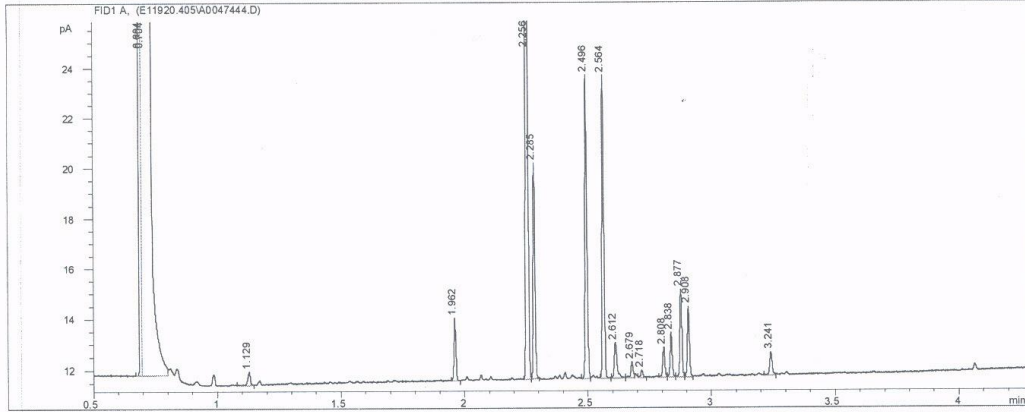
Total Named: 102109

Percent Named: 98.75%

Total Amount: 97715

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.821	Bacillus-sphaericus-GC subgroup E
	0.634	Bacillus-sphaericus-GC subgroup D
	0.552	Bacillus-sphaericus-GC subgroup F
	0.492	Bacillus-sphaericus-GC subgroup B



Şekil 3.4 BS6 (MBI6) bakterisinin MIS sonucu

Volume: DATA File: E119204.05A Samp Ctr: 5 ID Number: 7445
 Type: Samp Bottle: 4 Method: RTSBA6
 Created: 9/20/2011 10:17:37 AM
 Sample ID: MBI7

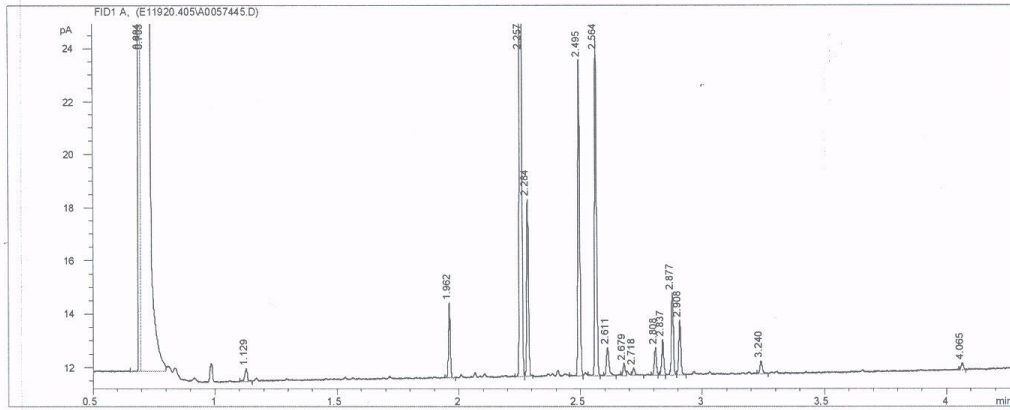
RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
0.6940	3.66E+6	0.005	----	6.6847		----	< min rt	
0.7034	1.176E+9	0.016	----	6.7545	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.1288	768	0.011	----	9.8965		----		
1.9621	2901	0.008	0.980	13.6286	14:0 iso	3.22	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
2.2565	42945	0.008	0.962	14.6316	15:0 iso	46.80	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
2.2841	6986	0.008	0.960	14.7236	15:0 anteiso	7.60	ECL deviates -0.001	Reference -0.005
2.4953	13504	0.009	0.952	15.4121	16:1 w7c alcohol	14.58	ECL deviates -0.002	
2.5642	14035	0.009	0.951	15.6335	16:0 iso	15.12	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
2.6115	1615	0.012	0.949	15.7855	16:1 w11c	1.74	ECL deviates 0.004	
2.6787	575	0.009	0.948	16.0018	16:0	0.62	ECL deviates 0.002	Reference -0.003
2.7179	450	0.010	----	16.1269		----		
2.8077	1277	0.010	0.946	16.4132	17:1 iso w10c	1.37	ECL deviates -0.001	
2.8374	1593	0.010	0.945	16.5079	Sum In Feature 4	1.71	ECL deviates -0.004	17:1 anteiso B/iso I
2.8775	3536	0.009	0.945	16.6357	17:0 iso	3.79	ECL deviates -0.001	Reference -0.008
2.9080	2486	0.009	0.944	16.7332	17:0 anteiso	2.66	ECL deviates 0.000	Reference -0.006
3.2404	756	0.011	0.943	17.7936	18:1 w9c	0.81	ECL deviates 0.000	
4.0651	392	0.008	----	20.5104		----	> max rt	
----	1593	----	----	----	Summed Feature 4	1.71	17:1 iso I/anteiso B	17:1 anteiso B/iso I

ECL Deviation: 0.002
 Total Response: 93425
 Percent Named: 98.70%

Reference ECL Shift: 0.005 Number Reference Peaks: 7
 Total Named: 92208
 Total Amount: 88245

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
RTSBA6 6.00	0.818	Bacillus-sphaericus-GC subgroup E
	0.629	Bacillus-sphaericus-GC subgroup F
	0.559	Bacillus-sphaericus-GC subgroup D
	0.556	Bacillus-sphaericus-GC subgroup C

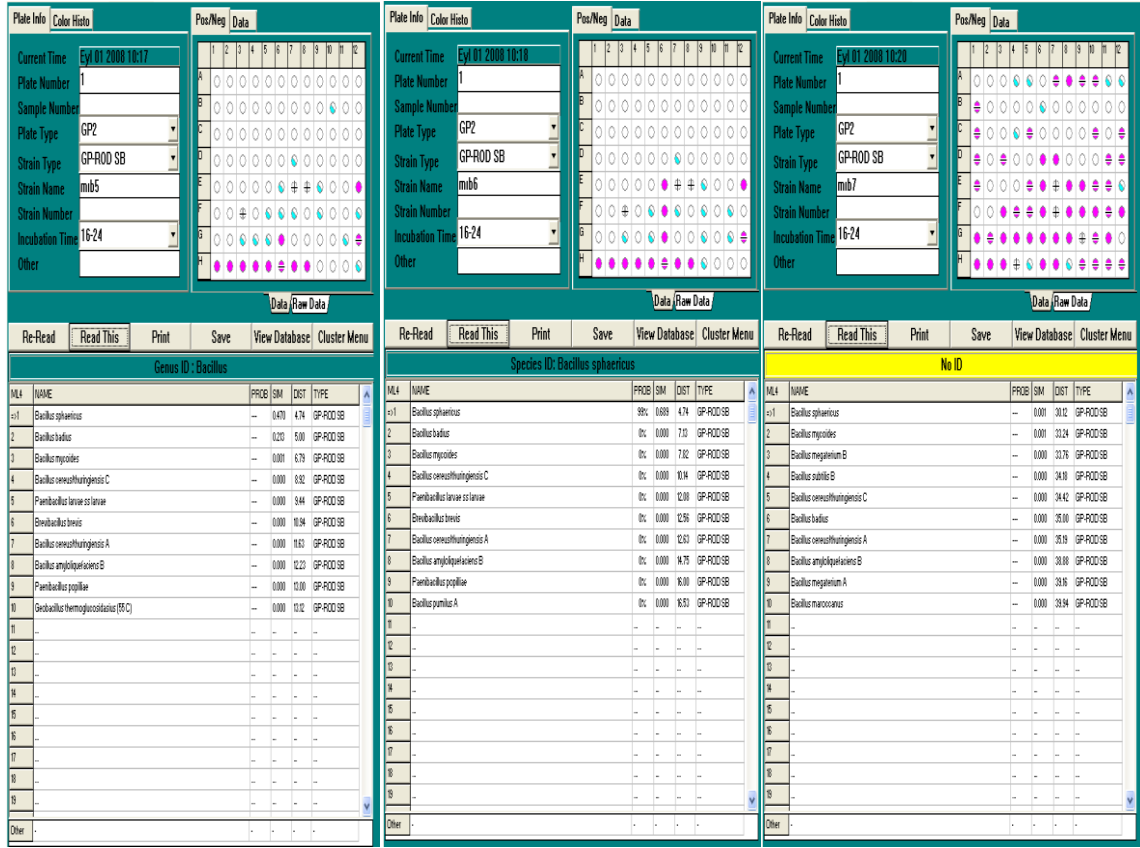


Şekil 3.5 BS7 (MBI7) bakterisinin MIS sonucu

Çizelge 3.4 FS51, BS6 ve BS7 bakterilerin yağ asidi profili sonuçlarının bilinen ile karşılaştırılması

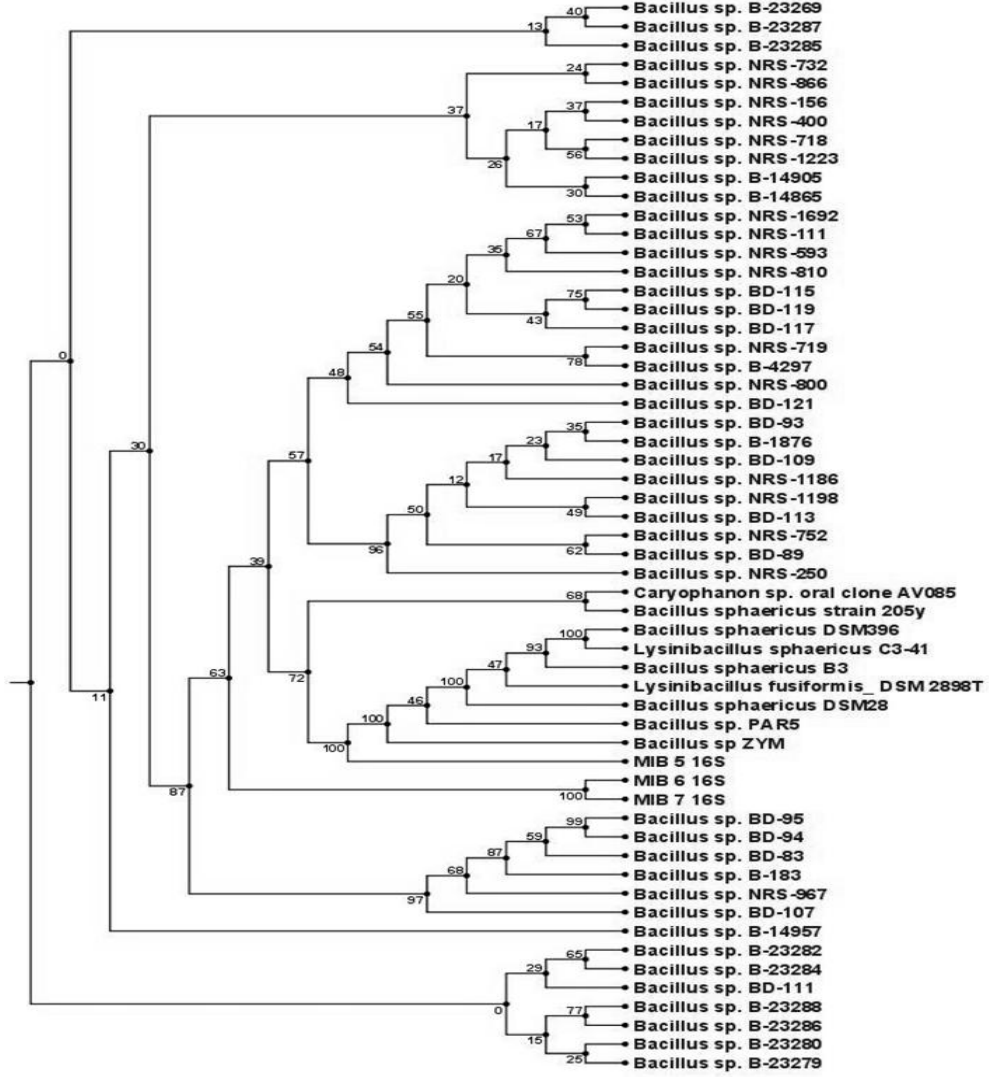
Yağ asitlerinin Nümerik isimleri (Pik isimleri)	% FS 51	% BS 6	% BS 7	% <i>B.sphaericus</i>
14:0 iso	2,02	4,38	1,51	1,26
14:0	0,60	-	0,68	0,85
15:0 iso	45,00	44,99	45,84	46,61
15:0 anteiso	10,87	9,22	13,13	7,89
14:0 iso 3OH	-	-	-	1,05
16:1 w7c alcohol	9,93	12,38	9,55	6,80
16:iso	12,65	15,24	8,14	5,48
16:1 w11c	3,31	2,04	3,31	5,62
16:0	1,72	0,78	1,78	1,64
17:1 iso w10c	1,43	1,40	2,35	4,92
Sum In Feature 4	1,65	1,72	2,32	2,58
17:0 iso	6,11	4,67	5,69	10,86
17:0 anteiso	4,70	3,19	4,67	4,45
18:1 w9c	-	-	1,03	-

