



***Heterorhabditis bacteriophora* HBH HİBRİT İRKİNİN
IN VITRO KATI KÜLTÜRDE ÜRETİMİNİN
OPTİMİZASYONU**

Tufan Can ULU



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Heterorhabditis bacteriophora* HBH HİBRİT İRKİNİN *IN VITRO* KATI
KÜLTÜRDE ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**

Tufan Can ULU

Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

BURSA-2018
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI


Tufan Can ULU tarafından hazırlanan “*Heterorhabditis bacteriophora* HBH Hibrit Irkının *In Vitro* Katı Kültürde Üretiminin Optimizasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Başkan: Prof. Dr. İ. Alper SUSURLUK
Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Anabilim Dalı

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Uğur GÖZEL
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Anabilim Dalı

İmza: 

Üye: Prof. Dr. O. Barış KOVANCI
Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Anabilim Dalı

İmza: 

Üye: Doç. Dr. Nimet Sema GENÇER
Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Anabilim Dalı

İmza: 

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Derya ŞENAL
Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi
Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Bitki Koruma Anabilim Dalı

İmza: 



Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

..../..../2018

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

05/10/2018



Tufan Can ULU

ÖZET

Doktora Tezi

Heterorhabditis bacteriophora HBH HİBRİT İRKİNİN *IN VITRO* KATI KÜLTÜRDE ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

Tufan Can ULU

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İ. Alper SUSURLUK

Entomopatojen nematodlar (EPN) dünya genelinde yaygın biçimde kullanılan biyolojik mücadele etmenleridir. Nemata şubesinin Rhabditida takımı Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına bağlı olan bu organizmalar toprak altında yaşamakta ve yaşam döngülerinin devamı için bir konukçu böceğe ihtiyaç duymaktadır. Biyolojileri gereği konukçu böceği öldüren ve içerisinde üreyen EPN' ler daha sonra toprağa geçerek yeni konukçu arayışında bulunurlar. Konukçu arama özelliği, klasik alet ve ekipmanlar ile uygulanabilmeleri, doğaya ve insana zararsız olmaları ve 250' den fazla böceğe etkili olmaları gibi olumlu özellikleri sayesinde son yıllarda biyolojik mücadele pazarında kendilerine önemli bir yer edinmişlerdir. Ancak birçok biyolojik mücadele etmeninde olduğu gibi EPN' lerin de önemli olumsuz özelliklerinden biri ticari üretimlerinin pahalı olmasıdır. Bu amaçla uzun yıllardır araştırmalar yapılmakta ve hem doğrudan hem dolaylı yollardan üretim, depolama ve taşıma maliyetlerinin düşürülmesi amaçlanmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalardan birisi de üretim ortamı ve fiziksel bazı ölçütlerin optimize edilmesidir. Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Nematoloji Laboratuvarı' nda 2010-2013 yılları arasında yürütülen bir proje kapsamında üstün özelliklere sahip bir hibrit ırk elde edilmiş ve bu ırka patent alınmıştır. *Heterorhabditis bacteriophora* türüne ait olan HBH hibrit ırkının ülkemize ait olması ve biyo-ekolojik olarak ülkemiz şartlarına adapte olması önemli olarak görülmektedir. Bu amaçla HBH hibrit ırkının *in vitro* katı kültürde üretiminin optimizasyonu ve bu sayede üretim veriminin artırılması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda tez çalışmasında üretim ölçütleri olarak içerisinde ek besin maddeleri bulunan (soya lesitini, yumurta sarısı) farklı ortam içerikleri, sıcaklık (24, 28 ve 32 °C) ve üretim ortamının pH değeri (5, 7 ve 9) kullanılmıştır. Farklı ölçüt değerleri kullanılarak yapılan üretim sonuçları incelendiğinde, hermafrodit yumurta sayısı ve toplam infektif juvenil sayısı bakımından içerisinde soya lesitini bulunan, 28 °C' de ve pH 7 değerinde yapılan üretimin istatistiksel olarak en verimli kombinasyon olduğu belirlenmiştir. pH 9 değerinin değerlendirme ölçütleri üzerine istatistiksel olarak olumsuz etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Bu tez çalışması ile HBH hibrit ırkı için bazı önemli üretim ölçütlerinin katı kültürde üretim için optimum değerleri belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Heterorhabditis bacteriophora*, *in vitro*, optimizasyon, soya lesitini
2018, viii + 73 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

OPTIMIZATION OF *IN VITRO* SOLID CULTURE OF *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HYBRID STRAIN

Tufan Can ULU

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. İ. Alper SUSURLUK

Entomopathogenic nematodes (EPN) are widely used biocontrol agents. EPNs are living under soil and they need an insect host to continue their biology. EPNs kill their insect host and emerge into soil to seek new hosts. They have active host-seeking ability, they can be applied with standard sprayers, they have lethal effects over 250 insects and they are safe for non-target hosts and environment. EPNs have become popular in bio-pesticide market due to their positive features. However, one of their important disadvantage is the high price of commercial products. Thus, studies about EPNs mostly focused on improving mass production techniques and reduce production costs by optimization of production media and physical conditions. In Nematology Laboratory of Bursa Uludag University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, a hybrid strain was developed from different EPN isolates obtained from different climatic regions of Turkey and patented due to its superior bio-ecological characteristics. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hybrid strain is belong to our country and it is bio-ecologically adapted to Turkey. In this purpose, optimization of *in vitro* production and yield improvement of HBH hybrid strain was aimed. With yield improvement, reduction in production costs is also expected. In the present study, different production media with supplementary ingredient (soy lecithin, egg yolk), temperature (24, 28 and 32 °C) and media pH (5, 7 and 9) were selected as *in vitro* production parameters. Regarding the hermaphrodite egg numbers and total infective juvenile results obtained from different *in vitro* solid productions, best production combination was found as medium containing soy lecithin, 28 °C and pH 7. Moreover, media with pH 9 were showed statistically negative results compared to other combinations on all parameters. Consequently, optimum values for some important *in vitro* solid production parameters of HBH hybrid strain were determined.

Keywords: *Heterorhabditis bacteriophora*, *in vitro*, optimization, soy lecithin
2018, viii + 73 pages

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesi için gerekli zemini hazırlayan, bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan, yol gösteren ve hiçbir zaman emeğini esirgemeyen çok değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans, Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim süresince eğitim hayatıma katkıda bulunan Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi' nin değerli Öğretim Üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak eğitim hayatımın başlangıcından itibaren yanımda bulunan ve bana maddi manevi her türlü imkânı sağlayarak hiçbir konuda desteklerini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETİ	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1. Çalışmada Kullanılan EPN Irkı	31
3.2. <i>Galleria mellonella</i> Larvalarının Üretimi	31
3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ortamlar	33
3.4. HBH Hibrit Irkının <i>In Vivo</i> Üretimi	34
3.5. HBH Hibrit Irkının Yumurta İzolasyonu	36
3.6. HBH Hibrit Irkının Bakteri İzolasyonu	41
3.7. Katı Kültürlerin Oluşturulması	43
3.8. Ortam İçeriğinin Belirlenmesi için Yapılan Ön Denemeler	44
3.9. Üretim Optimizasyonunda Kullanılan Ölçütler	46
3.9.1. Ortam içerikleri	46
3.9.2. Sıcaklık	46
3.9.3. pH	46
3.10. Deneme Deseni	47
3.11. Optimizasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesinde Kullanılan Ölçütler	47
3.11.1. Hermafroditlerin yumurta sayısı	47
3.11.2. Üretilen toplam IJ sayısı	48
3.11.3. Üretilen IJ' lerin uzunlukları	48
3.11.4. Üretilen IJ' lerin <i>Galleria mellonella</i> üzerindeki etkinliği	49
3.12. İstatistiksel Analizler	50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	51
4.1. Ön Deneme Sonuçları	51
4.2. Optimizasyonun Hermafroditlerin Yumurta Sayısına Etkisi	52
4.3. Optimizasyonun Üretilen Toplam IJ Sayısına Etkisi	54
4.4. Optimizasyonun Üretilen IJ' lerin Uzunluğuna Etkisi	57
4.5. Optimizasyonun Üretilen IJ' lerin Etkinliğine Etkisi	61
4.6. Optimizasyonun Maliyeti	63
5. SONUÇ	65
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	74

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cm	Santimetre (1×10^{-2} m)
cm ²	Santimetrekare (1×10^{-4} m ²)
m ²	Metrekare
g	Gram
Mg	Miligram
ml	Mililitre (1×10^{-3} l)
mm	Milimetre (1×10^{-3} m)
µl	Mikrolitre (1×10^{-3} ml)
µm	Mikrometre (1×10^{-3} mm)
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

dk	Dakika
DDT	Dikloro Difenil Trikloroethan
EPN	Entomopatojen nematod
IJ	İnfektif Jüvenil
J1	Birinci dönem jüvenil
J2	İkinci dönem jüvenil
J3	Üçüncü dönem jüvenil
J4	Dördüncü dönem jüvenil
L.	Linnaeus
LAS	Leica Application Suite
LSD	Least Significant Differences
NBTA	Nutrient Bromothymol Blue Agar
Rh	Relative humidity (Oransal nem)
sp.	Species (tekil)
spp.	Species (çoğul)
YS	Yeast Medium

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya genelinde biyolojik ürünlerin pazar büyüklüğü	4
Şekil 1.2. Sentetik ve biyolojik pestisitlerin pazar büyüklüğünün 50 yıllık tahmini	4
Şekil 1.3. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> . A: Erkek, B: Infektif Jüvenil	7
Şekil 1.4. <i>Xenorhabdus</i> sp. (A) ve <i>Photorhabdus</i> sp. (B) bakterilerinin nematod vücudundaki yerleşimleri	9
Şekil 1.5. EPN' lerin sadeleştirilmiş hayat döngüsü	10
Şekil 1.6. Çeşitli firmalara ait kullanıma hazır ticari ürünler	12
Şekil 1.7. EPN' lerin sıvı kültürde ticari üretim sürecinin akış şeması	13
Şekil 1.8. Üretim yapılan farklı boyutlardaki biyoreaktörler	14
Şekil 3.1. <i>Galleria mellonella</i> larvaları	32
Şekil 3.2. Larvaların yetiştirildiği besin dolu kavanozlar	32
Şekil 3.3. Etüv içerisinde yer alan kavanozlar	33
Şekil 3.4. İnokulasyonun yapıldığı 24 kuyulu (well) hücre kültürü kabı	35
Şekil 3.5. İnokulasyon sonrası parafilm ile kapatılan ve inkübasyona bırakılan kaplar	35
Şekil 3.6. White Trap düzeneğindeki kadavralar	36
Şekil 3.7. Buzdolabında saklanan kültür kapları	36
Şekil 3.8. Kumdan temizlenen kadavralar	37
Şekil 3.9. Disekte edilen kadavradan çıkartılan hermafroditler	38
Şekil 3.10. Mikroskopta kontrol edilen döllenmiş yumurtalar	39
Şekil 3.11. Tüp içerisinde Ringer solüsyonu ile yıkanan hermafroditler	39
Şekil 3.12. İnkübasyon sonunda sağlıklı bir şekilde gelişen ve yumurtadan çıkan birinci dönem jüveniller	41
Şekil 3.13. Bakteri izolasyonu için steril iğne yardımı ile delinen larva	42
Şekil 3.14. NBTA agar üzerinde üretilen bakteri kolonileri	42
Şekil 3.15. Sıvı YS ortamı içerisinde üretilmiş bakteri	43
Şekil 3.16. Wouts agar üzerinde üretilmiş bakteriler	44
Şekil 3.17. EPN üretimi gerçekleştirilen petripler	45
Şekil 3.18. Agar üzerinde üreyen hermafroditlerin mikroskop görüntüsü	45
Şekil 3.19. Hermafroditlerin içerisinde yer alan döllenmiş yumurtaların mikroskop görüntüsü	48
Şekil 3.20. Sayım kaplarında sayımların yapılan IJ' ler	49
Şekil 3.21. Mikroskop altında LAS yazılımı ile yapılan ölçümler	50
Şekil 4.1. Ön denemelerde elde edilen sayım sonuçları	51
Şekil 4.2. Ön denemelerde ortam içeriklerinin karşılaştırılması	52
Şekil 4.3. Ortam içeriğinin hermafrodit yumurta sayısına etkisi	52
Şekil 4.4. Sıcaklığın hermafrodit yumurta sayısına etkisi	53
Şekil 4.5. pH değerinin hermafrodit yumurta sayısına etkisi	53
Şekil 4.6. İnteraksiyonların hermafrodit yumurta sayısına etkisi	54
Şekil 4.7. Ortam içeriğinin IJ sayısına etkisi	55
Şekil 4.8. Sıcaklığın IJ sayısına etkisi	55

Şekil 4.9. pH değerinin IJ sayısına etkisi	56
Şekil 4.10. İnteraksiyonların IJ sayısına etkisi.....	56
Şekil 4.11. Ortam içeriğinin ortalama IJ uzunluğuna etkisi.....	58
Şekil 4.12. Sıcaklığın ortalama IJ uzunluğuna etkisi	58
Şekil 4.13. pH değerinin ortalama IJ uzunluğuna etkisi	59
Şekil 4.14. İnteraksiyonların ortalama IJ uzunluğuna etkisi.....	60
Şekil 4.15. Ortam içeriğinin IJ etkinliğine etkisi	61
Şekil 4.16. Sıcaklığın içeriğinin IJ etkinliğine etkisi	61
Şekil 4.17. pH değerinin IJ etkinliğine etkisi.....	62
Şekil 4.18. İnteraksiyonların IJ etkinliğine etkisi	63



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Denemelerde kullanılan ortamların içerikleri (100 ml için)	46
---	----



1. GİRİŞ

İnsanların düzenli yaşama geçmesiyle birlikte tarımın başladığı ve on bin yıldan fazla bir tarihi olduğu düşünülmektedir. İnsanlığın gelişimi ile birlikte tarımsal uygulamaların da geliştiği ve geniş alanlara yayıldığı bilinmektedir. Yaygınlaşan tarımsal uygulamalar beraberinde birçok önemli sorun meydana getirmiştir. Zaman içerisinde bu sorunların en önemlilerinden biri haline gelen, tarımsal ürünlerde ekonomik kayba neden olan hastalıklar, zararlılar ve yabancı otlar gibi etmenler ortaya çıkmıştır. Tarımda ekonomik kayba neden olan etmenler ile mücadelenin M.Ö. 3000 yılına kadar uzandığı ve Sümerlilerin çeşitli böcekler ile mücadelede kükürt kullanmasıyla başladığı düşünülmektedir. Bundan binlerce yıl sonra M.Ö. 300’ de Çinlilerin bitki fenolojisinden yararlanarak bitkilerin ekim-dikim tarihlerini zararlı böceklerle denk gelmeyecek şekilde ayarladıkları belirlenmiştir.

Tarımın öneminin artması ile birlikte tarımsal ürünlerin korunmasının gerekliliği de ortaya çıkmış ve M.S. 1600’ lerde sabun, arsenik, nikotin gibi bazı bileşikler ilk kez böceklerle karşı pestisit olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bundan yaklaşık 200 yıl sonra 1800’ lerde önemli ekonomik kayıplara neden olan San Jose kabuklu biti (*Quadraspidiotus perniciosus*) ve Kolorado patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*) gibi böcekler tanımlanmış, bu böceklerle karşı özel karantina önlemleri alınmış ve böceklerle mücadele konusunda ilgi artmıştır. Böceklerle karşı kullanılmak üzere 1860 yılında “Paris Yeşili” adı verilen kurşun-arsenik-bakır sülfat karışımı bir kimyasal pestisit geliştirilmiştir. 1900’ lerin başlarında çeşitli tarım makinelerinin ortaya çıkması ile birlikte organik pestisitlerin kullanımı artmış ancak böceklerin direnç kazanması ile birlikte bu pestisitler etkisiz, pahalı, tehlikeli ve fitotoksisite meydana getiren kimyasallara dönüşmüştür. Pestisitlerin etkisiz kalması nedeniyle yeni arayışlar başlamış ve o güne kadar petrol ve kömür gibi maddeler ile formüle edilen pestisitler için 1930’ larda yeni sentetik kimyasallar sentezlenmeye başlanmıştır. 1873 yılında sentezlenen DDT (Dikloro Difenil Trikloroetan) isimli kimyasalın insektisit özelliği tespit edilmiş, İkinci Dünya Savaşı’ nda askerlerin vücut piresi ve tifo hastalığı nedeniyle karşılaştıkları hayati tehlikeye karşı kullanılmış ve başarılı olunmuştur. Bu nedenle DDT’ nin insektisit özelliğini keşfeden İsviçreli Paul Muller’ a Nobel Ödülü verilmiştir. İkinci Dünya Savaşı

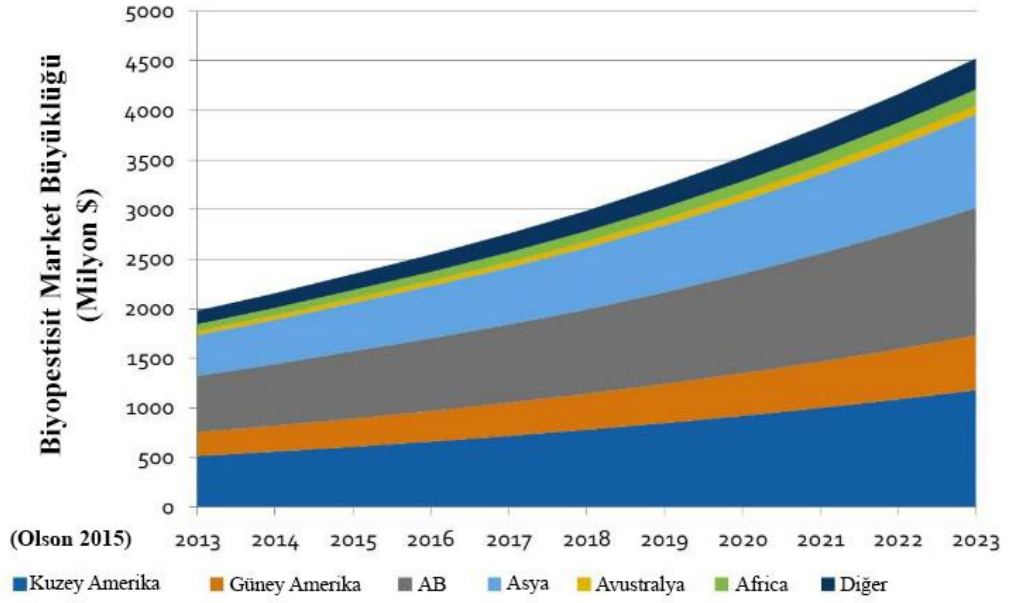
boyunca Almanya ve müttefikleri sinir gazı geliştirme amacıyla organik fosforlu kimyasallar üzerinde denemeler yapmışlardır. Bu kimyasalların insektisit özelliğinin keşfedilmesi ile birlikte İkinci Dünya Savaşı sonrasında organik fosforlu ve klorlandırılmış hidrokarbonlu bileşikler pestisit olarak kullanılmaya başlanmıştır.

İnsan nüfusunun sürekli artması ve tarım alanlarının sürekli azalması nedeniyle 1940' ların başında özellikle Amerika Birleşik Devletlerinde Yeşil Devrim (Green Revolution) adı verilen süreç başlamıştır. Yeşil Devrim ile birlikte tarımda verimli çeşitler (özellikle mısır, pirinç ve buğday), sentetik gübreler ve pestisitler kullanılmaya başlanmış, sulama ve bölgelere göre çeşit seçimi ile ilgili düzenlemeler getirilmiştir. Yeşil Devrim' in dünyadaki açlığa bir çözüm olduğu düşünülmüş ve böceklerin biyolojisi, yoğunluğu, zarar düzeyi vb. kavramları incelemek yerine doğrudan kimyasal kullanımının daha doğru ve kolay olduğu söylenmiştir. Yeşil Devrim kavramını ortaya atan Norman Borlaug, tarıma ve insanlığa katkılarından dolayı 1970 yılında Nobel Barış Ödülü' nü almıştır. Yeşil Devrim ile birlikte başlayan süreç sayesinde tarımda verim anlamında elde edilen olumlu etki ve devrimin başlangıcındaki başarıya rağmen, ilerleyen zamanlarda bu tarım şeklinin aşırı enerji tüketimine neden olması ve çoğunlukla monokültür tarım yapılması sonucunda bazı soru işaretleri oluşmaya başlamıştır. Yoğun pestisit kullanımına bağımlı olması nedeniyle Yeşil Devrim toplumlarında sorgulanmaya başlamış ve pestisitlerin çevre ve insan üzerindeki olumsuz etkileri ile ilgili endişeler tüm dünya genelinde artmıştır. Rachel Carson tarafından 1962 yılında yazılan "Sessiz Bahar (Silent Spring)" isimli kitap ile dünya genelinde bir farkındalık oluşmuştur. Kitapta yer alan; pestisitlerin doğal yaşam, su kaynakları ve insan sağlığı üzerindeki etkileri, süt ve çeşitli gıdalarda DDT kalıntısı bulunması, kimyasallara dayanıklı "süper böcekler" ve yabancı otların yarattığı sorunlar gibi bilgiler ile tarımda ekonomik kayba neden olan etmenler ile mücadeleye karşı farklı yaklaşımların oluşması sağlanmıştır.

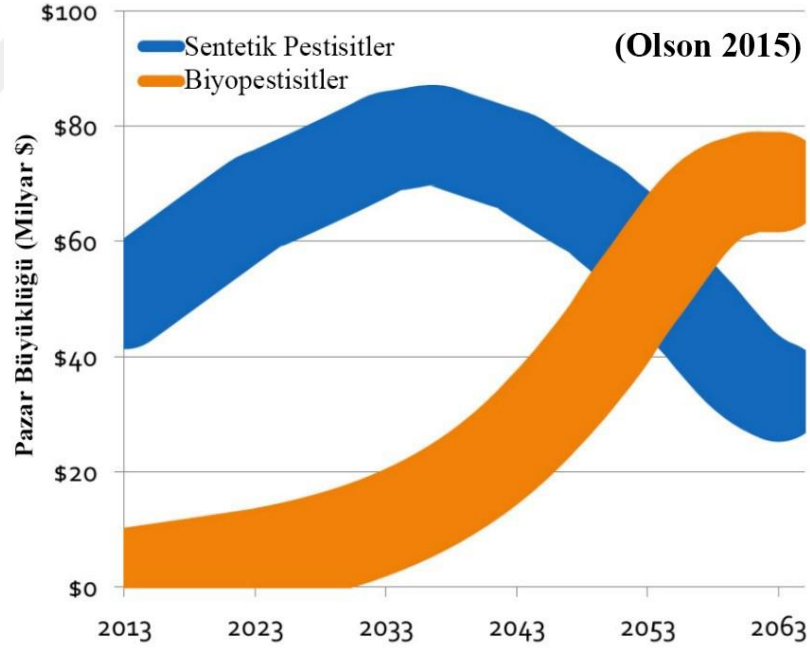
Yeşil Devrim sonrası ortaya çıkan ve dünya genelinde farkındalık yaratan sorunları çözmek için 1970' li yıllarda tarımda Entegre Zararlı Yönetimi (EZY) (Integrated Pest Management=IPM) kavramı ortaya konmuştur. A.B.D. Tarım Bakanlığı ülke genelinde EZY programları ilan etmiş, A.B.D. Çevre Koruma Ajansı pestisit kullanımını sınırlayıcı çeşitli düzenlemeler ortaya koymuştur. Bu yıllardan itibaren EZY üzerinde yoğun

çalışmalar yapılmış ve genetik biliminin gelişmesi ile birlikte genetiği değiştirilmiş bitkiler üretilmeye başlanmıştır. Günümüze yaklaştıkça hedef alınmayan organizmalar için daha güvenli, daha hafif ve hedefe özelleşmiş yöntemlerin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Teknolojinin gelişmesi ile birlikte sürekli olarak kimyasal kullanımı azaltmaya yönelik araştırmalar devam etmektedir.