Yağ asidi profilleri karşılaştırıldığında 14:0 numaralı doymuş yağ asiti olan Myristic (n-tetradecanoic) BS6'nın yapısında bulunmadığı görülmektedir. Aynı şekilde 18:1 w9c numaralı tekli doymamış yağ asidi olan Oleic (9-octadecenoic) sadece BS7'nin yapısında yer alırken diğer suşlarda görülmemektedir. 14:0 iso 3OH numaralı yağ asidi ise sadece referans suşta yer almaktadır. Bu sonuçlar her bir bakteri suşunun birbirinden farklı olduğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 3.6 FS51, BS6 ve BS7 bakterilerin BIOLOG sonuçları

BIOLOG sonuçlarında ise her bir bakterinin kullandığı metabolitlerin farklı olduğu analizin yapıldığı mikropelatelerdeki renk değişimlerinden görülmektedir. Fakat MIS ve BIOLOG kütüphaneleri kısıtlı olduğu için sadece mikroorganizmanın tür tanısını vermektedir. Bu bakterilerin birbirinden farklı ve yeni birer alt tür olduğunu kanıtlamak için 16 S rDNA baz dizilimi yapıldı.



Şekil 3.7 16 S rDNA baz dizi analizine göre filogenetik akrabalık şeması

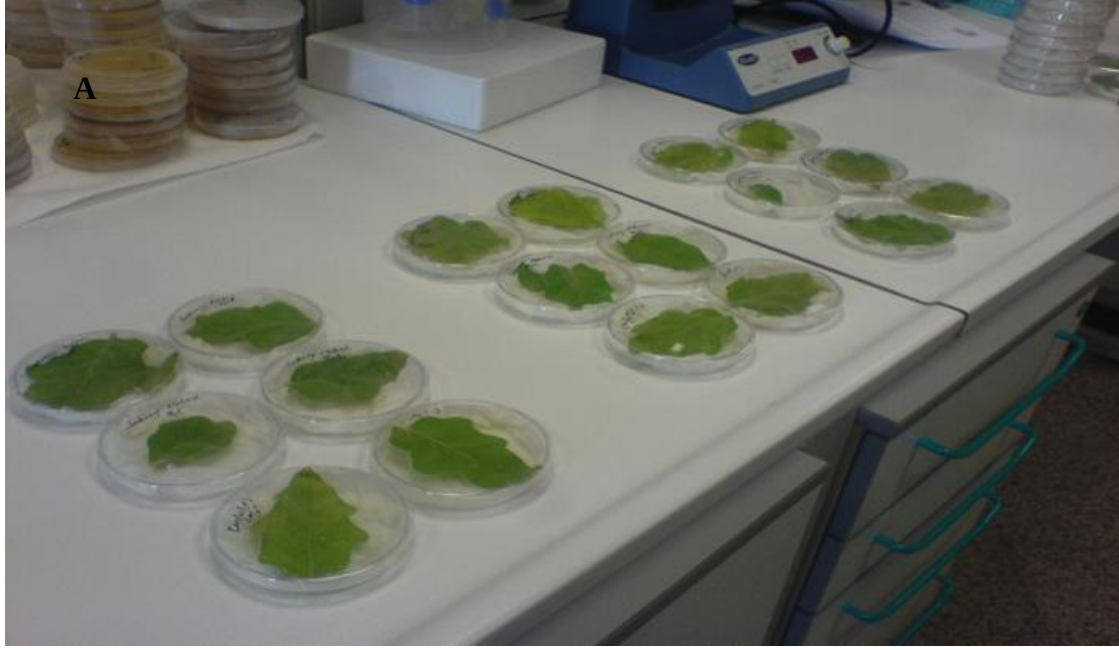
Yukarıdaki filogenetik ağaçta FS51, BS6 ve BS7 suşlarını sırasıyla MIB5, MIB6 ve MIB 7 temsil etmektedir. Filogenetik ağaca göre FS51, BS6 ve BS7 suşlarının bilinen *B. sphaericus* suşlarından 16 S rDNA baz dizilimine göre ayrıldığı görülmektedir.

3.3 Potansiyel Biyoajanların Laboratuvar, Sera ve Arazi Koşullarında Belirlenmesi (Biyoaktivite Testleri)

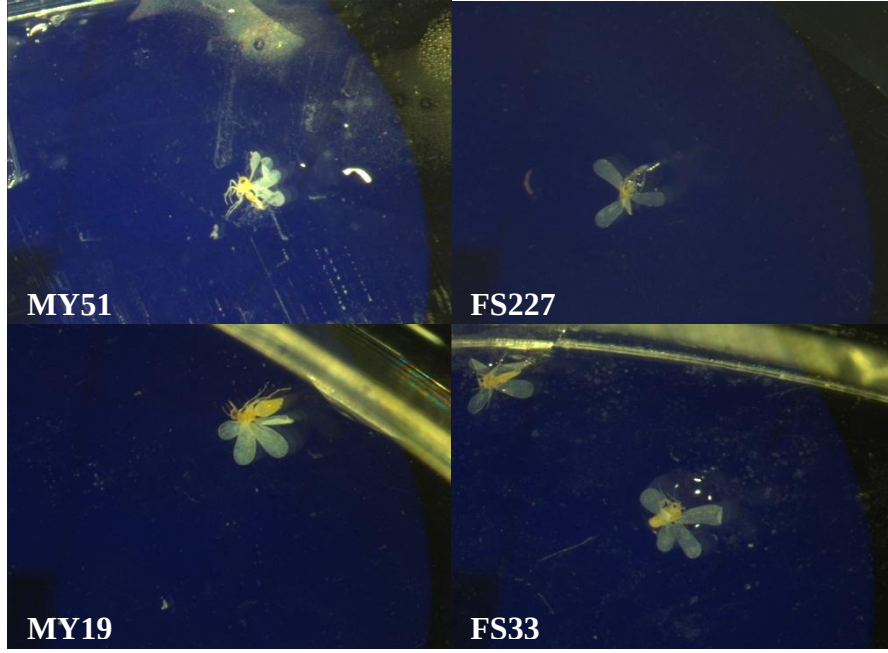
Çalışma kapsamında izole edilen ve tanılanan bütün bakteri suşları ve fungus izolatlarının sera zararlılarına karşı etkili bir biyoajan olarak kullanılma olanaklarının olup olmadığı laboratuvar, sera ve arazi koşullarında yürütülen biyolojik etkinlik testleri ile belirlenmiştir (Şekil 3.8 ve 3.10).

Laboratuvar Testlerinin Sonuçları:

Beyazsinek popülasyonuna olan etkilerini gözlemek için bakteriyal süspansiyonlar ile bitki özütleri; patlıcan ve hıyar bitkilerinin yaprakları üzerine, petri kapları ve plastik kutular içerisinde uygulanmıştır. *Bacillus pumilus* (MY51), *Salmonella choleraesuis* (MY19), *Stenotrophomonas maltophilia* (FS227) ve *Chryseobacterium balustinum* (FS33) bakteri solüsyonları petri kapları içerisinde yapılan çalışmalarda başarı göstermiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Laboratuvar koşullarında petriler içerisinde potansiyel biyoajan organizmalar ile test edilen sera zararlıları



Şekil 3.9 MY51, MY19, FS227 ve FS33 bakteriyal solüsyonların hıyar yaprağı üzerinde bulunan beyazsineklere spray edildikten 48 saat sonra alınan steromikroskop görüntüleri

Petri ve plastik kutularda yapılan testlerde izole edilen suşlardan *Bacillus* spp. FS51, *Stenotrophomonas maltophilia* FS227, *Nesterenkonia halobia* FS78, *Staphylococcus gallinarum* SG1, *Chryseobacterium balustinum* FS33, *Bacillus sphaericus* BS6 ve BS7 ile 4 fungus izolatu afidler üzerinde potansiyel biyoajan (%10 dan fazla ölüm) olarak etkili bulunmuştur.