Günümüzde tarımdaki hastalık, zararlı ve yabancı otlar ile mücadelede tüm dünya genelinde en yaygın kullanılan yöntem kimyasal mücadeledir (Sarwar 2015). Ancak, yukarıda bahsedildiği gibi 1960' larda ortaya çıkan farkındalık ile kimyasal mücadeleye alternatif yöntemler üzerine çalışmalar başlamıştır. Tarımsal ürünlerde ekonomik kayba neden olan etmenlere karşı kimyasal mücadelenin dışında Biyolojik, Biyoteknik, Fiziksel, Genetik vb. birçok mücadele yöntemi bulunmaktadır. EZY programlarında tüm mücadele yöntemleri birbirleri ile uyumlu şekilde kullanılarak kimyasal ilaçların kullanımı minimum düzeyde tutulmaktadır. Şu ana kadar kimyasal mücadeleye alternatif en başarılı ve uygulanabilir yöntemin biyolojik mücadele olduğu tespit edilmiştir. Dünya genelindeki pestisit kullanım istatistiklerine bakıldığında, 2015 yılında toplam pestisit pazarı yaklaşık 50 milyar \$ iken, biyolojik ürün pazarı 2 milyar \$ civarındadır (Şekil 1.1) (Olson 2015). Oran olarak çok düşük görünmesine rağmen, yapılan tahminlerde 2050' lerde biyolojik ürünlerin pazar payının kimyasal ürünleri geçeceği düşünülmektedir (Şekil 1.2) (Glare ve ark. 2012, Olson 2015). Bu durum da, biyolojik ürünlerin geleceğin önemli elemanlarından biri olacağı ve tarımda kullanımlarının değer kazanacağı konusunda önemli sonuçlar ortaya koymaktadır.



Şekil 1.1. Dünya genelinde biyolojik ürünlerin pazar büyüklüğü



Şekil 1.2. Sentetik ve biyolojik pestisitlerin pazar büyüklüğünün 50 yıllık tahmini

Tarihte ilk olarak Çinlilerin üçüncü yüzyılda turunçgillerde zararlı bir lepidopter türü olan *Tesseratoma papillosa*' ya karşı etkili bir karınca türü olan *Oecophylla smaragdina*' nın kullanılması sonucuyla biyolojik mücadelenin yaklaşık iki bin yıl önceye dayandığı

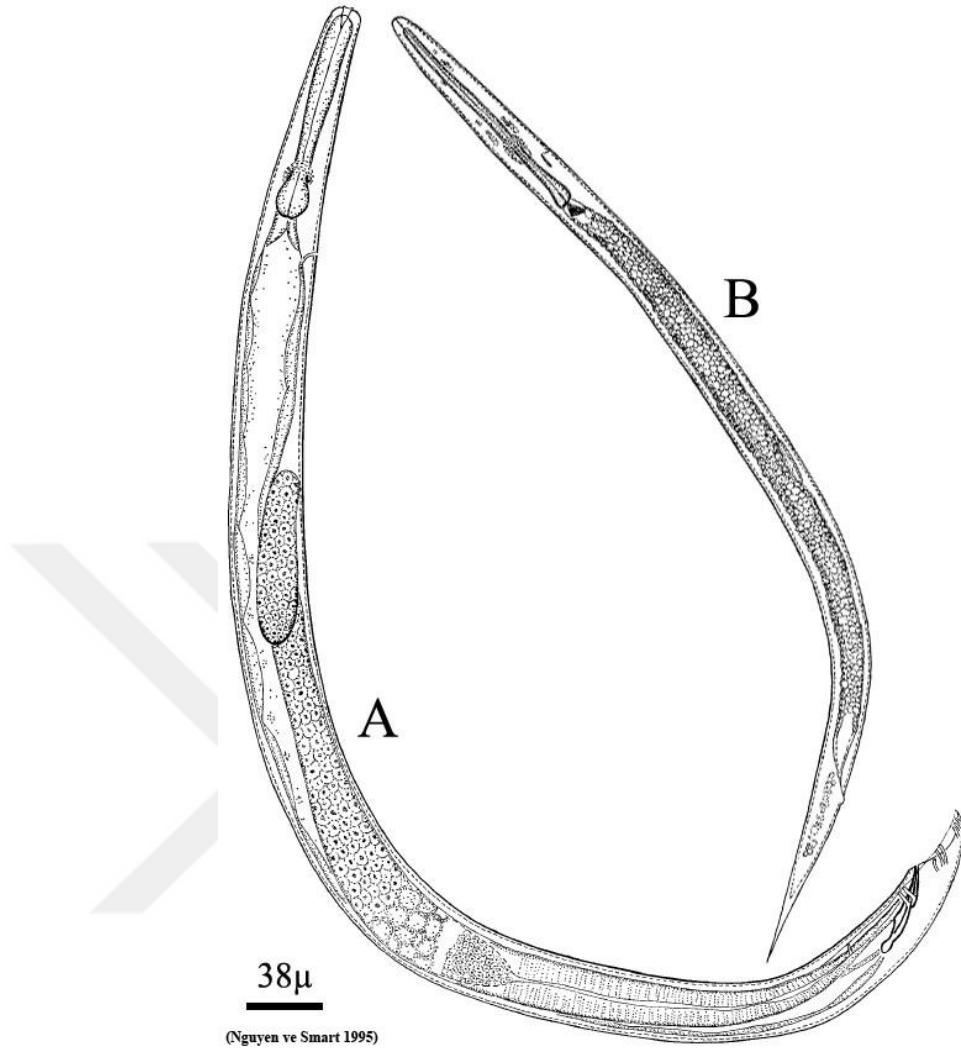
tahmin edilmektedir. Bundan yaklaşık bin yıl sonra Yemen’ de hurma ağacında zararlı olan bir böceğe karşı yine bir karınca türü kullanılmıştır. Bu uygulamalardan başarı elde edilmesi sayesinde biyolojik mücadelenin bilinirliği artmaya başlamış ve 1300’ lü yıllarda uğur böceğinin birçok böceğe karşı kullanılabileceğinin belirlenmesi ile bu yöntemin uygulama alanı genişlemiştir. Aradan geçen asırlar boyunca biyolojik mücadelede kullanılabilecek yüzlerce yeni organizma türü bulunmasına ve dünya genelinde uygulanan bir yöntem olmasına rağmen “Biyolojik Mücadele” tabiri ilk kez 1919 yılında H. S. Smith tarafından kullanılmıştır (Smith 1919). İlk olarak “doğal düşmanlar kullanılarak zararlı böceklerin kontrol altına alınması” olarak tanımlanan biyolojik mücadele daha sonra “avcı, parazit veya patojenlerin kullanılarak, hedef organizmaların popülasyonlarının normalin altında tutulması” olarak değiştirilmiştir (De Bach 1964). 1982 yılında ise “uygulamalı biyolojik mücadele” ve “doğal biyolojik mücadele” olarak iki farklı terim ortaya konmuştur (Van den Bosch ve ark. 1982). Doğal biyolojik mücadele terimi, doğada var olan dengenin içerisinde yer alan ve insanın herhangi bir şekilde müdahale etmediği mücadeleyi tanımlarken, uygulamalı biyolojik mücadele ise insan eliyle doğal düşmanların zararlı böcekler üzerindeki etkinliğinin artırılmasını tanımlamaktadır.

Uygulamalı biyolojik mücadele yani klasik biyolojik mücadele uygulamaları, doğal düşmanların ithal edilmesi, çoğaltılması ve korunması olarak üç farklı başlıkta incelenmektedir. Biyolojik mücadelede kullanılan organizmalar “doğal düşman”, “biyolojik mücadele etmeni” veya “biyokontrol ajanı” gibi terimlerle ifade edilmektedir. Günümüzde en yaygın kullanılan etmenler arthropodlar (böcekler ve akarlar), nematodlar, bakteriler, funguslar, virüsler vd. organizmalardır. Biyolojik mücadele etmenleri günümüzde temel olarak predatör (avcı), parazitoid ve patojen olarak ayrılmaktadır.

Yukarıda belirtilen olumsuz nedenlerden dolayı dünya genelinde kimyasal ilaçlara alternatif yöntemler üzerine araştırmalar devam etmektedir. Kimyasal ilaçların etkinliğinin yüksek olmasının yanında etki süresinin kısa olması, uygulamasının uzmanlık gerektirmemesi ve genel olarak düşük fiyatlı olması sebebiyle tercih edilmektedir. Bu nedenle kimyasal ilaçlara alternatif olarak düşünülen diğer yöntemlerin,

ilaçlar ile birçok konuda rekabet edebilmesi gerekmektedir. Biyolojik mücadele ajanlarının olumsuz olarak nitelendirilebilecek özelliklerinden bazıları; üretim, formülasyon ve depolama maliyetlerinin fazla olması, etkinliğinin kimyasal ilaçlara göre nispeten düşük olması, uygulama sonuçlarının çok hızlı görülememesi ve uygulama sırasından uzmanlık gerektirmesi olarak sıralanabilir. Bu gibi nedenlerden dolayı, biyolojik mücadelenin yaygınlaşabilmesi için, dünya genelinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmaların büyük bir kısmı, biyolojik mücadele ajanlarının etkinliğini artırmak, üretim ve depolama maliyetlerini azaltmak, üretim verimini artırmak, kullanım kolaylığı sağlayan formülasyonlara geçiş yapmak gibi amaçlara yönelmiştir (Grewal 2002, Schroer ve Ehlers 2005, Miles ve ark. 2012, Vemmer ve Patel 2013).

Entomopatojen nematodlar (EPN), Nemata şubesi, Secernentea sınıfı, Rhabditida takımının Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına bağlı, biyolojisinin % 90'ından fazlasını toprakta geçiren, biyolojilerinin devamı için konukçu bir böceğe ihtiyaç duyan obligat endoparazit canlılardır. Mikroskobik ölçülerde olan EPN'lerin boyları türe göre değişmekle birlikte ortalama 500-1000 µm arasındadır (Şekil 1.3) (Nguyen ve Smart 1995).



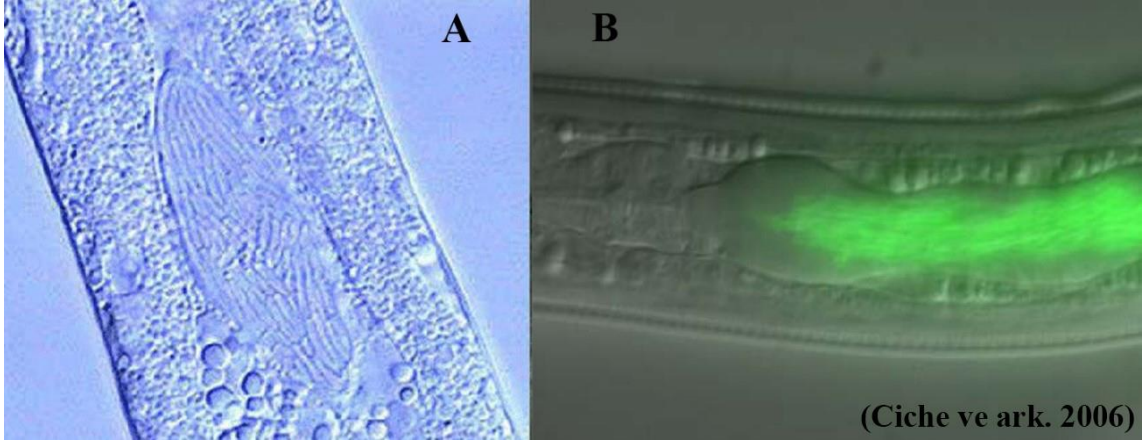
Şekil 1.3. *Heterorhabditis bacteriophora*. A: Erkek, B: Infektif Jüvenil

Dünya genelinde birçok bölgede ve iklimde yaşayabildikleri saptanan EPN'lerin (Griffin ve ark. 1990, Poinar 1990, Hominick ve ark. 1996, Hominick 2002), geniş konukçu aralığına sahip olması (Peters 1996), hedef alınmayan diğer organizmalara olumsuz etkisinin olmaması (Lacey ve ark. 2015), aktif bir şekilde konukçu arama yetenekleri (Lewis ve ark. 1992, Grewal ve ark. 1994), birçok tarım alet ve makinası ile rahatlıkla uygulanabilir olması (Georgis 1990, Koppenhöfer 2000, Wright ve ark. 2005), birçok pestisit ile uyumluluğu (Rovesti ve ark. 1988, De Nardo ve Grewal 2003, García del Pino ve Jové 2005, Atwa ve ark. 2013, Ulu ve ark. 2016) ve açık alanlarda uygulama için *in vitro* sıvı kültürde kitle olarak üretilebilmeleri (Ehlers ve ark. 1998, 2000, Ehlers 2001,

Gaugler ve ark. 2002, El-Sadawy 2011), EPN' lerin pestisitlerin yanında iyi bir alternatif olduğunu göstermiş ve bu canlı grubunu cazip hale getirmiştir.

EPN'ler, diğer tüm nematodlarda olduğu gibi yumurta, dört adet juvenil ve ergin olmak üzere üç farklı döneme sahiptir. EPN' lerin konukçu dışında yaşayan en önemli evresi olan ve üçüncü dönem juvenillerin (J3) özel formu olan infektif juvenilleri (IJ), toprak altında aylarca aktif şekilde konukçularını arayabilme ve beslenmeden yaşayabilme özelliğine sahiptirler (Glazer 2002). Uygun çevre şartları altında *Heterorhabditis bacteriophora* türünün IJ' lerinin toprakta 22 ay boyunca etkinlik sağlayabildiği tespit edilmiştir (Susurluk ve Ehlers 2008).

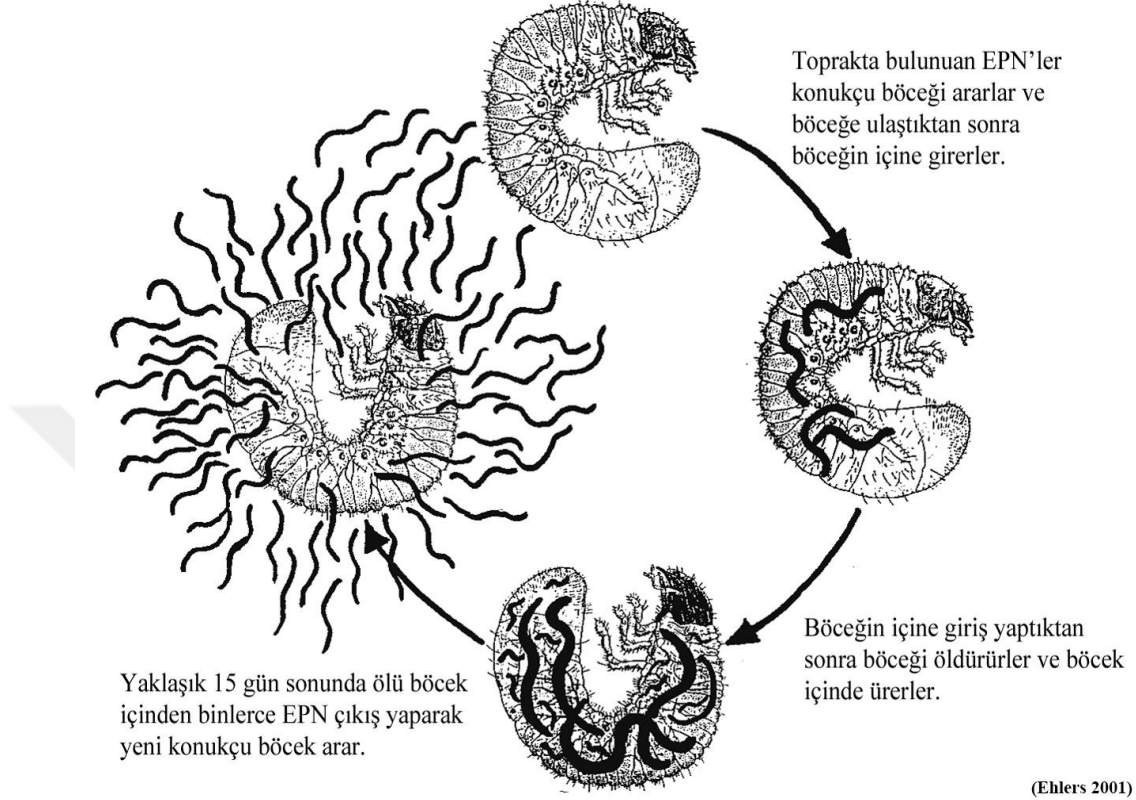
Türe göre değişmekle birlikte IJ' ler sindirim sistemleri veya özel bir kese içerisinde buldukları Enterobacteriaceae familyasına ait ve gram-negatif olan bakteriler ile simbiyotik ilişki içerisindedirler (Şekil 1.4) (Akhurst 1983, Boemare ve ark. 1996, Ciche ve ark. 2006). Bu simbiyont bakteriler konukçu böceğin ölümünde ve EPN' lerin üremesinde önemli rol oynar. Bu simbiyont bakteriler doğada kendi başlarına hayatta kalamazken, *Heterorhabditis* türleri konukçu böceği bakteri olmaksızın öldürememekte, *Steinernema* türleri ise bakteri olmadan konukçu böceği öldürmesine rağmen bu böcek içerisinde üreyememektedir. Simbiyotik bakteriler konukçu böcek içerisine girdikten sonra hızla çoğalmaya başlar ve lipaz, proteaz, kitinaz vb. diğer bileşikler salgılayarak konukçu böceğin sindirilmesi ve sonunda ölmesine neden olur (Akhurst 1983). EPN türleri ile bakterisi arasında bir özelleşme bulunmaktadır (Ciche ve ark. 2006). *Heterorhabditis* türü EPN'ler *Photorhabdus* spp. bakterileriyle, *Steinernema* türleri ise *Xenorhabdus* spp. bakteriler ile simbiyotik ilişki içerisindedirler (Boemare ve ark. 1996). Yapılan çalışmalarda, EPN' lerin simbiyotik bakterisi haricinde başka bakteriyle üreyemediği net bir şekilde ortaya konmuştur (Jeffke ve ark. 2000, Han ve Ehlers 2001, Singh ve ark. 2012).



Şekil 1.4. *Xenorhabdus* sp. (A) ve *Photorhabdus* sp. (B) bakterilerinin nematod vücudundaki yerleşimleri

Aktif biçimde konukçularını arayan IJ' ler konukçuya temas ettiklerinde ağız, anüs, stigma vb. doğal açıklıklardan, konukçada bulunabilecek yaralardan veya *Heterorhabditis* türlerinin ağız kısmında bulunan diş benzeri çıkıntılar sayesinde intersegmental zarı parçalayarak giriş yapar (Bedding ve Molyneux 1982). IJ' ler larvanın hemosölüne (vücut boşluğu) ulaştıktan sonra ağız ve anüslerinden simbiyotik bakterilerini konukçuya bırakırlar. Simbiyotik bakteri larva hemolimfnde (vücut sıvısı) çoğalmaya başladıktan sonra yukarıda bahsedilen bileşikler sayesinde 36-48 saat içerisinde larva kan zehirlenmesi (septisemi) nedeniyle ölür ve konukçunun kadavrası EPN' lerin üremesi için uygun bir besin ortamı (biomass) haline dönüşür (Kaya ve Gaugler 1993, Smart 1995, Susurluk 2008). Konukçu böceğin EPN' lerin üremesi için uygun bir ortam haline gelmesinden sonra besin sinyalini alan IJ' ler (Strauch ve Ehlers 1998), buldukları dinlenme döneminden çıkarak dördüncü dönem juvenil (J4) dönemine geçerler ve biyolojilerine devam ederler. *Heterorhabditis* türlerinde IJ evresinde ergin döneme geçen bireyler hermafrodit olur ve eşeysiz (automictic) ürer. İkinci ve sonraki döllerin erginlerinde ise hermafrodit oranı azalır, dişi ve erkek bireyler oluşarak eşeyli (amphimictic) üreme gerçekleşir. *Steinernema* türlerinde ise bu hermafrodit bireyler oluşmamaktadır. Konukçu böceğin büyüklüğüne göre değişmekle birlikte konukçada üç döle kadar üreyebilen EPN' ler, besin tükenmeye başladıktan sonra üçüncü juvenil dönemdeyken dördüncü döneme geçmezler ve IJ formuna dönüşürler. Larva içerisindeki besin tamamen bittiğinde ise larvanın kütikülasını parçalarlar ve

toprağa geçerek yeni konukçularını aramaya başlarlar (Şekil 1.5) (Poinar 1979, Akhurst ve Boemare 1990, Ehlers 2001).



Şekil 1.5. EPN'lerin sadeleştirilmiş hayat döngüsü

EPN'ler ilk olarak 1923 yılında Steiner tarafından tespit edilmiş ve tanımlanan ilk tür *Aplectana kraussei* (*Steinernema kraussei*) olmuştur (Poinar ve Grewal 2012). İlk tespit edildiği dönemde sistematikteki yeri haricinde herhangi bir merak uyandırmayan bu canlıdan yedi yıl sonra Glaser ve Fox tarafından *Neoapectana glaseri* türü tespit edilmiştir (Stoll 1973). Weiser adlı araştırmacı tarafından 1955 yılında elma içkurdu (*Cydia pomonella*) larvalarından *N. carpocapsae* türünün Avrupa popülasyonlarını izole elde ettiği andan itibaren EPN'lerin patojenik etkileri ve tarihleri hakkında merak uyanmış ve önemli çalışmalar başlamıştır. Poinar ve Thomas isimli iki araştırmacı, 1965 yılında o zamanki adı ile *Achromobacter nematophilus* bakterisinin *S. carpocapsae* ile simbiyotik bir ilişki içinde olduğunu tespit etmiştir (Ciche ve ark. 2006). İlk EPN'nin 1923 yılında bulunmuş olmasına rağmen biyolojik mücadele alanında kullanım potansiyelleri ile ilgili ilk çalışmalar 1930'lu yılların başında Glaser ve arkadaşları

tarafından Japon böceği *Popillia japonica* üzerinde denemeler yapılmış, 1980' li yıllara kadar biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılma olasılıkları üzerinde yeteri kadar durulmamıştır (Gaugler 2002). Nematod ile bakteri arasındaki simbiyotik ilişkinin anlaşılması, EPN' lerin ticari anlamda biyolojik mücadele ajanı olması konusunda önemli bir kırılma noktası olmuştur.

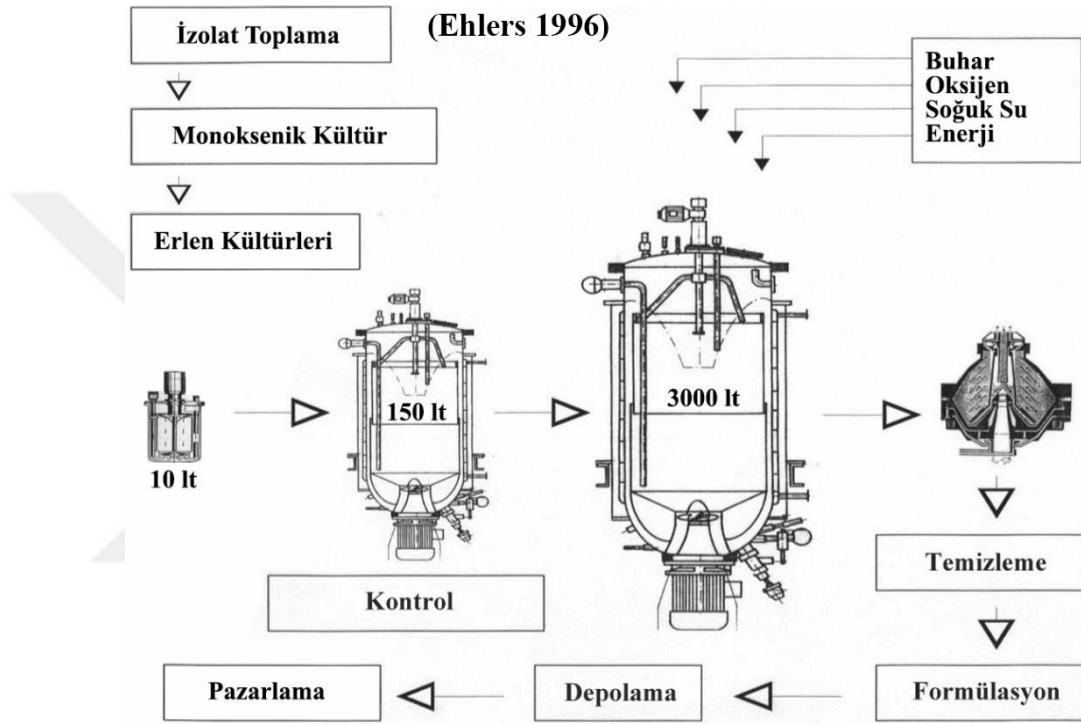
EPN'lerin kitle üretimine uygun olması sayesinde bu yönde çalışmalar uzun yıllardır devam etmektedir. Yapay ortam üzerinde ilk EPN kitle üretimi 1931 yılında Glaser tarafından gerçekleştirilmiştir (Stoll 1973). Canlı larvalar üzerinde de ufak çaplarda da olsa nematod üretimi yapılabildiği tespit edilmiş ve arazi çalışmalarında kullanılmak üzere EPN üretimi gerçekleştirilmiştir. EPN tarafından enfekte edilmiş petek güvesi *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) larvası birçok şirket tarafından ticari preparat halinde bahçe zararlılarına karşı satışa sunulmuştur. 1981 yılında A.B.D.' li bir firma çekirgeler içerisinde EPN' leri üretmiş ve "Neocide" adı altında odun güvelerine karşı satmıştır. Aynı yıl Robin Bedding tarafından sünger bazlı yapay bir ortam içerisinde EPN üretimi gerçekleştirilmiş ve daha sonra bu yöntem Avustralya'daki bir firma tarafından ticari olarak kullanılmıştır (Bedding 1981). EPN' lerin günümüzdeki üretim şekli olan biyoreaktör içerisindeki kitle üretimleri ilk olarak 1982 yılında Kaliforniya merkezli Biosys adlı şirket tarafından gerçekleştirilmiştir. Aynı şirkette çalışan araştırmacı Friedman, 1990 yılında sıvı kültürde EPN üretimini iyileştirerek üretimin dünya çapında yaygınlaşmasına önayak olmuştur (Friedman 1990). Günümüze kadar farklı şekillerde üretimi yapılan EPN' lerin en yaygın kullanılan *in vitro* üretim yöntemi Lunau ve ark. (1993) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmadan sonra üretim tekniği çok büyük değişikliklere uğramamış, sadece kullanılan malzemeler ve oranlarında değişiklikler yapılarak üretimin veriminin artırılması hedeflenmiştir. Günümüzde e-nema, Koppert, Biosys, BASF vb. bazı büyük şirketlerin ticari EPN formülasyonları satılmaktadır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Çeşitli firmalara ait kullanıma hazır ticari ürünler