Şekil 3.10 Laboratuvar ortamında plastik kutular içinde bitki yaprakları üzerinde beslenen beyazsinek, k.örümcek ve afit populasyonları üzerine potansiyel biyoajan bakteri ve fungus izolatlarının inokulasyonu



Şekil 3.11 Laboratuvar koşullarında plastik kutular içerisinde potansiyel biyoajan bakteriler ile test edilen afit örneklerinin stereo mikroskop görüntüleri

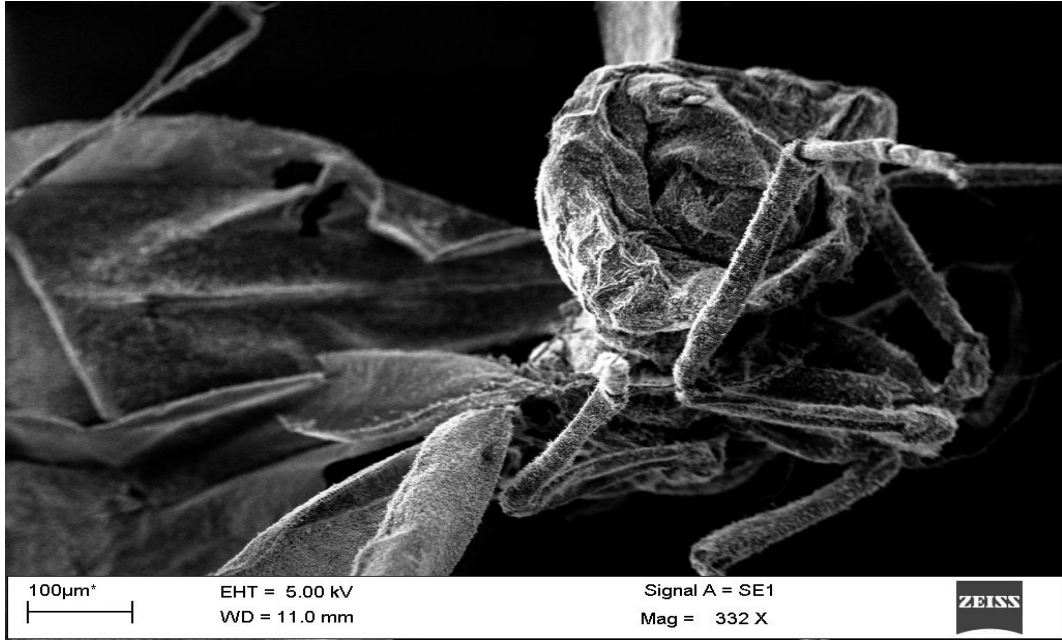


Şekil 3.12 Biyoaktivite testlerinde etkili bulunan fungus izolatlarının enfekteli afit örnekleri üzerindeki steromikroskop görüntüleri

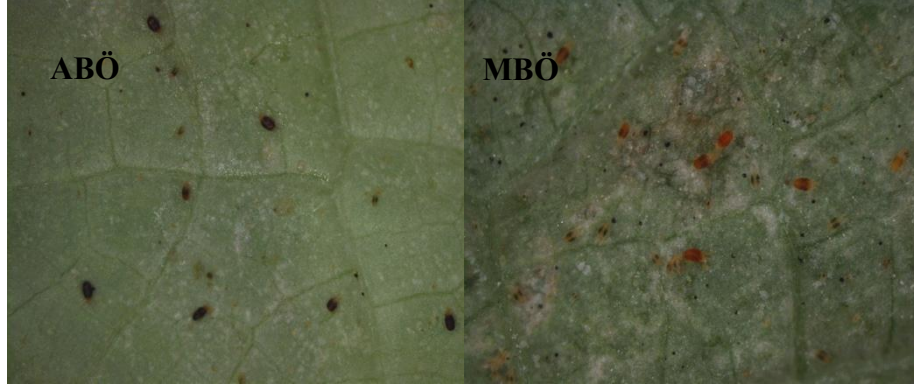


Şekil 3.13 *Chryseobacterium balustinum* FS33 uygulamasından önce (üst) ve sonraki (alt) beyazsinek ve kırmızı örümcek örneklerinin steromikroskop görüntüleri

Kırmızı örümceklere karşı hazırlanan bakteri solüsyonlarından *Chryseobacterium balustinum* FS33, *Bacillus pumilus* (MY51), *Salmonella choleraesuis* (MY19), *Stenotrophomonas maltophilia* (FS227), *Bacillus sphaericus* (BS6) ve *Bacillus sphaericus* (BS7) suşları laboratuvar koşullarında etkili bulunmuştur. Özellikle *Chryseobacterium balustinum* FS33 hem kırmızı örümceklere hem beyazsineklere karşı etkinlik göstermiştir. Şekil 3.13 ve 3.14’ de zararlılar üzerindeki ölümcül etkileri açıkça görülmektedir.

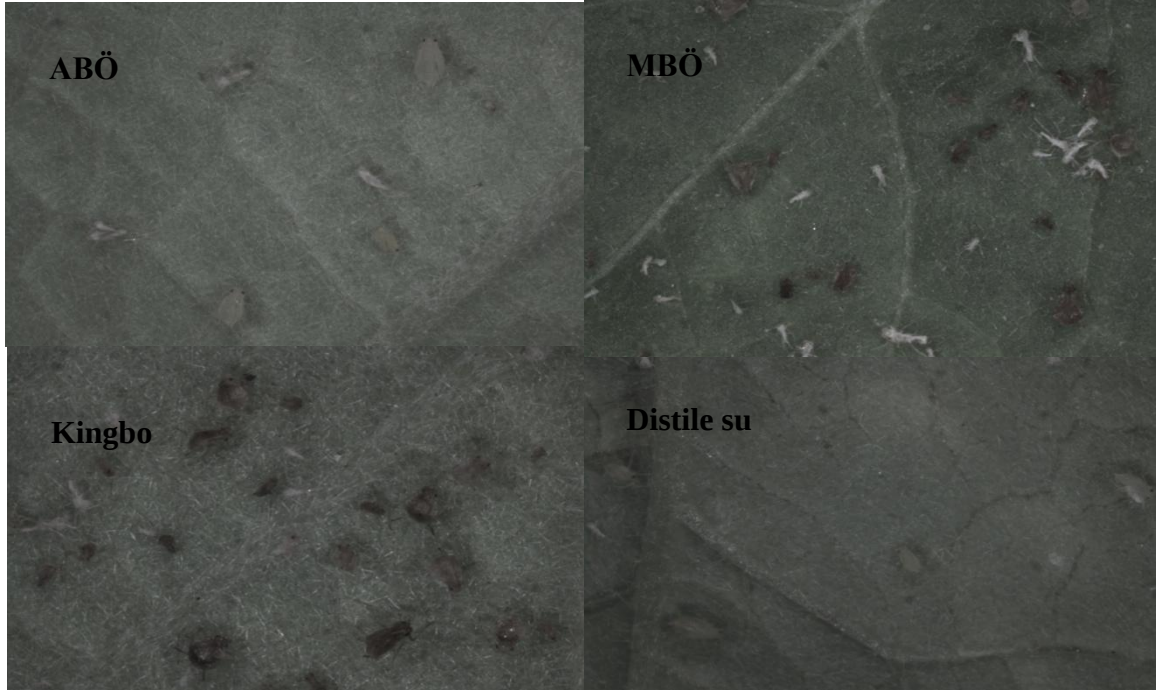


Şekil 3.14 *Chryseobacterium balustinum* FS33 uygulamasından sonraki ölen beyazsinek ve kırmızı örümcek örneklerinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri



Şekil 3.15 ABÖ: aseton bitki özütü ile MBÖ: metanol bitki özütünün konukçu hıyar yaprağı üzerinde bulunan kırmızı örümceklere karşı spray edildikten 24 saat sonra alınan görüntüleri

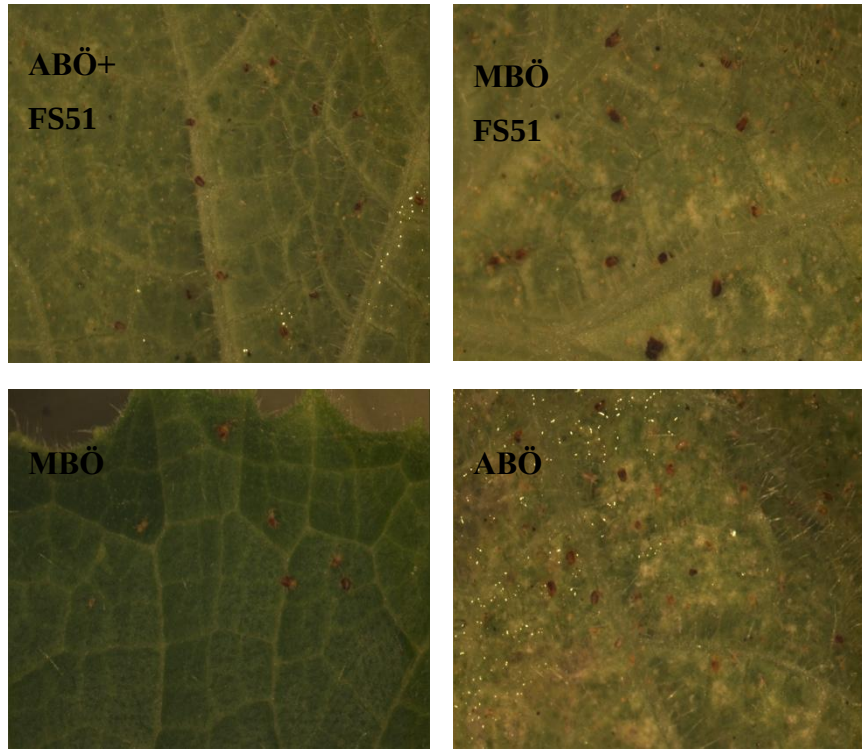
Bitki özütleri ile yapılan laboratuvar testlerinde kırmızı örümceklere karşı aseton bitki özütünün etkili olduğu belirlendi. Çözücü seçimi bitki özütünden elde edilen bileşiklere yansıdığı için hedefte seçicilik görüldü. Metanol ile edle edilen bitki özütleri kırmızı örümceklere karşı etkin değil iken afitlere karşı etkinlik gösterdi. Şekil 3.16'da afitlere karşı test edilen bitki özütlerinin etkinlikleri görülmektedir.



Şekil 3.16 ABÖ: aseton bitki özütü ile MBÖ: metanol bitki özütünün konukçu hıyar yaprağı üzerinde bulunan afitlere karşı spray edildikten 24 saat sonra alınan görüntüleri

Kırmızı örümceklere karşı yapılan diğer bir çalışmada ise sera zararlılarına karşı etkileri tespit edilen karışık bitki türlerinden elde edilen aseton ve metanol bitki özütleri (ABÖ ve MBÖ) ile potansiyel biyoajan olduğu belirlenen FS51 izolatu birlikte test edilmiştir (Şekil 3.17). Bu çalışmada pozitif kontrol olarak %1 aseton bitki özütü (ABÖ), %1 metanol bitki özütü (MBÖ) ile %1 Kingbo kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır. Ayrıca bakteri (FS51) ve bitki özütleri (aseton veya metanol)' den 0.5 ml alınarak 99ml distile su içerisinde karıştırılarak elde edilen bakteri ve bitki özütü (aseton veya metanol) kombinasyonu ayrıca yapraklara sprey edilerek test edilmiştir.

Ayrıca, kontrol amaçlı bitki özütlerinin çözücüler olan aseton ve metanol tek başlarına zararlılara karşı test edilmiştir ve hiçbir ölümcül etki gözlenmemiştir. Aşağıda yer alan çizelgede ise laboratuvar koşullarında yapılan biyoaktivite testlerinin sonuçları böcek popülasyonundaki ölüm oranı yüzdesi cinsinden gösterilmektedir.



Şekil 3.17 ABÖ+ FS51: aseton bitki özütü ile FS51 karışımı, MBÖ+ FS51: metanol bitki özütü ile FS51 karışımı, ABÖ: aseton bitki özütü, AMÖ: metanol bitki özütünün konukçu hıyar yaprağı üzerinde bulunan kırmızı örümceklere karşı sprey edildikten 24 saat sonra alınan görüntüleri

Çizelge 3.5 Laboratuvar koşullarında test edilen biyoajan, bitki özütü ve organik biyoinsektisit uygulamalarının hıryar bitkisi üzerindeki konukçu populasyon üzerine etkileri

Uygulamalar	Canlı K.Ö. sayısı (24 sa)	Ölü K.Ö. sayısı (24 sa)	Canlılık yüzdesi %
%1 ABÖ+FS51	5	52	8
%1 MBÖ+FS51	38	22	63
%1 ABÖ	25	46	35
%1 MBÖ	68	8	89
%1 KİNGBO	2	33	5

Elde edilen sonuçlara göre (Çizelge 3.5) aseton bitki özütü (ABÖ) ile FS51 bakteri süspansiyon karışımı kırmızı örümcek popülasyonu üzerinde daha fazla (%92) ölümüne neden olduğu saptanmıştır. Bu uygulamayı aseton bitki özütü (ABÖ), metanol bitki özütü (MBÖ) ile FS51 karışımı, metanol bitki özütü uygulamaları takip etmiştir.

Çizelge 3.6 Potansiyel biyoajan bakteri, fungus izolatları ve bitki özütlerinin laboratuvar koşullarında sera zararlıları üzerine etkileri

Böcek popülasyonundaki ölüm oranı (%)			
Test Edilen Bakteri Suşu veya Fungus izolatı	Beyaz Sinek	Kırmızı Örümcek	Afit
<i>Kluyvera cryocrecens</i> FS11	39	-	-
<i>Kluyvera cryocrecens</i> FS92	61	-	-
<i>Bacillus amyloliquafaciens</i> FS27	17	-	-
<i>Bacillus</i> spp FS51	23	-	25
<i>Enterobacter hormaechei</i> FS167	11	3	-
<i>Photorhabdus luminescens</i> FS59	18	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> FS227	69	7	84
<i>Chryseobacterium balustinum</i> FS33	93	58	23
<i>Microbacterium barkeri</i> FS4	78	37	85
<i>Nesterenkonia halobia</i> FS78	66	21	100
<i>Proteus mirabilis</i> FS43	12	-	-
<i>Shigella boydii</i> FS215	65	18	-
<i>Staphylococcus gallinarum</i> SG1	3	7	90
<i>Bacillus sphaericus</i> BS6	22	-	38
<i>Bacillus sphaericus</i> BS7	4	-	40
<i>Bacillus pumilus</i> MY51	22	-	6
<i>Enterobacter cancerogenus</i> MY34	2	-	8
<i>Pantoea agglomerans</i> MY 23	7	3	2
<i>Salmonella choleraesuis</i> MY19	29	1	3
<i>Acinetobacter genomospecies</i> MY11	-	-	6
<i>Acinetobacter genomospecies</i> MY09	-	-	5
<i>Cladosporium cladosporioides</i> MY1	-	-	100
<i>Penicillium italicum</i> MY3	-	-	100
<i>Cladosporium cladosporioides</i> MY4	-	-	100
<i>Penicillium italicum</i> MY7	-	-	100
Pozitif Kontrol (Kimbo)	100	100	100
Aseton (Karışık Bitki) özütü	-	100	8
Metanol (Karışık Bitki) özütü	-	6	100
Negatif Kontrol (Su)	-	-	-

Sera Testlerinin Sonuçları:

Yeditepe Üniversitesi seralarında ve bitki büyütme kabinlerinde yetiştirilen bitkilerin yaprakları üzerinde beslenen beyaz sinek, k.örümcek ve afit popülasyonları üzerine mikrobiyal inokulumlar (10^8 CFU bakteri/ml veya 10^4 fungus sporu/ml) sprey edilerek uygulandı. Uygulamalarda kullanılan bitkiler Şekil 3.19'da görülmektedir.

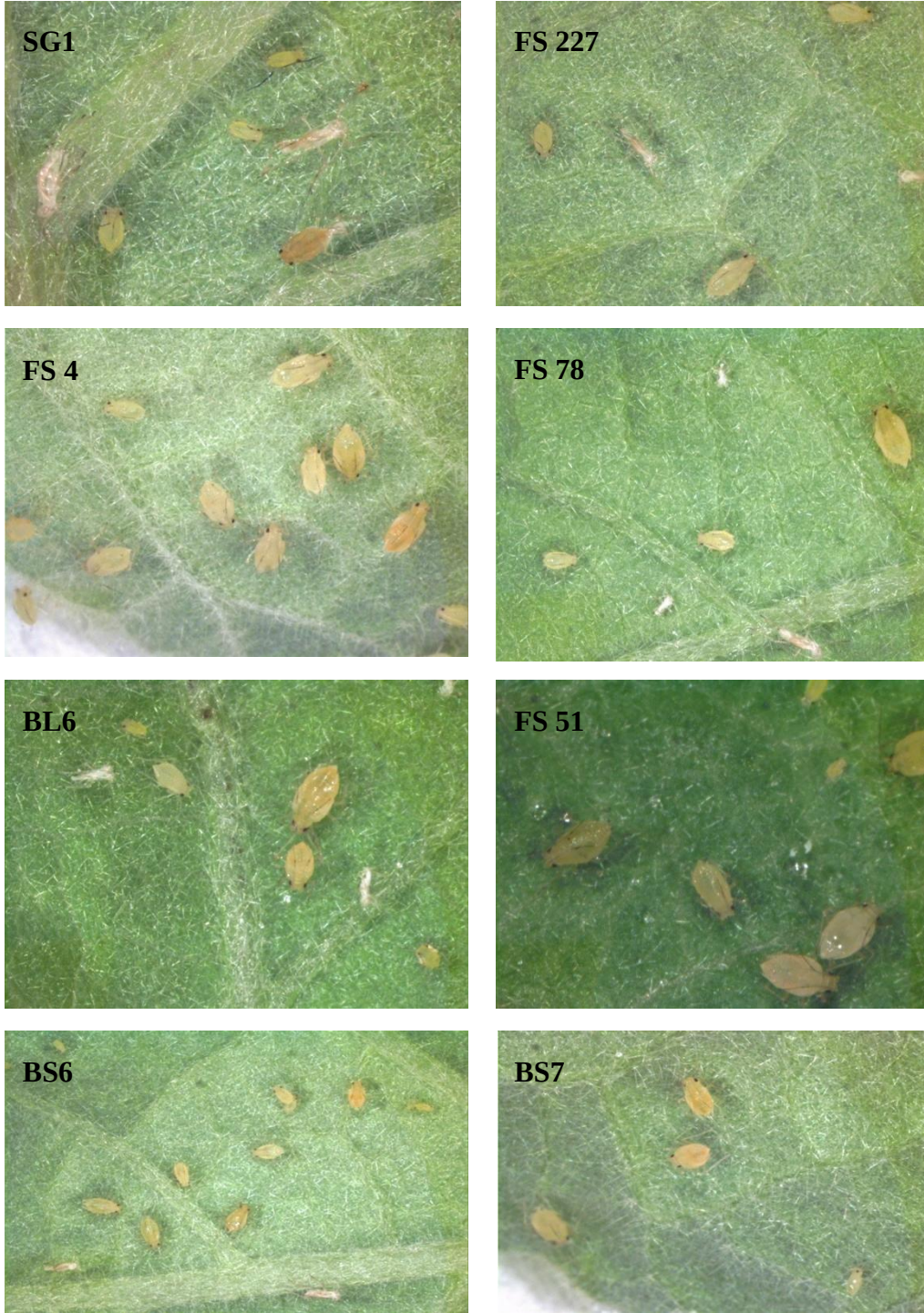


Şekil 3.18 Yeditepe Üniversitesi araştırma seraları



Şekil 3.19 Biyoaktivite testlerinde kullanılan üstte bitki büyütme kabinlerinde ve altta serada biber patlıcan, domates ve hıyar bitkileri

Sera ve bitki büyütme kabinlerinde yapılan biyoaktivite testlerinin sonuçlarına göre daha önceki laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda etkili bulunan *Bacillus* spp. FS51 ve *Bacillus sphaericus* BS6 ve BS7 (Çizelge 3.6; Şekil 3.11) afit popülasyonu üzerinde sırası ile %12, 15 ve 22 oranında ölüme neden olarak etkili olmuşlardır. Şekil 3.20'de yer alan bakterilerin (SG1, BL6, FS 4, FS 78, FS 227) etkinlikleri sadece laboratuvar koşullarında kalmış olup, serada biyolojik aktivite göstermemişlerdir.



Şekil 3.20 Sera koşullarında potansiyel biyoajan bakteriler ile test edilen afit örneklerinin stereo mikroskop görüntüleri

Laboratuvar koşullarında etkili bulunan fungus izolatları (*Cladosporium cladosporioides* MY1, MY4 ve *Penicillium italicum* var. *italicum* MY3, MY7) sera koşullarında da afitlere karşı %100 oranında etkili bulunmuştur (Şekil 3.21). Bunun nedeni; nemin yeteri kadar olması ve fungusların zararlı böcekler üzerinde epidemi oluşturmaya olanak sağlamasıdır.



Şekil 3.21 Biyoaktivite testlerinde etkili bulunan fungus izolatlarının enfekteli afıt örnekleri üzerindeki steromikroskop görüntüleri

Arazi Testlerinin Sonuçları:

2010 yılında tarla koşullarında Adana'da YALTIR A.Ş. organik çilek üretim alanları ve Antalya Kumluca'da Makro Tarım A.Ş. hıyar üretim seralarında kırmızı örümcek popülasyonu üzerinde uygulamalar yapılmıştır. Diğer zararlı popülasyonları bulunmadığı için onlara karşı arazi denemeleri yapılmadı. Çalışmalarda *Bacillus* spp. FS51 *Bacillus sphaericus* BS6, BS7, fungus izolatları (*Cladosporium cladosporioides* MY1, MY4 ve *Penicillium italicum* var. *italicum* MY3, MY7) ve bitki özütlerinin kırmızı örümceklere karşı etkinlikleri araştırıldı. Uygulama sonuçlarına göre bakteri, fungus ve bitki özütleri başarılı bulunmadı. Sadece Pozitif kontrol Kingbo %100 oranında başarılı olmuştur. Bu sonuçlar laboratuvar ve seralarda yapılan uygulama sonuçları ile uyumludur.



Şekil 3.22 Adana'da YALTIR A.Ş. organik çilek üretim alanlarında yapılan çalışma

3.4 Potansiyel Biyoajanların Sivrisinek Larvaları Üzerine Etkinliklerinin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında izole edilen *Bacillus sphaericus* suşları (FS 51, BS 6, BS 7) *Culex* sp. cinsi sivrisinek larvalarına karşı laboratuvar ortamında test edilmiştir. Yapılan testlerde bilinen *B. sphaericus* bakterisi pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her deneme 3 tekrarlı olarak yapıldı (Şekil 3.23 ve 3.24).