EPN' ler kullanım amacına bağlı olarak *in vivo* veya *in vitro* olarak kitle halinde üretilmektedirler (Ehlers 2001). Laboratuvar çalışmaları, sera, ufak çaplı arazi denemeleri vb. amaçlar için *in vivo* yöntemler tercih edilirken, ticari üretim ve geniş çaplı uygulamaları için *in vitro* yöntemler tercih edilmektedir (Gaugler ve ark. 2002). *In vivo* yöntem genel olarak *G. mellonella* larvası üzerinde yapılmaktadır. Laboratuvar şartlarında yetiştirilmesi kolay olan, lepidopter larvalarının geneline göre nispeten irice vücuda sahip (~3 cm) ve EPN' lere hassas olan bu larva, üretim için ideal konukçu olarak görülmektedir (Kaya ve Gaugler 1993). Ancak, depolanmış ürünlerde zararlı, balık ve kanatlı hayvan besini olarak da kullanılan başka bir böcek olan un kurdu *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvası da *in vivo* üretimde konukçu böcek olarak kullanılmaktadır. *In vitro* yöntemler ise temelde katı ve sıvı ortam olarak ikiye ayrılmaktadır. Katı ortamlar genelde belirli ölçülerdeki petri kaplarında gerçekleştirilmektedir. Genellikle hayvansal kaynaklı besin maddeleri, agar ve saf su kullanılarak hazırlanan katı ortamlar daha kullanışlı ve risksiz olduğu için sıvı ortamlara tercih edilmektedir. Sıvı ortamlar ise içerisinde agar bulunmayan, Erlenmeyer, beher veya biyoreaktör içerisinde hazırlanabilen, üretim süreci riskli, daha çok emek isteyen fakat üretim kapasitesi yüksek olan üretim yöntemidir. Katı ortamda EPN' ler genelde agarın

yüzeyinde ürerken, sıvı ortamlarda tüm sıvı içerisinde üreme gerçekleşmektedir. Katı ortamın yüzeyi belli bir noktaya kadar büyütülebileceği için üretim kapasitesi de sınırlıdır. Sıvı ortamlarda ise 250 ml hacimli erlen şişesinden 100 tonluk biyoreaktöre kadar seçenek bulunmaktadır. Yıllar boyunca ticari amaçlı olarak *in vivo* üretim de kullanılmasına karşı günümüzde ticari üretimin çok büyük bir bölümü sıvı ortam kullanılarak biyoreaktörler içerisinde yapılmaktadır (Şekil 1.7, Şekil 1.8) (Ehlers 1996).



Şekil 1.7. EPN'lerin sıvı kültürde ticari üretim sürecinin akış şeması



Şekil 1.8. Üretim yapılan farklı boyutlardaki biyoreaktörler

Bir biyolojik mücadele ajanının ticari olarak kitle üretiminin yapılabilmesi önemli bir özellik olmasına karşın, üretim sırasındaki maliyetlerin ve teknolojinin fazlalığı nedeniyle elde edilen ürün pahalı olmakta ve bu ürünün çiftçiler tarafından tercih edilme şansı azalmaktadır. EPN'lerin yapay ortamda üretim tarihi incelendiğinde yıllar içerisinde birçok gelişme yaşadığı görülmektedir (Chavarría-Hernández ve ark. 2011, El-Sadawy 2011, Ferreira ve ark. 2014, Testa ve Shields 2017). Bu gelişmelerin çoğu üretim verimini artırmak, üretim maliyetlerini azaltmak veya üretim sonunda elde edilen ürünün kalitesini artırmak gibi hedefler üzerinde gerçekleşmiştir. EPN'ler ile ilgili çalışmalar uzun yıllardır yapılmasına karşın, biyolojileri, fizyolojileri, ekolojileri ve davranışları konusunda henüz tam olarak anlaşılmayan bazı noktalar bulunmaktadır. Bu nedenle birçok canlı ve cansız etmenin EPN üzerindeki etkisi konusunda araştırmalar devam etmektedir. Bu araştırmaların bazıları da, kitle üretim yapılan yapay ortamın ve üretim sırasındaki çevresel faktörlerin üretime olan etkisinin incelenmesidir (Hirao ve Ehlers 2009, Leite ve ark. 2016).

EPN' lerin katı ve sıvı ortamlardaki kitle üretimlerini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin bazıları sıcaklık, nem, pH, viskozite, tuzluluk, elektrik iletkenliği, çalkalama hızı, basınç, ortam içeriği, kullanılan EPN türü veya ırkı olarak özetlenebilir (Shapiro-Ilan ve ark. 2012). Bahsedilen faktörlerin hepsi, üretim sırasında verimi ve üretim sonrasındaki ürünün kalitesini doğrudan etkilemektedir. Bu faktörlere ek olarak teknolojinin ilerlemesi ile birlikte yeni faktörler ortaya çıkmakta ve üretim yöntemleri her geçen gün daha optimize edilmektedir. EPN' lerin kitle üretiminin optimizasyonu sayesinde ticari ürünler kimyasal ilaçlar ile mücadele gücü elde etmekte ve pazarda kendine yer bulma şansı artmaktadır.

Dünya genelinde birçok firma tarafından *H. bacteriophora*' nın belirli ticari ırklarının kitle üretimi yapılmaktadır (HP88, Riwaka, Oswedo vb.) Ancak, her canlı kendine özgü genetik özelliklere sahip olmakta ve yaşadığı bölgenin şartlarına karşı uzun yıllar içerisinde çeşitli adaptasyonlar geliştirmektedir. Örneğin Erzurum' dan izole edilen bir *H. bacteriophora* izolatu soğuk şartlara dayanırken, Adana' dan izole edilen bir izolat yüksek sıcaklığa dayanabilmektedir (Ulu ve Susurluk 2014). Bu açıdan düşünüldüğünde, aynı türe ait farklı ırkların birbirleri arasında çeşitli farklılıklar olması beklenen bir durumdur. Türkiye' de EPN kullanımını henüz resmi olarak başlamamasına rağmen bazı firmalar kullanım ruhsatı almış ve etkinlik denemelerine başlamıştır. Ülkemizde biyolojik mücadele kapsamında Türkiye şartlarına adapte olmuş bir EPN ırkının kullanımının, yabancı kaynaklı ırklara göre daha etkili sonuçlar göstereceği düşünülmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, gelecekte ülkemizde de ticari olarak üretilme potansiyeli olan bir ürünün yine ülkemize ait bir ırkının kullanılarak yapılması, hem etkinlikteki başarının artırılması, hem de yabancı kaynaklı bir ırka bağlı kalınmaması açısından önemlidir.

Bu çalışmada, Türkiye' nin farklı bölgelerinden izole edilen iki farklı EPN izolatının hibritlenmesi ile elde edilen *H. bacteriophora* HBH hibrit ırkının *in vitro* katı kültürdeki kitle üretiminin optimizasyonu amaçlanmıştır. Kullanılan HBH hibrit ırkı 2018 yılında üstün özelliklere sahip olması nedeniyle patent almıştır (Patent No: TR 2013 06141 B). Bu amaçla kullanılan standart katı ortam içerisine protein ve yağ kaynağı olarak yumurta sarısı ve soya lesitini eklenmiştir. Buna ek olarak üretim sırasında kullanılan sıcaklık ve

pH değeri değişkenlerinin de üretim verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu değişkenlerin etkileri; hermafrodit bireylerin yumurta sayısı, IJ' lerin boy ölçümleri, toplam üretilen IJ sayısı ve IJ' lerin *G. mellonella* üzerindeki etkinliği parametreleri kullanılarak incelenmiştir. Çalışma sonunda, *in vitro* katı kültürde optimize edilmiş bir üretime sahip ve ileride ticari olarak üretilmeye hazır bir biyolojik mücadele etmeni elde edilmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETİ

Yapay ortamda EPN üretimi ile ilgili ilk çalışmalardan biri Wouts (1981) tarafından gerçekleştirilmiştir. *H. heliothidis* türü EPN ticari olarak satılan Nutrient Broth, Yeast Ekstraktı ve çeşitli nebati yağlar kullanılarak hazırlanan yapay bir ortam içerisinde monoksenik olarak üretilmiştir. Ticari olarak satılan bu ürünler un ile birlikte pişirilmiş ve poliüretan köpük içerisinde otoklavlanarak simbiyont bakteri ile inokule edilmiştir. Bakteri ile inokule edilen sünger 25 °C’ de üç gün boyunca inkübe edilmiştir. Sünger ortamı içerisinde üreyen bakteri, EPN gelişimi için uygun bir ortam yaratmıştır. Bir aylık süre içerisinde 250 mililitre hacimli bir kültür kabında yaklaşık on milyon adet IJ üretimi gerçekleştirilmiştir. EPN’ lerin yapay ortamda üretimi konusunda bu çalışma milat olarak kabul edilmektedir.

Buecher ve Popiel (1989), sıvı kültürde EPN üretimi konusunda en eski çalışmalardan birini gerçekleştirmiştir. EPN olarak *S. feltiae* kullanılan çalışmada çeşitli tuzlardan, *Xenorhabdus bovienii* hücrelerinden ve kolesterolden oluşan özel bir ortam içerisinde EPN’ nin birinci dönem juvenilleri üretilmiş ve bakteri popülasyonunun artması ile birlikte EPN miktarının da arttığı tespit edilmiştir. En uygun ortamın Triptik Soya, Maya Ekstraktı ve kolesterol içeren bir ortam olduğu ve üretim sonunda toplam popülasyonun % 86’ sının IJ olduğu belirlenmiştir.

Günümüzde ticari olarak yaygın olarak kullanılan *in vitro* sıvı kültürde üretim metodunun temelleri Lunau ve ark. (1993) tarafından yapılan çalışma ile atılmıştır. Bu çalışma ile ilk kez *Heterorhabditis* ve *Steinernema* türlerinin monoksenik kültür kullanarak ticari anlamda *in vitro* sıvı kültür üretimi gerçekleştirilmiştir. Daha önceki çalışmalarda yüzey sterilizasyonu yapılan IJ’ ler, daha önceden bakteri inokule edilen ortamlara eklenmiş ve bu şekilde üretimi sağlanmıştır. Ancak bu tarz üretim sonucunda kültürler aksenik veya poliksenik olmaktadır. Bu nedenle ilk kez bu çalışmada yumurta içerisinde açılan ve bakteri içermeyen birinci juveniller kullanılmıştır. Bu tez çalışmasındaki yumurta izolasyonunun da kaynağı olan çalışmada, o güne kadar çoğunlukla hayvanların böbrek veya karaciğer ekstraktları kullanılarak katı ortamda üretim yapılmasına karşın, ilk kez sıvı ortam içerisinde üretim gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sayesinde EPN’ lerin sıvı

kültürde üretimlerinin önü açılmış ve ticari anlamda kitle üretimi gerçekleştirilmeye başlanmıştır.

Surrey ve Davies (1996), yaptıkları sıvı kültür çalışmasında *H. bacteriophora* için pilot çaplı sıvı kültür üretim ve hasat (harvest) yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada 20 ve 500 litrelik iki farklı hacimde biyoreaktör ve iki farklı ortam içerisinde üretim yapılmıştır. 20 litrelik biyoreaktörde 20 °C' de yapılan üretimde popülasyon miktarları ilk ortamda 100000 adet IJ' ye sırasıyla 15 ve 20 günde ulaşılmıştır. İkinci ortamda ise aynı popülasyon seviyesine ulaşması 45 güne kadar uzamıştır. İlk ortamda popülasyon çok kısa zamanda istenilen seviyeye ulaşmasına rağmen, birim başına maliyet açısından ikinci ortama göre üç kat fazla olduğu için olumsuz bir sonuç doğurmuştur. Üretilen nematodların sıvıdan ayrılması sırasında iki farklı santrifüj kullanılmış ve bu sırada bazı kayıplar meydana gelmiştir. Sonuç olarak çalışma sayesinde *H. bacteriophora* için sıvı kültürde üretim için pilot çaplı bir tesis kurulumu gerçekleştirilmiştir.

Strauch ve Ehlers (1998), yaptıkları çalışma ile *Photorhabdus luminescens* sayesinde oluşan besin sinyalinin sıvı kültürde üretilen *Heterorhabditis* türleri üzerine etkisini incelemiştir. Normal şartlarda IJ' lerden bir gün önce sıvı ortama eklenen simbiyotik bakteri ile monoksenik kültür üretimi gerçekleştirilmektedir. Ancak bakteri ile ilgili yaşanan bazı sorunlardan dolayı üretim verimlerinde ciddi düşüşler ortaya çıkmaktadır. Bunun sebebi incelendiğinde, bakterinin iki farklı fazında meydana gelen salgıların IJ gelişimine önemli etkide bulunduğu tespit edilmiştir. Simbiyotik bakteri tarafından salgılanan çeşitli biyokimyasal bileşikler sayesinde IJ' lerin sinyal olarak gelişimlerine devam ettikleri tespit edilmiştir. Yapılan incelemelerde bakterinin gelişim eğrisinin maksimum olduğu anlarda besin sinyalinin arttığı ve sıvı ortama eklenen IJ' lerin yaklaşık % 95' inin bir gün içerisinde gelişimlerine devam ettikleri belirlenmiştir. Ancak sıvı kültür üretimi sırasında bakteri gelen olumsuz gelişmelerin nedenleri için detaylı incelemelere ihtiyaç olduğu tespit edilmiştir.

Lipidlerin EPN üretimi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada Abu Hatab ve Gaugler (1999), katı ve sıvı kültürde üretim sırasında kullanılan lipid, sterol ve yağ asitleri kompozisyonunun etkileri karşılaştırılmıştır. Özellikle *Popillia japonica* larvalarından

elde edilen yağların da kullanıldığı denemelerde, IJ' lerin istatistiksel anlamda daha fazla yağ içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. *In vitro* ortamda üretilen IJ' lerdeki yağ asitlerinin daha çok linoleik olduğu, *in vitro* ortamlarda üretilenlerin ise stearik olduğu belirlenmiştir. Yapılan değerlendirmelerde, yapay ortamın lipid içeriğinin doğal konukçuların yapısına benzer oranda hazırlanması gerektiği tespit edilmiştir. Özellikle *H. bacteriophora* için hazırlanan ortamlarda karaciğer ekstraktı veya zeytinyağı kullanılarak sterol ve oleik asit miktarının artırılması gerektiği belirtilmiştir.

In vitro sıvı kültürde üretimde havalanma (aeriation) miktarının *H. megidis* üretimine etkisi Strauch ve Ehlers (2000) tarafından yapılan bir çalışma ile incelenmiştir. Denemeler on litrelik biyoreaktörlerde yapılmış ve 0.3 – 0.7 vvm havalanma seviyelerinde farklı üretimler gerçekleştirilmiştir. Tüm üretim süreçlerinde pervane dönüş hızı ve oksijen doygunluğu eşit tutulmuştur. Bakteri inokulasyonundan bir gün sonra IJ' ler biyoreaktörlere eklenmiş ve sekiz gün sonrasında ergin, 16 gün sonrasında ise IJ verimi incelenmiştir. Bakteri popülasyonu ve nematod gelişiminin havalanmadan etkilenmediği tespit edilmesine rağmen 16 gün sonunda en yüksek verim en yüksek havalanma oranında bulunmuştur. Bu sonuçlar, havalanma oranının IJ verimine doğrudan bir etkisinin olduğu ancak nedenlerin daha detaylı incelenmesi gerektiği belirtilmiştir.

Ehlers ve ark. (2000), *H. indica* - *P. luminescens* kompleksinin kitle üretim potansiyelini değerlendirdiği bir çalışma yürütmüştür. Hindistan' da şeker kamışında zararlı böceklere karşı biyolojik mücadelede kullanılması düşünülen *H. indica*, öncelikle katı ortamda monoksenik olarak üretilmiş ve daha sonra sıvı ortama aktarılmıştır. Yapılan denemelerde mililitrede yaklaşık 650.000 adet IJ üretimi başarılmıştır. Daha önce bu kadar yüksek bir verim elde edilmediği için genel olarak diğer ticari EPN türlerine göre maliyeti düşük bir tür olacağı belirtilmiştir. Farklı bakteriyel ırkların IJ verimi üzerine etki etmediği belirlenmiş, ancak sıcaklığın 25 °C' den 30 °C' ye çıkarılması ile inokule edilen IJ' lerden elde edilen hermafroditlerin sayısında ciddi bir azalma görülmüştür. Sıcaklığın artması ile hermafrodit sayısı azalmasına rağmen toplam verimde bir azalma görülmemiştir. Sıcaklık yükseldikçe simbiyotik bakterinin hücre yoğunluğu azalmış ve 38 °C üzerinde bakteri gelişimi durmuştur. Bakteri gelişimi durmasına rağmen kültürler aynı sıcaklıktan tutuldukça bakteri sıcaklığa uyum sağlamış ve 38 °C' de bile üremeye

devam etmiştir. Ancak 40 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda herhangi bir gelişme gözlemlenmemiştir.

Yoo ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışma ile *H. bacteriophora*'nın *in vitro* sıvı kültürde üretiminde lipid kaynağı ve konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. EPN'lerin yaşamlarının devamı için lipidlerin önemli olması nedeniyle lipidlerin kaynağı ve konsantrasyonu ile ilgili denemeler yapılmış, bu iki faktörün üretim verimine etki ettiği belirlenmiştir. Lipid oranlarının % 2.5' tan % 8' e çıkarılması ile üretim veriminde istatistiksel olarak önemli oranda artış sağlanmıştır. Lipid kaynağı olarak kanola ve zeytinyağı kullanılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde doymamış yağ asitleri içeren kaynakların nematod gelişime olumlu etki ettiği saptanmıştır.

Yoo ve ark. (2001) tarafından diğer bir çalışmada, *H. bacteriophora* türünden izole edilen simbiyotik bakteri olan *P. luminescens* türüne ait bir ırkın gelişiminin optimize edilmesi hedeflenmiştir. Bakteri gelişiminin optimizasyonu sırasında sıcaklık ve pH değerleri üzerinden denemeler gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemelerde bakteri gelişimi için en uygun sıcaklığın 30 °C ve en uygun pH aralığının 5.5 - 7.3 olduğu belirlenmiştir. Havalandırma oranını da incelendiği çalışmada, yüksek havalanma oranının bakteri gelişimine olumlu yönde etki ettiği ve bakteri yoğunluğunun artması ile birlikte nematod gelişiminin de arttığı tespit edilmiştir. Çalışma ile bakteri gelişiminin optimize edildiği ve bunun sonucunda *in vitro* üretim veriminin arttığı belirtilmiştir.

Han ve Ehlers (2001), *H. bacteriophora* ve *S. carpocapsae*'nin *in vivo* ve *in vitro* üretiminde simbiyotik bakteri *P. luminescens*'in faz değişimlerinin etkisini incelemiştir. *H. megidis*, *H. bacteriophora* ve *H. indica*'dan elde edilen üç farklı *P. luminescens* izolatu, sıvı ortam içerisinde bir gün önceden eklenmiş ve üremesi sağlanmıştır. Daha sonra aynı ortam içerisine *H. bacteriophora* ve *S. carpocapsae* IJ'leri eklenmiştir. *H. bacteriophora* kendi bakterisi ve *H. megidis*'ten elde edilen bakterinin birinci fazında (phase I) üremeyi başarırken, aynı bakterilerin ikinci fazında üretim gerçekleşmemiştir. Katı kültürde yapılan üretimde verim sıvı kültüre göre daha düşük olmuştur. *H. bacteriophora*, *H. indica*'dan elde edilen bakteride ergin olamamış ve üreyememiştir. *S. carpocapsae* IJ'leri *P. luminescens* bakterisinin hiçbir izolatının birinci fazında üremeyi

başaramamış, ikinci fazlarında ise çok az da olsa döl verebilmiştir. Çalışma sonuçları incelendiğinde, EPN'lerin üretimi için simbiyotik bakterinin önemli olduğu, bakterinin ürettiği bileşiklerin olumlu ve olumsuz etkilerin üreme verimini etkilediği belirlenmiştir.

Ehlers (2001) tarafından yapılan derleme ile EPN'lerin kitle üretimleri ile ilgili gelişmeler değerlendirilmiştir. IJ inokulasyonundan bir gün önce üretim ortamına simbiyotik bakteri inokule edildiği ve bu sayede EPN gelişimi için gerekli besin maddelerinin bakteri tarafından üretildiği belirtilmiştir. Üretimin yapıldığı biyoreaktörün şeklinin, kullanılan çalkalayıcı pervanenin, fiziksel koşullar vb. birçok etmenin verime etki ettiği ve önem verilmesi gerektiği üzerinde durulmuştur. En önemli problemlerin başında bakteride meydana gelen faz değişimleri ve gelişim eğrisi sorunları olduğu, bu sorunların ciddi anlamda verim ve maliyet kaybı meydana getirdiği tespit edilmiştir.

Abu Hatab ve Gaugler (2001) yaptıkları çalışmada, *in vitro* olarak üretilen *H. bacteriophora*'nın besin ve lipid içeriğinin üretime etkisini incelemişlerdir. Çalışmada belirtildiği üzere, birçok EPN türü ticari olarak üretilmesine karşın, üretilen nematodların kalitesi ve miktarı, ortamın içeriği, sıcaklık ve üretim şekli gibi etmenlere bağlıdır. Çalışma sonuçlarına göre böceklerden elde edilen lipidlerin üretim ortamına eklenmesi ile birlikte hayvansal yağlara göre yaklaşık iki kata kadar üretim veriminin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca lipid eklenmesi sayesinde üretim hızının da 1.7 kat civarında hızlandığı belirlenmiştir. Buna ek olarak hayvansal lipidlerle beslenen nematodlara göre böcek kaynaklı lipidlerle beslenen IJ'lerin lipid miktarları istatistiksel olarak daha fazla çıkmıştır. Deneme sonuçlarına göre *in vitro* üretimde konukçulardan elde edilen lipidlerin üretim ortamına eklenmesinin verim ve kalite üzerinde olumlu etki yaptığı belirlenmiştir.

Chavarría-Hernández ve De La Torre (2001) tarafından yapılan çalışmada, *S. feltiae* türü EPN iki farklı sıvı kültür içerisinde üretilmiş ve popülasyon dinamikleri incelenmiştir. Soya unu, yumurta sarısı ve maya ekstraktı kullanılan ilk ortam ile yumurta sarısı ve maya ekstraktı bulunan ikinci ortam içerisinde üretim yapılmış ve yedi gün sonunda bir mililitre içerisinde 200.000 adet civarında IJ üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen nematodların % 95'inin IJ olması da başarılı bir üretim olduğunun göstergesi olmuştur. Sonuçlar

değerlendirildiğinde maya ekstraktının konsantrasyonunun yüksek üretim verimi konusunda önemli bir faktör olduğu belirlenmiştir.