Şekil 3.23 Sivrisinek larvalarına karşı mikrobiyal formülasyonların laboratuvar koşullarında test edilmesi

Çizelge 3.7 Temiz ve kirli su ortamında FS 51, BS 6, BS7 ve *B.sphaericus* (Ref), suşlarının *Culex* sp. larvalarına etkisi

Test Edilen Bakteri Suşu	Ölü Larva Yüzdesi (<i>Culex</i> sp.) 100 larva/500 mL su		
	Kirli Su		Temiz Su
	24 saat	48 saat	24 saat
<i>B.sphaericus</i> (0.5 ml/ L)	90	96	100
FS51 (0.5 ml/ L)	94	96	100
BS6 (0.5 ml/ L)	93	97	100
BS7 (0.5 ml/ L)	91	98	100

İzole edilen suşların hem kirli su denilen organik maddece zengin su hem de temiz su ortamında etkinlikleri test edilmiştir. Yukarıdaki çizelgedeki sonuçlara göre 24 saat sonunda her üç bakteride (FS 51, BS 6, BS 7) temiz suda %100'e ulaşan bir başarı göstermiştir. Kirli suda ise ilk 24 saat sonunda %90'ın üzerinde etkili olmuşlardır. Buradaki mekanizmada larva beslenme sırasında *B. sphaericus*'u yapısına alır. Sonra *B. sphaericus* toksinlerinin larva içinde aktif hale geçmesiyle larvayı öldürür. Bakteriler ile uygulama yapıldıktan sonra ölen *Culex* sp. larvasının taramalı elektron mikroskop görüntüsü ise Şekil 5'te yer almaktadır. Larvanın özellikle boyun bölgesinde lokalize olmuş *B.sphaericus* suşu açıkça görülmektedir.



Şekil 3.24 Sivrisinek larvaları üzerinde mikrobiyal formülasyonların larvasit etkisinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri

3.5 Sera Zararlıları Üzerinde Etkinliği Belirlenen Potansiyel Biyoajan Mikroorganizmaların Toksisitelerinin Araştırılması

FS 51, BS6 ve BS7 için yapılan toksikoloji çalışması oluşturulan gruplar aşağıda yer almaktadır. Toksikoloji çalışmaları boyunca bütün deney hayvanlarının her hafta kilo ve su tüketim kontrolleri yapılmıştır.

Grup1 (Kontrol): Normal su ve yem tüketimi. n=7

Grup 2 (BS6 Bir defalık yüksek doz tedavi grubu): sıçanlar 30 gün boyunca 2.5×10^6 bakteri/ml/su ile beslendi. n=5

Grup 3 (BS7 Bir defalık yüksek doz tedavi grubu): sıçanlar 30 gün boyunca 0.5×10^6 bakteri/ml/su ile beslendi. n=5

Grup 4 (BS6 Tekrarlayan yüksek doz tedavi grubu): sıçanlar 30 gün boyunca 0.1×10^6 bakteri/ml su ile beslendi. n=5

Grup 5 (BS6 Tekrarlayan düşük doz tedavi grubu): sıçanlar 30 gün boyunca 2.5×10^6 bakteri/ml/su ile beslendi. n=5

Grup 6 (BS7 Tekrarlayan yüksek doz tedavi grubu): sıçanlar 30 gün boyunca 0.5×10^6 bakteri/ml/su ile beslendi. n=5

Grup 7 (BS7 Tekrarlayan düşük doz tedavi grubu): sıçanlar 30 gün boyunca 0.1×10^6 bakteri/ml su ile beslendi. n=5

Kan Değerleri Analizleri:

Bu analizde bakılan değerler şunlardır;

- * HCT – Hematokrit: kandaki kırmızı kan hücrelerinin yoğunluğu hakkında bilgi verir.
- * HGB: Hemoglobin
- * RBC - Red Blood Cell (Eritrosit): Oksijen taşıyan kırmızı kan hücreleri hakkında bilgi sağlar
- * WBC - White Blood Cell (Lökosit): Enfeksiyonlarla savaşmaya yardım eden beyaz kan hücreleri hakkında öngörü sağlar.

- * NEUT: Nötrofil oranı
- * LYMPH: Lenfosit oranı
- * MONO: Monosit
- * EO: Eozinofil
- * BASO: Bazofil
- * PLT: Trombosit

Çizelge 3.8 Kan değerleri

	HCT	HGB	RBC	WBC	NEUT	LYMPH	MONO	EO	BASO	PLT
	%	g/dL	10 ⁶ /uL	10 ³ /uL	10 ³ /uL	10 ³ /uL	10 ³ /uL	10 ³ /uL	10 ³ /uL	10 ³ /uL
Kontrol	45,0±1,0	16,1±0,6	8,5±0,6	8,8±1,0	1,5±0,6	6,6±1,6	0,5±0,0	0,2±0,1	0,1±0,1	749,0±142,3
Yüksek Doz	44,9±1,4	15,9±0,5	8,3±0,3	7,0±0,9	1,0±0,2	5,5±1,1	0,3±0,1	0,1±0,0	0,0±0,0	702,5±76,5
Orta Doz	46,2±2,1	16,1±0,6	8,8±0,2	8,0±1,5	1,2±0,5	6,4±1,0	0,2±0,2	0,1±0,0	0,0±0,1	613,3±133,4
Düşük Doz	45,5±1,9	15,9±0,8	8,3±0,4	8,6±1,0	1,2±0,3	6,5±0,3	0,5±0,2	0,1±0,0	0,0±0,0	502,0±142,3

4 haftalık FS51, BS6 ve BS7 ile tedavi sonrası değerlendirilen kan değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılıkla karşılaşılmadı. FS51, BS6 ve BS7 izolatlarının toksik etkilerinin araştırılması sonrasında elde ettiğimiz verilerin One way ANOVA'yı takiben Tukey ve Scheffe testleri ile yaptığımız istatistiksel karşılaştırmalar gruplar arasında anlamlı bir etki olmadığını göstermiştir.

Karaciğer Enzim Analizleri:

Bu analizlerde bakılan değerler;

* **ALT:** Alanin Aminotransferaz

Karaciğer fonksiyon testlerinden biridir. Karaciğer hastalıkları, kas zedelenmeleri, akut ve böbrek yetmezliği gibi durumlarda ALT düzeyi artar.

* **AST:** Aspartat Aminotransferaz

Bütün vücut dokularında bulunmakla beraber, karaciğer, kalp ve iskelet kası en çok bulunduğu dokulardır. Herhangi bir nedene bağlı olarak karaciğer hücre zedelenmesi veya hasarı, kalp ve iskelet kası travması, kalp yetmezliği ve ağır egzersiz gibi durumlarda miktarı artar.

* **GGT:** Gama Glutamil Transferaz

Karaciğer fonksiyon testlerinden biridir. Alkol ve ilaçların karaciğer üzerine toksik etkisini takip etmede kullanılır.

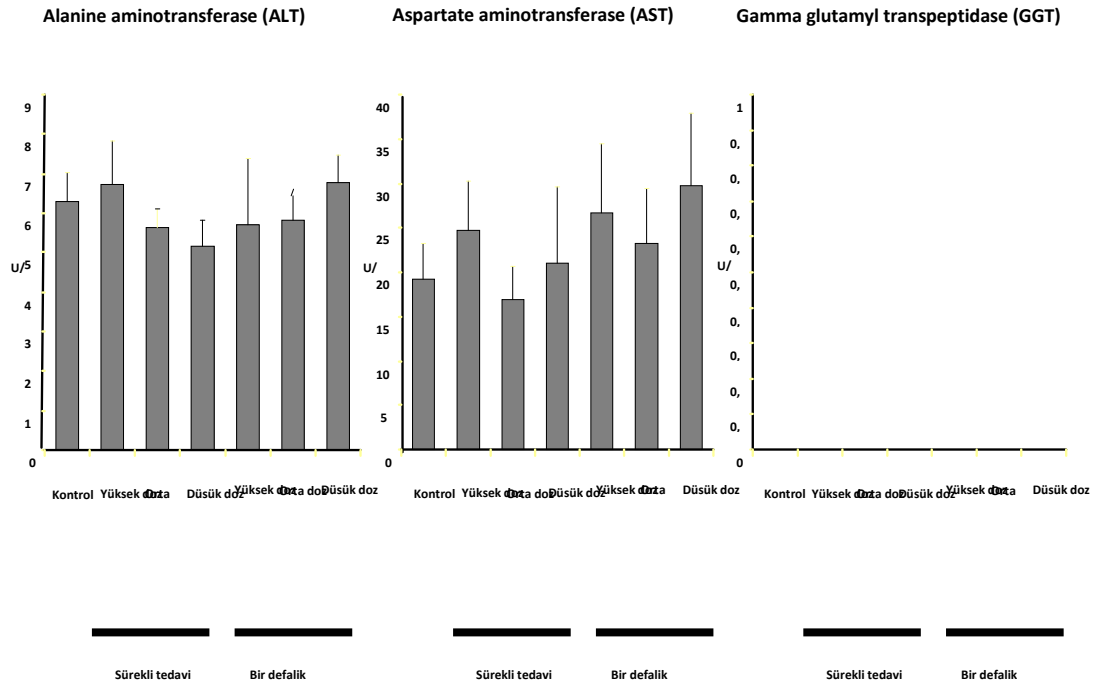
Çizelge 3.9 FS 51 Karaciğer enzim analizleri

	ALT (U/L)	AST(U/L)	GGT(U/L)
Kontrol (n=7)	97,1±20	228,1±36	0±0
G2 (n=5)	90,6±14	301±67	0±0
G3 (n=5)	87,6±14	234,6±62	0±0
G4 (n=5)	92±11	291,6±40	0±0
G5 (n=5)	79,6±12	236±26	0±0
G6 (n=5)	91,8±9	263,8±36	0±0
G7 (n=5)	101±25	268±99	0±0

Çizelge 3.10 BS6 ve BS7 suşlarının karaciğer enzim analizleri

G1	ALT (U/L)	AST(U/L)	GGT(U/L)
Kontrol-1	132	290	0
Kontrol-2	111	259	0
Kontrol-3	110	239	0
Kontrol-4	80	204	0
Kontrol-5	78	205	0
Kontrol-6	89	213	0
Kontrol-7	80	187	0
MBI6-Tek-Yüksek-G2			
1	105	223	0
2	106	408	0
3	88	305	0
4	80	271	0
5	74	298	0
MBI7-Tek-Yüksek-G3			
1	79	173	0
2	76	251	0
3	86	307	0
4	112	275	0
5	85	167	0
MBI6-Sürekli-Yüksek-G4			
1	95	234	0
2	104	333	0
3	79	267	0
4	81	304	0
5	101	320	0
MBI6-Sürekli-Düşük-G5			
1	61	216	0
2	81	215	0
3	75	220	0
4	91	272	0
5	90	257	0
MBI7-Sürekli-Yüksek-G6			
1	89	181	0
2	95	264	0
3	114	262	0
4	98	212	0
5	99	210	0
MBI7-Sürekli-Düşük-G7			
1	88	227	0
2	96	283	0
3	146	434	0
4	91	190	0
5	84	206	0

Çizelge 3.11 FS51 Karaciğer enzim analizleri



4 haftalık FS51 tedavisi sonrası enzimler açısından yapılan istatistiksel analizler her hangi bir anlamlı bulgu göstermemiştir.

FS 51, BS6 ve BS7 izolatlarının karaciğer enzimlerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görüldü.