Gaugler ve ark. (2002), 1927 yılından beri kullanılan standart *in vivo* üretim yöntemi olan White Trap düzeneğinin yerine geçebilecek yeni bir üretim yöntemi olan LOTEK sistemini geliştirmiştir. Bu sistem sayesinde, küçük çaplı denemeler için kullanılan *in vivo* yöntemin büyük çaplı ticari amaçla da kullanılabilceği belirtilmiştir. LOTEK sayesinde düşük maliyetler kitle üretimi gerçekleştirilmiştir. Sistem sayesinde 48 saat içerisinde *G. mellonella* içerisinde çıkan IJ'lerin % 97' si toplanmış ve toplanan nematodun % 97.5 oranında kurutulduğu ve nematod konsantrasyonunun 81 kat arttığı belirtilmiştir. Bu sistem sayesinde laboratuvarında kullanılan White Trap yöntemine göre hem zamandan, hem alandan hem de maliyetten tasarruf sağlanarak etkin bir *in vivo* üretim yapılması sağlanmıştır.

Gil ve ark. (2002), glikoz desteğinin *H. bacteriophora*'nın *in vitro* sıvı kültürde üretimi üzerine etkisini incelemiştir. Başarılı bir *in vitro* üretimin en önemli parametresinin üretim sonundaki verim olduğu belirtilen çalışmada EPN'lerin beslenmesi için karbon kaynağı olarak kanola yağı ve glikoz kullanılmıştır. Üretim yapılan sıvı ortama eklenen 25 mg glikozun verimde ciddi bir artış sağladığı ve 12 gün sonunda mililitrede yaklaşık 400.000 adet civarı IJ elde edildiği belirtilmiştir. Ancak glikozun 75 mg ve üzerindeki dozları olumsuz etkide bulunmuş ve üretim veriminin düşmesine neden olduğu saptanmıştır. İki fazlı yapılan üretimde bakteri öncelikle sadece glikoz bulunan ortamda üretilmiş, bakteri gelişim eğrisi maksimum olduğunda ise kanola yağı eklenerek sonuçları incelenmiştir. Bu şekilde yapılan üretimde istatistiksel olarak önemli miktarda verim artışı sağlanmıştır. Çalışmanın sonuçları incelendiğinde, glikozun bakteri için, kanola yağının ise nematod için uygun bir karbon kaynağı olduğu belirlenmiştir.

Shapiro-Ilan ve ark. (2002) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, *in vivo* üretimde enfeksiyon oranının önemli olduğundan ve yüksek değerlere sahip olması gerektiğinden bahsedilmiştir. Bu amaçla *S. carpocapsae* ve *H. bacteriophora* türleri kullanılarak *G. mellonella* ve *T. molitor* larvaları üzerinde inokulasyon yöntemi, nematod konsantrasyonu ve konukçu sayısı ile ilgili ölçütler kullanılarak deneme

gerçekleştirilmiştir. Bu ölçütler değiştirilerek optimizasyon sağlanması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda nematodları konukçu böcek üzerine pipet ile inokule etmek yerine konukçu böceklerin nematodların bulunduğu solüsyona bırakılmasının dört kata kadar daha yüksek sonuçlar ortaya çıkardığı tespit edilmiştir. Ayrıca nematod konsantrasyonu arttıkça üretim veriminin arttığı, konukçu arttıkça azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışma aynı zaman konukçu yoğunluğunun etkinlik ve üretim üzerine etkisinin incelendiği ilk çalışma olarak kayıtlara geçmiştir. Sonuç olarak *in vivo* üretimde başarı sağlanması için üretim sürecinin optimize edilmesi gerektiği belirtilmiştir.

Shapiro-Ilan ve Gaugler (2002) tarafından yapılan bir derlemede, EPN'lerin üretim teknolojileri ile ilgili birçok veri hakkında detaylı bilgi verilmiştir. Derlemede EPN'lerin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda birçok yöntemle üretilbildiği belirtilmiştir. Daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi *in vivo* yöntemlerin genellikle ufak çaplı laboratuvar çalışmaları için, *in vitro* yöntemlerin ise daha çok ticari amaçlı olarak kullanıldığı tespit edilmiştir. *In vitro* katı ortam olarak agar veya sünger bazlı ortamlar kullanılırken, sıvı ortam olarak Erlenmeyer şişeleri veya büyük biyoreaktörler içerisinde sıvı veya jel ortamlar içerisinde üretim gerçekleştirilmektedir. *In vitro* sıvı üretimin ticari üretime en uygun yöntem olduğu belirtilirken, ortamın içeriği, fiziksel koşullar, biyoreaktör şekli, inokulum yoğunluğu gibi birçok faktörün üretimin geliştirilmesi için incelenmesi gerektiği konusunda fikir belirtilmiştir.

EPN'lerin *in vivo* üretiminde yeni bir tekniği geliştirildiği Brown ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, *in vivo* ve *in vitro* olarak katı ve sıvı kültürlerde üretilen EPN'lerin laboratuvar çalışmalarında kullanılabilecek yeni bir teknik ortaya çıkartılmıştır. Çalışmada *in vivo* yöntemlerin düşük maliyetle yapılabildiği, düşük teknoloji gerektirdiği ancak kitle üretim düşünüldüğünde maliyet olarak çok efektif olmadığı belirtilmiştir. Bunun yanında *in vivo* veya *in vitro* üretimde konukçu seçimi, üretimde kullanılan maddeler, çeşitli fiziksel koşullar vb. diğer etmenlerin üretim verimi ve üretilen IJ'lerin kalitesine etki ettiğinden bahsedilmiştir. EPN üretimi için birçok yöntem bulunmasına karşın ticari anlamda düşük maliyetli, uzun muhafaza ve lojistik koşullarına dayanıklı ve arazide etkinliği yüksek nematodlar elde edilmesinin gerektiği

ve bu nedenle üretim teknolojileri ve tekniklerinin sürekli olarak geliştirilmesi gerektiği tespit edilmiştir.

Johnigk ve ark. (2004), *H. bacteriophora*'nın sıvı kültürde üretiminde sıvı ortam içerisine IJ inokulasyon zamanlamasının önemi üzerine bir çalışma yapmıştır. Çalışmada monoksenik sıvı kültür üretimi yapılmış, sıvı ortam içerisinde simbiyotik bakteri inokulasyonu yapıldıktan bir gün sonra IJ'ler inokule edilmiştir. Ancak IJ'lerin besin sinyalini alıp hayat döngülerine devam etmesi konusunda ortaya çıkan sorunlar nedeniyle üretim verimi düşük kalmış ve ticari olarak kayıplar meydana gelmiştir. Bu nedenle IJ inokulasyon zamanlamasının üzerinde durulmuştur. Üretim sırasında sıvı ortamın pH değeri ve havalanma oranı sürekli olarak takip edilmiş ve IJ inokulasyonu için en uygun zamanlama belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan değerlendirmelerde bakterinin durağan faza (stationary phase) geçtiği dönemde yapılan IJ inokulasyonlarının düşük verimle sonuçlandığı belirlenmiştir. Havalanma oranının 0.8' in altına indiği ve pH değerinin maksimum olduğu anlarda yapılan inokulasyonlarda üretim veriminin arttığı belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en uygun IJ inokulasyon zamanının sıvı ortamın havalanma ve pH değerleri takip edilerek yapılabileceği belirlenmiştir.

Chavarría-Hernández ve ark. (2006) tarafından yapılan bir başka çalışmada, *S. carpocapsae*'nin peynir altı suyu (whey) içeren sıvı ortamda üretiminin modellenmesi yapılmıştır. İlk kez peynir altı suyu kullanılan çalışmada ortam içerisinde maya ekstraktı, yumurta sarısı, mineral tuzlar ve bitkisel yağ kullanılmıştır. Mililitre içerisinde 200.000 adet IJ üretilmiş ve 24 gün sonunda toplam popülasyonun % 64' ü IJ olmayı başarmıştır. Çalışma sonucunda simbiyotik bakteri olan *X. nematophila*'nın laktoz hidroliz kapasitesi olduğu belirlenmiştir.

Hirao ve Ehlers (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, sıcaklığın *S. carpocapsae* ve *S. feltiae* türü EPN'lerin sıvı kültürdeki üretimine etkisi incelenmiştir. Bir gün önceden simbiyotik bakterinin inokule edildiği sıvı ortamlar içerisine EPN türlerinin IJ'leri inokule edilmiş ve *S. carpocapsae* için 23-25-27-29 °C, *S. feltiae* için ise 20-23-25-27 °C'lerde üretim gerçekleştirilmiştir. Sıcaklıkların etkileri karşılaştırıldığında, sadece 29 °C' de *S. carpocapsae*'nin olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir. Anne içerisindeki

yumurtalar sayıldığında *S. carpocapsae* için en uygun sıcaklık 27 °C olmasına karşın IJ verimi hesaplandığında en uygun sıcaklığın 25 °C olduğu belirlenmiştir. Her iki EPN türü için de en yüksek IJ sayısı 15 gün sonunda elde edilmiştir. En uygun üretim sıcaklığı 25 °C olarak belirlenmiş, *S. carpocapsae*' nin uygun olmayan sıcaklıklara karşı *S. feltiae*' den daha hassas olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık değişimi arttıkça, elde edilen verilen varyasyonunun arttığı ve olumsuz sıcaklıkların IJ etkinliğini düşürdüğü belirlenmiştir.

Hirao ve Ehlers (2010) tarafından yapılan başka bir çalışmada, *S. carpocapsae* ve *S. feltiae* türün EPN' lerin sıvı kültürde üretiminde simbiyotik bakteri ve IJ inokulum yoğunluğunun etkisi incelenmiştir. Üretim sonunda elde edilen IJ sayısı baz alındığında IJ inokulum yoğunluğunun herhangi bir etkide bulunmadığı belirlenmiştir. Ancak ilk IJ' lardan oluşan erginlerin yumurta sayısı ve ilk döldeki dişilerden elde edilen yumurta sayıları arasında farklar olduğu belirlenmiştir. IJ inokulum miktarı arttıkça bazı üretimlerde verim artmasına rağmen bir noktadan sonra inokulum yoğunluğu ters etki yapmıştır. Sonuçlar incelendiğinde en uygun IJ inokulum yoğunluğunun mililitrede 5×10^3 IJ olduğu belirlenmiştir.

Hirao ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada monoksenik sıvı kültürde üretilen *S. carpocapsae* ve *S. feltiae*' nin yaşam döngüsü ve popülasyon gelişimi incelenmiştir. Her iki tür için de yapılan boy ölçümlerinde normal juvenil dönemler açısından bir fark oluşmamasına rağmen birinci neslin erginleri, IJ öncesi dönem (J2d) ve IJ açısından önemli oranda boy farkı meydana gelmiştir. *S. feltiae*' nin sıvı ortama eklenen IJ' lerinin % 90' ı ergin olmayı başarırken bu oran *S. carpocapsae* için % 77 seviyesinde kalmıştır. Genel olarak *S. feltiae* diğer türe göre bir gün daha erken ergin döneme geçmiştir. Bakteri popülasyonu üzerinde yapılan incelemelerde sıvı kültüre inokule edildikten sonra ergin nematodların gelişmesi ile birlikte ciddi bir azalma görülürken *X. bovienii* türünde on beş gün sonunda popülasyon bir artış gözlenmiştir. Çalışma sayesinde EPN' lerin sıvı kültürde üretimleri ilgili önemli veriler elde edilmiş ve ileriki çalışmalar için yararlı bilgiler sağlanmıştır.

El-Sadawy (2011), çalışmasında *Steinernema* türlerinin *in vitro* katı kültürde üretimleri üzerine araştırmalar yapmıştır. Çalışmasında *S. carpocapsae* DD136, *S. carpocapsae* All

Strain, *S. scapterisci*, *S. riobrave*, *S. abbasi* ve *S. glaseri* türlerini kullanmıştır. Çalışmada standart Wouts agarın modifiye edilmiş bir biçimi kullanılmış ve nematodlar altı nesil boyunca üretilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde bir kilogram ortam başına üç ila sekiz buçuk milyon IJ arasında üretim gerçekleştirilmiştir. Değiştirilen ortamın maliyetinin o dönemde kilogram başına yaklaşık iki buçuk \$ olduğu belirtilmiştir. Çalışma ile EPN' ler değiştirilmiş bir ortam içerisinde üretilmiştir.