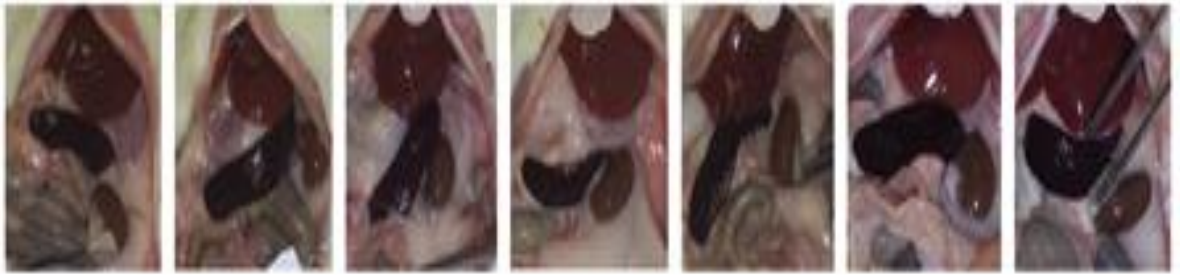
Yangı Hücre Analizleri:

Kan lökosit değerlerinin karşılaştırması gruplar arasında anlamlı bir fark göstermemiştir (ANOVA; Tukey, Scheffe).

Çizelge 3.12 Kan lökosit değerleri

	Kontrol	G2	G3	G4	G5	G6	G7
RBC	7,5±0,6	7,9±0,4	7,6±0,4	8,6±0,3	8,6±0,4	8,2±0,1	7,7±0,5
WBC	8,6±3	7,5±2	11,5±1	11,3±3	9,7±2	11,3±2	11,5±2

FS51, BS6 ve BS7 İzolatlarının Patoloji Sonuçları:



Şekil 3.25 Wistar sıçanlar üzerinde test edilen *Bacillus* spp. FS51 ve *Bacillus sphaericus* BS6 ve BS7 suşlarının karaciğer, dalak, akciğer, böbrek, mide ve bağırsak dokularındaki patoloji sonuçları (Soldan sağa doğru Grup 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Glomerulit, yangı ve ödem açısından böbrek dokusu değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Yangı, nekroz, fibrozis ve kupfer hücre çoğalması açısından karaciğer dokusu değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Reaktif foliküler hiperplazi, kırmızı pulpada nötrofiller, ekstramedüller hemopoez, hemosidrin birikimi, fibrozis, perisplenitis, sinüs dilatasyonu ve hiperemisi açısından dalak dokusu değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir.

Villus paterni, Yüzey epiteli, Ülserasyon, İltihabi infiltrasyon, Lenfoid agregat/folikül ve Ödem açısından ince bağırsak dokusu değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Ülserasyon, Epitelde regenerasyon, İltihabi infiltrasyon, Lenfoid agregat/folikül, Ödem ve Hiperemi açısından ince mide dokusu değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlara göre test edilen her üç biyoajan (FS51, BS6 ve BS7) bakterilerin sıcakkanlı canlılar üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmayacağına karar verilmiştir.

3.6 Sera Zararlıları ve Sivrisinek Larvaları Üzerinde Etkinliği Belirlenen Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Ticari Formülasyonlarının Geliştirilmesi

Çalışma sonucunda FS51, BS6 ve BS7 kodlu *Bacillus* spp. suşlarının ticari formülasyonları geliştirilmiştir. Bu amaçla; efervesan granül hazırlama tekniği ile liyofilize bakteriler ve taşıyıcı sistemin biraraya getirilmesiyle biyopestisit yapılmıştır. Geliştirilen formülasyon ile spor veya endotoksin elde etme aşamasına gerek kalmadan, bakteriler direkt formülle karıştırılarak ürün haline gelmektedir. Tek kullanımlık şase şeklinde tasarlanan ürün bu şekliyle ticari açıdanda kullanım kolaylığı sağlayacaktır. Aynı zamanda ürün stabilitesi içinde şase formu avantaj teşkil etmektedir. Formülasyonda minimum yardımcı madde kullanımına özen gösterilmiştir. Formülasyon ekonomik olup, yine uygun ve ekonomik ambalajlama tekniği (şase) kullanılmıştır.

Formülasyonun İçeriği:

Biyopestisit ve süt karıştırılarak bir süspansiyon elde edilmektedir (Şekil 3.20). Karıştırma işleminde mikroorganizma ile sütün karıştırılma oranı 1:5–1:1000 a/a şeklindedir. Elde edilen mikroorganizma ve süt karışımına liyofilizasyon işlemi uygulanmaktadır. Liyofilizasyon, maddenin kurutulması için süblimasyon adı verilen bir süreçten faydalanan özel bir kurutma ve koruma tekniğidir. Donmuş maddelerin içindeki suyun düşük atmosferik basınçta, su buharı halinde maddenin içinden çıkmasına süblimasyon denir. Liyofilizasyon tekniğinde ürünlerin içinde bulunan su kurutma işleminin en başında dondurulur ve halen daha bu durumdayken, süblimasyon yoluyla ürünün içinden çekilerek alınır. Sıvı aşamanın atlanması maddelerin, kuru olarak korunurken, moleküler veya hücre yapısı düzeyinde yarıma benzeri değişikliklere veya çözülme görüntülerine yol açmaz. Liyofilizasyon yöntemiyle maddelerin iç ve dış yapısı bozulmaz, özel koşullar gerektirmeyen depolama kolaylıklarıyla, neredeyse en baştaki hallerini korumaları sağlanır. Efervesan granül hazırlanması için sitrik asit (susuz veya bir kristal suyu içeren) ile sodyum bikarbonat veya sodyum karbonat birbirleriyle karıştırılıp, bir miktar su ile aglomere edilir. Bu efervesan granül oluşumu için 1 mol sitrik asit ile 3 mol sodyum bikarbonat veya 2 mol sitrik asit ile 3 mol sodyum karbonat karıştırılmaktadır. Süt içerisinde liyofilize edilmiş mikroorganizma, efervesan granül oranı 1:1 den veya 1:10 (a/a) arasında olmaktadır.



Şekil 3.26 Efervesan granüller ve liyofilize edilen bakteri ile süt karışımının eklenmesiyle elde edilen ürün

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda Antalya, Muğla, Bursa ve Yalova illerindeki seralarda yetiştirilen hıyar, domates, biber ve patlıcan bitkileri üzerinde yapılan çalışmalar sonrasında 236 bakteri ve 46 fungal izolat (toplam 282 mikroorganizma) elde edilmiştir. Elde edilen mikroorganizmaların konvensiyonel testler, MIS, BIOLOG ve Baz Dizi analiz yöntemleri kullanılarak tanıları yapılmıştır. Biyoaktivite testlerinde sera zararlılarından Aleyrodidae (beyazsinekler), Aphididae (afitler) ve Tetranychidae (akarlar) türlerine mensup zararlılara karşı çalışmalar yapılmıştır. İzole edilen ve tanımlanan 282 mikroorganizmadan laboratuvarında yapılan biyoaktivite testleri sonuçlarına göre *Stenotrophomonas maltophilia* FS227, *Nesterkonia halobia* FS78, *Staphylococcus gallinarum* SG1, *Chryseobacterium balustinum* FS33, *Bacillus* spp. FS51, *Bacillus sphaericus* BS6 ve BS7, *Cladosporium cladosporioides* MY1 ve MY4 ile *Penicillium italicum* var. *italicum* MY3 ve MY7 izolatları potansiyel biyoajan olarak seçilmiştir. Bu çalışmada tanımlanan ve sera zararlılarına karşı etkili biyoajan olduğu belirlenen bakteri ve fungus tür/suş/izolatları daha önce rapor edilen ve ticari olarak üretilen biyoinektisitler arasında yer almamaktadır. Beyazsineklere karşı *Bacillus pumilus* (MY51), *Salmonella choleraesuis* (MY19), *Stenotrophomonas maltophilia* (FS227) ve *Chryseobacterium balustinum* (FS33) bakteri solüsyonları ile petri kapları içerisinde yapılan çalışmalarda her ne kadar iyi sonuçlar alınmışsa da serada yapılan testlerde biyoajan olarak başarılı bulunmamıştır. Yaprakbitlerine (afitler) karşı laboratuvarında yapılan çalışmalarda izole edilen suşlardan *Bacillus* spp. FS51, *Stenotrophomonas maltophilia* FS227, *Nesterkonia halobia* FS78, *Staphylococcus gallinarum* SG1, *Chryseobacterium balustinum* FS33, *Bacillus sphaericus* BS6 ve BS7 ve *Cladosporium cladosporioides* ile *Penicillium italicum* var. *italicum* potansiyel biyoajan (%10'dan fazla ölüm) olarak etkili bulunmuştur.

Ancak seçilen bakteriyel biyoajanlardan sadece *Bacillus* spp. FS51, *Bacillus sphaericus* BS6 ve BS7, ve fungal biyoajanlardan ise *Cladosporium cladosporioides* MY1 ve MY4 ile *Penicillium italicum* var. *italicum* MY3 ve MY7 izolatları afit popülasyonları üzerinde sera koşullarında da etkili bulunmuştur. Kırmızı örümcek popülasyonuna karşı laboratuvar koşullarında yapılan petri denemelerinde oldukça etkili bulunan *Chrysobacterium balustinum* (FS33), *Bacillus sphaericus* BS6 ve *Bacillus sphaericus* BS7 suşları ise sera koşullarında biyoajan aktivitesi gösterememiştir. Bu durum daha önce birçok bilimsel çalışmada görülmüş ve çevresel parametrelerin (özellikle 52 nisbi nem) bakterilerin kolonizasyonu üzerine olan etkileri ile açıklanmıştır [17, 54 ve 55]. Bu çalışmada aynı zamanda test edilen karışık bitki özütünün (*Urticadioica*, *Lavandula angustifolia*, *Satureja hortensis*, *Ocimum basilicum*, *Nigella sativa*, *Syzygium aromaticum*, *Artemisia absinthium*) aseton ile elde edilen özütü kırmızı örümcek popülasyonu üzerinde % 89 etkili olurken, beyazsinek ve afit popülasyonları üzerinde ise önemli bir etki gösterememiştir. Metanol ile elde edilen bitki özütü ise afit popülasyonu üzerinde % 91 oranında etkili olup, beyazsinek ve kırmızı örümcek popülasyonları üzerinde aynı şekilde önemli bir etki görülmediği saptanmıştır. Bu durum gösteriyor ki; yukarıda listesi verilen karışık bitki özütlerinin üretim yönteminde kullanılan çözücü ile böcek türleri üzerinde farklı etkiler görülmüştür. Bitki özütlerinin farklı çözücülerden elde edildiğinde farklı etkinlikler gösterdikleri daha önce literatürde de rapor edilmiştir [55, 56 ve 57]. Ayrıca bitki özütleri ile *Bacillus* spp. (FS51) karışımının laboratuvar koşullarında kırmızı örümceklere karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Bu konu üzerinde daha kapsamlı araştırma yapılarak, bu karışık bitki özütünün bakterilerle birlikte veya kendi başına sera zararlıları üzerine kullanılma olanaklarının gelecekte araştırılması gerekmektedir. Çalışma kapsamında izole edilen *Bacillus sphaericus* suşları ayrıca sivrisinek (*Culex* sp.) larvalarına karşı test edilmiş ve larvasit özelliğinin olduğu kanıtlanmıştır. *Bacillus sphaericus*'un sivrisinek larvalarına karşı etkili olduğu daha önce yapılan bilimsel çalışmalar ile rapor edilmiştir [58 ve 59]. Laboratuvar ve sera koşullarında iyi bir biyoinsektisit özelliği gösteren *Bacillus* spp. FS51 ile biyoinsektisit özelliği yanısıra larvasit özelliği tespit edilen *Bacillus sphaericus* suşlarının (BS6 ve BS7) toksikoloji çalışmaları yapılmıştır.

Kan değerleri, karaciğer enzim analizleri ve histoloji sonuçlarına göre test edilen her  biyoajan (FS51, BS6 ve BS7) bakterinin wistar sıçanlar üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmayacağı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda toksik etkisi olmayan FS51, BS6 ve BS7 kodlu *Bacillus* spp. suşlarının ticari formülasyonları geliştirilmiştir. Formülasyon; efervesan granül hazırlama tekniği ile liyofilize edilmiş bakteriler ve taşıyıcı sistemin biraraya getirilmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonun biyoinsektisit ve larvasit özelliği olan bakteriler için uygun olduğu düşünülmektedir. Bu alışma kapsamında sera koşullarında etkili bulunan bakteri suşları ve bitki özütlerinin ticari olarak hayata geçirilmesi için tekli ve kombinasyonlar halinde ülkemizin farklı bölgelerinde, değişik iklim ve toprak şartlarına sahip daha fazla sera ve tarla koşullarında test edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

-
- [1] Agrios, G. N., (1997). "Plant Pathology. Department of Plant Pathology", University of Florida, Academic Press, 635.
 - [2] Şahin, F., (1997), Dedection, Identification and Characterization of Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by Traditional and Molecular Methods, and Resistance in Capsicum Species to *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, Pepper Race 6. The Ohio State University.
 - [3] Lenteren, van, J. C., (1995). "Integreted pest management in protecteddd crops", D. Dent (ed.) Integrated Pest Management, 311-343 Chapman & Hall, London.
 - [4] Rabasse, J. M. ve van M. J. Steenis, (1999). "Biological Control of Aphids", In: Integrated Pest and Disease Manegement in Greenhouse Crops, 16:235-243.
 - [5] Aslan, I., Coruh, S., Ozbek, H., Yaman, M., ve Sahin, F, (2005). "Brevibacillus agri, a pathogenicbacterium of Malacosoma neustria (Lepidoptera: Lasiocampidae)" Fresenius Enviromental Bulletin, 14: 98-100
 - [6] Eşitken, A., Karlıdağ, H., Erçişli, S. ve Şahin, F. (2002). "Effects of foliar application of *Bacillus* OSU-142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (Coryneum blight) of Apricot. Gartenbauwissenschaft", 67 (4): 139-142.
 - [7] Şahin F., Çakmakcı, R., ve Kantar, F., (2004). "Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N2-fixing and phosphate solubilizing bacteria", Plant and Soil. 265:123-129.
 - [8] Yaman, M., Aslan, İ., Çalmaşur, Ö. ve Şahin, F., (2005). "Two bacterial pathogens of *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)", Proc. Entomol. Soc. Wash., 107 (3): 623-626.
 - [9] Hanan, J. J., W. D. Holley, ve K. L. Goldseberry (1978). "Greenhouse management, springerverlag", In: Integrated pest and Disease manegement in greenhouse Crops.,1, 1-15, Berlin.
 - [10] Gerling, D., (1990). "Whiteflies: Thier Bionomics, pest Status and Management", Intercept Ltd., Andover, Hants.
 - [11] Lacey, L.A., J. J. Fransen ve R. Carruthers, (1996). "Global distribütion of naturally occuring fungi of Bemisia, their biology and use as biological control agents", In: D. Gerling and R.T.
 - [12] Yıldırım, E., (2000). "Tarımsal Zararlılarla Mücadele ve Kullanılan Yöntemler", Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları No:219, 344.

- [13] Cebello, T. ve R. Canero, (1994). "Technical efficiency of plant protection in Spanish greenhouses", Crop Protection, 13, 153-159.
- [14] Helyer, N. L. ve L. W. Wardlow, (1987). "Aphid control on chrysanthemum using frequent, low dose application of *Verticillium lecanii*", IOBC/WPRS Bulten 10(2), 62-65.
- [15] Erkıılıç, L., H. Pala, N. Başıınar ve Y. Biçer, (1999). "Doğu Akdeniz Bölgesi'nde bazı yaprakbiti türlerinde entomopatojen fungusların belirlenmesi", Türkiye 4. Biyolojik Mücadele Kongresi 26-29 Ocak 1999, 623-632, Adana.
- [16] Griffiths, D.A. ve J. Starzewski, (2000). A review of the species complex surrounding *Tetranychus urticae* Koch and *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval)", In: Integrated Pest and Disease Manegement in Greenhouse Crops.,15, 217-234.
- [17] Federıcı, B.A., (2009). "Biological Control of Insect Pests, Encyclopedia of Insects (Second Edition)", 91-101.
- [18] Driesche, R. G. ve Bellows, T. S. (1996). "Biological Control", Chapman & Hall, 539.
- [19] Gültekin, L., Ş. Güçlü, R. Hayat ve G. Tozlu, (1998). "Yusufeli (Artvin) ve Uzundere (Erzurum) ilçelerinde seralarında sorun oluşturan zararlılar", 2. Sebze Tarım Sempozyumu, 28-30 Eylül, 330-334,1998, Tokat.
- [20] Kısmalı, Ş., N. Madanlar, Z. Yoldaş ve A. Gül, (1999). "İzmir (Menemen)'de örtü altı çilek yetiştiriciliğinde kırmızı örümceklere karşı avcı akar *Phytoseiulus persimilis* A.-H. (Acarina: Phytoseiidae)'in uygulanma olanakları", Türkiye 4. Biyolojik Mücadele Kongresi, 26-29 Ocak 1999, 201-214, Adana.
- [21] Ulubilir, A. ve Yabaş C., (1996). "Akdeniz Bölgesi'nde örtü altında yetiştirilen sebzelerde görülen zararlı ve yararlı faunanın tespiti", Türk. entomol. derg., 20 (3): 217-228.
- [22] Yoldaş, Z., (1995). "Hıyar seralarında zararlı *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera, Aleyrodidae)'ye karşı biyolojik savaşta *Encarsia formosa* (Gahan) (Hymenoptera, Aphelinidae)'nın etkinliği üzerinde bir araştırma", Türk. entomol. derg., 19 (2): 95-100.
- [23] Yoldaş, Z., N. Madanlar, A. Gül ve E. Onoğur, (1999). "İzmir'de sebze seralarında entegre savaş uygulamaları üzerinde araştırmalar", Türkiye 4. Biyolojik Mücadele Kongresi, 26-29 Ocak 1999, 215-234, Adana.
- [24] Özbek, H., (2000). "Seralarda Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri", Seminer Notları, 2-3 Mart 2000, 36, Erzurum.
- [25] Nalçacıoğlu, R., Katı, H., Demir, İ., Sezen, K., Ertürk, Ö., Demirbağ, Z, (2008). Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele, Trabzon.
- [26] Bora, T. ve Özaktan, H., (1998). Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Mücadele. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Yayınları, 132 -136.
- [27] Aydemir, M., (2001). "Örtü Altı Sebze Yetiştiriciliğinde Entegre Mücadele Teknik Talimatı", Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı, Ankara.

- [28] Bej, A.K., Mahbubani, M. H., ve Atlas, R. M., (1991). "Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications", *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26,301-334.
- [29] Guillerit-Rondeau, C., Malandrin, L. ve Samson, R., (1996). Identification of two serological flagellar types (H1 and H2) in *Pseudomonas syringae* pathovars", *European Journal of Plant Pathology*, 102, 99–104.
- [30] Holmes, B.,Costas,M., Ganner, M., On,S. L.W. ve Stevens, M., (1994). "Evaluation of biolog system for identification of some gram-negative bacteria of clinical importance", *Journal of Clinical Microbiology*, 1970-1975.
- [31] Jackmen, P. J. H., (1985). "Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns", *The Society for Applied Bacteriology*, 415-429.
- [32] Jeng, R. S., Svircev, A. M., Myrs, A.L., Beliaeva, L., Hunter, D. M. ve Hubbes, M., (2001). "The use of 16S and 16S-23S rDNA to easily detect and differentiate common Gram negative orchard epiphytes", *Journal of Microbiological Methods*, 44, 69-77.
- [33] Mclaughlin, T. J.P. Quin A.Bettermann, and R. Bookland (1992). "*Pseudomonas cepada* suppression on sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease", *Appl. Environ. Microbiol.*,58:1760-1765.
- [34] Miller, S. A. And Joaquim, T. R., (1993). "Diagnostic techniques for plant pathogens", *Biotechnology in Plant Disease Control*,17, 321-339.
- [35] Şahin, F., Abbasi, PA., Lewis Ivey, M.L, Zhang, J. and Miller, SA., (2003a). "Diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. vitians from Lettuce Phytopathology", 93: 64-70.
- [36] Van Zyl, E. ve Steyn, P.L., (1990). "Differentiation of phytopathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas* species and pathovars by numerical taxonomy and protein gel electrophoregrams", *Syst. Appl. Microbiol.*,13,60-71.
- [37] Weingart, H. and Völksch, B., (1997). "Genetic Fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC-, REP-, and IS50-PCR", *J. Phytopathology*, 145,339-345.
- [38] Jay, L. G. ve Aaron, J, M., (1991). "Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon- source utilization", *Appl. and Env. Microbiology*, 2351-2359.
- [39] Massomo, S. M. S., Nielsen H., Mabagala R. B., Mansfeld-Giese K., Hockenhull J. And Mortensen C. N., (2003). "Identification and Characterization of *Xanthomonas campestris* pv.*Campestris* Straind from Tanzania by Pathogenicity Tests, Biolog, Rep-PCR and Fatty Acid Analysis", *European Journal of Plant Pathology*, 109, 775-789.
- [40] Şahin, F., Kotan, R., Abbasi, PA. ve Miller, SA. (2003b). "Phenotypic and genotypic characterization of *Xanthomonas campestris* pv. zinniae strains", *European J. Plant Pathol.* 109:165-172.
- [41] Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., ve Swings, J. (1995). "Reclassification of *Xanthomonas*", *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:472-489.

- [42] Abel, K., De Schmertzing, H., ve Peterson, J. I. (1963). "Classification of microorganisms by analysis of Academic&Professional", UK.
- [43] Jarvis, B.D.W., Sivakumaran, S., Tighe, S. W. ve Gillis, M., (1996). "Identification of Agrobacterium and Rhizobium species based on cellular fatty acid composition", Plant and Soil, 184, 143-158.
- [44] Klement, Z., Rudolph, K. and D. C. Sands, (1990). "Methods in Phytopathology. Akademiai Kiado, Budapest.
- [45] Matsumoto, M., Furuya, N., and Matsumaya, N., (1997). "Characterization of Rhizoctonia spp., causal agents of sheath diseases of rice plant, by total cellular fatty acid analysis". Ann. Phtopath. Soc., 63:149-154, Japan.
- [46] Roy, M.A., (1988). "Use of fatty acids for the identification of phytopathogenic bacteria", Plant Dis. 72:460.
- [47] Sasser, M., D. Sands, Z. Klement, ve K. Rudolph, eds (1990). "Identification of bacteria through fatty acid analysis", Methods in Phytobacteriology, 199-204, Akademia Kiado, Budapest.
- [48] Vauterin, L., P. Yang ve Swings, J. (1996). "Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new Xanthomonas species", Int. Journal of Systematic Bacteriology. 298-304.
- [49] Yang, P., Vauterin, L., VanCanneyt, M., Swings, J., ve Kersters, K. (1993). "Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus Xanthomonas", Syst. Appl. Microbiol. 16:47-71.
- [50] Lenteren, van, J. C., (1993). "Lipopolysaccharides, the major antigens of Pseudomonas syringae", Journal of Phytopathology, 137, 157-171,
- [51] Higgins, G. D., Bleasby, J.A., ve Fuchs, (1992), "CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment", Oxford University Press, 8(2), 189-191
- [52] Jimenez, L, Smalls, S. ve Ignar, R., (1999). "Use of PCR analysis for detecting low levels of bacteria and mold contamination in pharmaceutical samples", Journal of Microbiological Methods, 41:3, 259-265
- [53] Kimura, M. ve Maruyama, T., (1980). "Genetic variability and effective population size when local extinction and recolonization, of subpopulations are frequent (population genetics/protein polymorphism/periodic selection/neutral mutation-random drift hypothesis) ", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(11), 6710-6714
- [54] Schoeman, M. W., Webber J. F. ve Dickinson D. J., (1999). "A Perspective on Pathogens as Biological Control Agents for Insect Pests", Handbook of Biological Control, 517- 548.
- [55] Wratten, S.D., Hoddle, M.S., Van Driesche R.G., (2008). "Conservation Biological Control and Biopesticides in Agricultural", Encyclopedia of Ecology, 744-747.
- [56] Broussalis, A.M., Clemente, S., Ferraro, G.E., (2010). "Hybanthus parviflorus (Violaceae): Insecticidal activity of a South American plant", Original Research Article Crop Protection, 29: (9): 953-956.

- [57] Vanichpakorn P. ve Ding, W., Cen, X. (2010). "Insecticidal activity of five Chinese medicinal plants against *Plutella xylostella* L. larvae", *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(3):169-173.
- [58] Park, H.W, Bideshi D.K. ve Federici B.A., (2010). "Properties and applied use of the mosquitocidal bacterium, *Bacillus sphaericus*", *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13: 159-16.
- [59] Singh, G., and Prakash S., (2009). "Efficacy of *Bacillus sphaericus* against larvae of malaria and filarial vectors: an analysis of early resistance detection", *Parasitology Research*, 104:763-766.

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

Prof. Dr. Fikretin Şahin, Y. Ü. Mühendislik Fakültesi
Genetik ve Biyomühendislik Bölümü

İlgi: 08. 08. 2008 tarihli yazınız.

Sorumluluğunu üstlendiğiniz "Sivrisinek ve sera zararlılarına karşı etkili biyosektisit özelliği olan organizmaların belirlenmesi" isimli projenin Etik Kurul İlkelerine uygun olduğu, kurulun 8 Ağustos 2008 tarihli toplantısında onaylanmıştır.

E. Genç
Prof. Dr. Ece Genç
Y.Ü.D.H.E.K Başkanı

Bayram Yılmaz
Prof. Dr. Bayram Yılmaz
Üye

(Katılmadı, izni-li)
Doç. Dr. Işıl Kurnaz
Raportör

(Katılmadı, izni-li)
Sn. Yakup Yılmaz
Üye

(Katılmadı, izni-li)
Prof. Dr. Kemal Şençift
Başkan Yardımcısı

(Katılmadı, izni-li)
Prof. Dr. Erdem Yeşilada
Üye

Sn Arif Sarıkaya
Üye

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Münevver Müge YAZICI
Doğum Tarihi ve Yeri : 16.09.1983 Bursa
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : mugeyazici@yeditepe.edu.tr ; yazicimuge@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2008
Lisans	Biyoloji	Uludağ Üniversitesi	2005
Lise	Fen-Matematik	Bursa Kız Lisesi	2001

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2006-	Yeditepe Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Makale

1. M. Çulha, A. Adiguzel, M. M. Yazıcı, M. Kahraman, F. Şahin, M. Gulluce, "Characterization of Thermophilic Bacteria Using Surface-enhanced Raman Scattering" *Applied Spectroscopy* 62(11), 1226-1232, 2008
2. M. Kahraman, M. M. Yazıcı, F. Şahin, M. Çulha., "Convective-Assembly of Bacteria for Surface-Enhanced Raman Scattering" *Langmuir*, 24(3), 894-901, 2008,
3. M. Kahraman, M. M. Yazıcı, F. Şahin, M.Çulha., "Experimental Parameters Influencing Surface-Enhanced Raman Scattering of Bacteria" *J. of Biomedical Optics*. 12(5), 1-6, 2007.
4. M. Kahraman, M. M. Yazıcı, F. Şahin, Ö. F. Bayrak. E. Topçu, M. Çulha., "Towards Single Microorganism Detection Using Surface-Enhanced Spectroscopy" *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, 87(10-11), 763-770, 2007.
5. M. Culha, M. Kahraman, M. M. Yazıcı, F. Şahin., " Utilizing Silver and Nanoparticles for Investigation of bacterial Cell Wall Biochemical Structure" 2007 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech 2007, Technical Proceedings, 2, 538-541, 2007.
6. M. Kahraman, M. M. Yazıcı, F. Şahin, Ö. F. Bayrak, and M. Çulha, "Reproducible Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Bacteria on Aggregated Silver Nanoparticles" *Applied Spectroscopy*, 61(5), 479-485, 2007.

Bildiri (Uluslararası)

1. M. Yazıcı, G. Duman, I. Aslan, A. Durucan, F. Şahin; "The Antifungal Activity of Liposomal Ointment Formulation of Essential Oil of *Satureja hortensis*", European Biotechnology Congress 2011, September 28 - October 1, 2011, İstanbul, (Poster)
2. M. M Yazıcı, G. Boztaş, F. Şahin; " A Novel Method to Control of *Chironomid* Larvae (Diptera: *Chironomidae*) by Using Oxymatrine in Combination with *Bacillus sphaericus* Strains", III. International Entomopathogens and Microbial Control Symposium, 18-22 Eylül 2011, İstanbul, (Oral)
3. M. M Yazıcı, G. Boztaş, F. Şahin; "Biological Control of *Myzus persicae* by Using Medicinal Plants Extract ", 11th IFEH World Congress on Environmental Health and 76th CIPHI Annual Educational Conference, 5-10 September 2010, Vancouver, BC, Canada, (Oral)
4. M. Yazıcı, A. U. Dogan, G. Boztas, E. Kilic, H. Cetin, S. Mennan, F. Şahin; " Three new strains of *Bacillus sphaericus* as potential Biocontrol Agent against Mosquitoes ", 43TH Meeting Society for Invertebrate Pathology (SIP 2010), 11-15 July 2010 Trabzon, (Oral)
5. M. Culha, M. Kahraman, G. Turkoglu, M. M. Yazıcı, E. Sezgin, O. F. Bayrak., "Surface-Enhanced Raman Scattering of Mitochondria for Diagnosis and Disease Progression," The Pittsburgh Conference, New Orleans, March 2-7, 2008 (Oral).

6. M. Kahraman, Ö. Aydın, M. M. Yazıcı, M. Çulha “Laser Wavelength Dependence of Surface-enhanced Raman Scattering Substrates” 4. Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 9-13 Haziran 2008 (Poster).
7. M. M. Yazıcı, M. Kahraman, M. Culha., “Novel SERS Substrate Based on TiO₂ Films Loaded with Silver Nanostructure,” The Pittsburgh Conference, McCormick Place, Chicago, February 25-March 2, 2007 (Oral)
8. M. Kahraman, M. Culha, M. M. Yazıcı., “A Simple and Rapid Method for Identification of Oral Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy,” The Pittsburgh Conference McCormick Place, Chicago, February 25-March 2, 2007 (Oral).
9. M. Culha, M. Kahraman, M. M. Yazıcı, F. Şahin., “Probing Bacteria Cell Wall with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy,” The Pittsburgh Conference, McCormick Place, Chicago, February 25-March 2, 2007 (Oral).
10. M. Kahraman, M. M. Yazıcı, M. Çulha, F. Şahin., “Influence of Nanoparticles Surface Charge and Laser Wavelength on Surface-Enhanced Raman Spectra of Bacteria,” Molecular Biomimetics & BioNanoTechnology Protein-based Materials & Systems for Science & Technology, Maslak, Istanbul, Turkey, November 12-14, 2006. (Poster)
11. M. M. Yazıcı, M. Kahraman, M. Çulha, F. Şahin., “Characterization of Gram Negative and Gram Positive Bacteria by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS).” Molecular Biomimetics & BioNanoTechnology Protein-based Materials & Systems for Science & Technology, Maslak, Istanbul, Turkey, November 12-14, 2006. (Poster)
12. M. Çulha, M. Kahraman, E. Topcu, M. M. Yazıcı, F. Şahin, Ö. F. Bayrak., “Towards Single Microorganism Detection Using Surface-Enhanced Spectroscopy,” The 7th Workshop on Biosensor and Bioanalytical μ -Techniques in Environmental and Clinical Analysis, , Kusadasi, Turkey, September 10-14, 2006. (Poster)

Bildiri (Ulusal)

1. M. M. Yazıcı, H. Çetin, F. Şahin, “ Sivrisinekle Mücadelede Kullanılmak Üzere *Bacillus sphaericus* Suşlarından Geliştirilen Yeni Formülasyon”, II. Ulusal Biyosidal Kongresi, 17- 20 Kasım 2011, Antalya, (Oral)
2. G. Boztaş, M. M. Yazıcı, İ. Hasenekoğlu, F. Şahin; “İki Entomopatojen Fungus İzolatının *Myzus persicae*’ ye Etkileri”, Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, 15-18 Temmuz, 2009, Van (Poster)
3. M. M. Yazıcı, S. Ağuş, F. Şahin. “Sera Zararlılarının Biyolojik Mücadelelerinde Kullanılma Potansiyeli Olan Mikroorganizmalar,”4. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, Atatürk Kültür Merkezi, İzmir, 15-18 Ekim, 2008 (Poster)
4. M. Kahraman, Ö. Aydın, M. M. Yazıcı, M. Çulha “Laser Wavelength Dependence of Surface-enhanced Raman Scattering Substrates” 4. Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 9-13 Haziran 2008 (Poster)
5. M. Çulha, M. Kahraman, M.M. Yazıcı., “Biyolojik Yapıların Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması ile İncelenmesi,” X. Ulusal Spektroskopi Kongresi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Urla, İzmir, 4-7 Temmuz 2007(Oral).

Proje

1. Prof. Dr. Mustafa ÇULHA yürütücülüğünde “Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılmasına dayalı mikroorganizma tanısı için yeni nanoyapılı yüzeylerin geliştirilmesi”TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu, Proje No: 105T135, Bursiyer Araştırmacı M. Müge YAZICI, 2005-2007
2. Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN yürütücülüğünde "Biyoinsektisit özelliği olan mikrobiyal formülasyonların geliştirilmesi, sera ve tarla koşullarında kullanım olanaklarının araştırılması", TÜBİTAK Temel Bilimleri Araştırma Grubu, Proje No: TBAG-U/170 (105T339), Bursiyer Araştırmacı M. Müge YAZICI, 2008-2011.