Chavarría-Hernández ve ark. (2011), şekilleri farklı olan iki biyoreaktör içerisinde *S. carpocapse*' nin CABA01 izolatının kitle üretimi üzerine incelemeler yapmıştır. Fiziksel parametrelerinin çoğu aynı olan iki farklı üretimde, şekilleri çalkalanma mekanizmaları farklı olan biyoreaktörlerin üretime etkisi karşılaştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde ters kuvvet kullanılarak yapılan çalkalanmanın erkek ve dişi bireylerin birbirini bulmasının kolaylaştırdığı ve çiftleşme oranının artması ile verimin yükseldiği belirlenmiştir. Bu nedenle biyoreaktör şekli ve çalkalanma yönteminin üretime etki ettiği belirtilmiştir.

Sharma ve ark. (2011), potansiyel bir biyolojik mücadele ajanı olan EPN' lerin yapay ortamda üretimleri üzerine hazırladıkları derlemede kitle üretimi, ticarileşme ve kullanım konusuna değinmiştir. *In vitro* olarak süngere yerleştirilmiş bir protein kaynağı ile başlayan katı ortamda üretim sürecinin, köpük içerisinde üretim yapılması ile birlikte geliştiği belirtilmiştir. İlerleyen dönemlerde ise çeşitli kimyasallar kullanılarak hem üretim sürecinin kısaltıldığı, hem de verim artırılarak dolaylı yoldan maliyetin azaltıldığı belirtilmiştir. Sıvı ortamda üretimin ise kurulum maliyeti fazla olmasına rağmen en çok tercih edilen yöntem olduğundan bahsedilmiştir. Canlı ve cansız birçok etmenin kültüre etki ettiği ve sağlıklı bir üretim için bütün parametrelerin dikkatli bir şekilde incelenmesi gerektiği tespit edilmiştir.

Inman ve ark. (2012) tarafından hazırlanan bir derlemede en önemli EPN türlerinden biri olan *H. bacteriophora* ve simbiyotik bakteri *P. luminescens*' in kitle üretimi ile ilgili önemli bilgiler verilmiştir. Derlemede EPN' lerin geniş alanlarda kullanılabilmesi için *in vitro* üretimin çok önemli olduğunu ve büyük firmaların özellikle sıvı kültürde yaptıkları geliştirmeleri paylaşmayarak EPN gelişim sürecini yavaşlattıklarını belirtmiştir. Maliyet

bakımında sıvı kültür üretiminin en iyi yöntem olduğu ancak ilk kurulum bedelinin çok fazla olduğu tespitinde bulunmuştur.

Ferreira ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada *H. zealandica* türü EPN' nin *in vitro* sıvı kültürdeki üretimi incelenmiştir. Üretim parametreleri olarak IJ' lerin miktarı ve boy uzunluğu olarak seçilmiştir. Üretim başladıktan 15 gün sonra mililitrede 41.000 adet IJ ile en yüksek verim elde edilmiştir. Üretim 16'ncı günde sonlandırılmış ve *G. mellonella* üzerinde yapılan denemelerde etkinliğin *in vivo* yöntemle üretilen nematodlarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda yeni tespit edilen bir tür olan *H. zealandica*' nın *in vitro* sıvı kültürde üretim kapasitesinin olduğu fakat üretimin geliştirilmesi gerektiği belirtilmiştir.

Van Zyl ve Malan (2014), yaptıkları çalışma ile EPN' lerin *in vivo* üretiminde inokulasyon tekniğinin optimizasyonu ve konukçu etkileşimini incelemişlerdir. Konukçu böcek olarak *G. mellonella* ve *T. molitor*, EPN türü olarak *H. bacteriophora* ve *H. zealandica* kullanılan çalışmada üç farklı inokulasyon yöntemi karşılaştırılmıştır. En yüksek etkinlik pipet yardımı ile EPN' lerin konukçulara inokule edildiği yöntemde bulunurken, bu yöntemi konukçuların EPN bulunan süspansiyona daldırılması izlemiştir. En düşük etkinlik ise konukçuların EPN bulunan süspansiyonda çalkalanmasında tespit edilmiştir. Ancak çalışmanın genelinde daha önceki yöntemlere göre daha yüksek bir etkinlik tespit edilememiştir.

Leite ve ark. (2016) tarafından yapılan bir başka çalışmada, *S. feltiae* türü EPN' nin *in vitro* kültürde üretiminde inokulum yaşı ve fiziksel parametrelerin etkisi değerlendirilmiştir. Katı, sıvı ve bifazik ortamda yapılan denemelerde inokulum yaşının, ortam viskozitesinin, şişe hacminin ve havalanma hızının üretime etkisi incelenmiştir. Denemelerde inokulum yaşı olarak 7-14-21-28 gün kullanılmıştır. Buna ek olarak iki farklı ortam (agarsız ve düşük agarlı), iki farklı hacimli şişe (250 ve 150 mililitre) ve iki farklı çalkalama hızı (180 ve 280 devir/dakika) kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar incelendiğinde sıvı kültürün verim olarak katı ve bifazik ortamlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak sıvı ortama bir miktar agar eklenmesi ve çalkalama hızının artırılması ile nematod gelişimi ve üretim veriminin artırılacağı, bu

üretim şeklinin sadece şişelerde değil biyoreaktörlerde de gerçekleştirilebileceği belirlenmiştir.

Ferreira ve ark. (2016) tarafından başka bir çalışmada, *S. yirgalemense* türü EPN' nin sıvı kültürde gelişme ve popülasyon dinamikleri ile simbiyotik bakterisi olan *X. indica*' nın gelişme karakteristikleri incelenmiştir. Ticari üretiminin yapılma potansiyeli olan bu tür için sıvı kültürde üretim parametrelerinin belirlendiği çalışmada, bu tez çalışmasına benzer şekilde önce EPN türünün monoksenik kültürü oluşturulmuş ve daha önceden bakteri inokule edilen sıvı ortama IJ' ler eklenerek sıvı kültürde üretim gerçekleştirilmiştir. Yapılan incelemelerde *S. yirgalemense*' nin sıvı ortama eklendikten sonra yaklaşık iki hafta içinde maksimum verime ulaştığı ve mililitrede 75.000 adet IJ bulunduğu belirtilmiştir. Simbiyotik bakteri ile ilgili yapılan incelemelerde bakteri inokulasyonundan 15 saat içerisinde maksimum gelişme eğrisi yakalandığı, 42 saat içerisinde ise durağan faza geçiş yaptığı tespit edilmiştir. Çalışma sayesinde *S. yirgalemense* türü EPN' nin ticari olarak üretilme potansiyeli ve sıvı kültürde üretim için önemli fiziksel koşulların belirlenmesi konusunda aşama kaydedilmiştir.

Addis ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, *S. yirgalamense* türü EPN' nin yaşam parametreleri, sıvı kültür üretimi ve muhafaza sıcaklığı üzerinde araştırma yapılmıştır. Çalışmada kullanılan *S. yirgalamense* hem gelrite adı verilen bir ortamda hem de sıvı içerisinde üretilmiştir. Üretimde simbiyotik bakteri *X. bovienii*' nin üç farklı inokulum yoğunluğu ve üç farklı sıcaklık kullanılmıştır. En uygun üretim sıcaklığının 25 °C olduğu belirlenirken, muhafaza sıcaklığı etkisinin değerlendirildiği denemelerde 15 ve 25 °C' de muhafaza edilen EPN' lerin 66 gün sonunda yaklaşık % 95' inin canlı kaldığı tespit edilmiştir. Denemelerden birçok veri elde edilmesine karşın ileriki çalışmalar için daha fazla araştırma yapılması gerektiği belirtilmiştir.

Ramakuwela ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *S. innovationi*' nin *in vitro* katı ortamda üretimi ve üretim maliyetinin analizi incelenmiştir. Gelişen teknoloji ile birlikte EPN üretim maliyetlerinin azaltılması ve bu sayede tüketici tarafından satın alınabilir düzeyde bir ürün elde etme amacıyla katı ortamlar içerisinde EPN üretimi gerçekleştirilmiş ve bu ortamların maliyetleri karşılaştırılmıştır. Kanola yağı ile birlikte

Musca domestica larvasının püresinin kullanıldığı altı farklı ortamda 28 gün sonunda beş gram katı ortam başına yaklaşık 800.000 adet IJ üretimi gerçekleştirilmiştir. Minimum sayıda ölü IJ (< % 10) ve ergin nematod sayısının elde edildiği bu ortamın, ticari EPN ürünleri satan birçok firmanın üretim maliyetlerinden çok daha ucuz olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, büyük çapta ticari üretim için gerekli olan yatırımların aksine nispeten ucuz olan üretim ortamları ile Erlenmeyer şişeleri içerisinde üretim yapılabileceği ortaya çıkmıştır.

Kassab ve Entsar (2016) tarafından yapılan ve EPN'lerin ekstraksiyon ve *in vivo* üretimleri üzerine yeni yaklaşımların incelendiği çalışmada, sünger bazlı tuzakların EPN'lerin *in vivo* üretiminde standart White Trap düzeneğine göre daha kolay olduğu ve EPN'lerin 12 haftaya kadar canlı kalmasını sağladığı tespit edilmiştir. Sünger bazlı tuzakta *G. mellonella* larvalarının beslenebilmesi için arı peteği ve bir miktar parafinik yağ bulunan iki ayrı ortam kullanılmıştır. Parafinik yağ kullanılan ortamda larvalar son dönem oluncaya kadar beslenmiş ve gelişmelerini tamamlamıştır. Parafinik yağ bulunan sünger bazlı tuzağa *H. bacteriophora* ve *S. carpocapsae* türü EPN'lerin bulaştırılması ile larvalarda % 100 oranında ölüm gözlenmiş ve yapılan incelemelerde standart arı peteği bulunan ortama göre başlangıç popülasyonu, final popülasyonu, üreme oranı ve etkinlik gibi parametlerde üstünlük kurmuştur. Bu yeni yöntem sayesinde ekstraksiyon, üretim ve depolama için yüksek yatırım yapmadan minimum emek ile başarı sağlandığı tespit edilmiştir.

Testa ve Shields (2017) tarafından ve EPN'lerin *in vivo* yöntemle kitle üretimleri üzerine araştırmalar yapılan çalışmada, *G. mellonella* ile yapılan standart *in vivo* üretim tekniği modifiye edilmiş ve düşük işgücü gerektiren yeni bir yöntem ortaya konmuştur. Bu yöntemde, bazı ülkelerde balık yemi olarak da satılan ticari *G. mellonella* ürünleri kullanılmıştır. Çeşitli hacimlerde (250-500 mililitre) içerisinde talaş ve belli adetlerde *G. mellonella* larvası bulunan kutulara larva başına 50 adet IJ gelecek şekilde uygulama yapılmış ve enfekte olan larvalardan çıkan IJ'ler iki hafta boyunca hiçbir işlem yapmadan canlılıklarını koruyabilmiştir. Bu yeni yöntem sayesinde laboratuvar şartlarında herhangi bir larva üretimi yapmadan hazır ürün kullanılarak çok daha az gider ve işgücü ile

milyonlarca nematod üretilmiştir. Yapılan çalışmada sekiz yıl içerisinde 100 milyar adedin üzerinde EPN retimi gerçekleştirildiği belirtilmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan EPN Irkı

Çalışmada, entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae) türüne ait HBH hibrit ırkı kullanılmıştır. Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Nematoloji Laboratuvarı'nda 2010-2013 yılları arasında yürütülen TÜBİTAK projesi kapsamında (TOVAG 110O161), Türkiye' nin farklı coğrafik bölgelerinde elde edilmiş farklı *H. bacteriophora* izolatları hibritlenmiş ve üstün özelliklere sahip HBH hibrit ırkı elde edilmiştir. Yüksek sıcaklığa dayanım, yüksek üreme kapasitesi ve yüksek etkinlik gibi özelliklere sahip bu hibrit ırk, Türk Patent ve Marka Kurumu tarafından 2018 yılında patent almıştır (Patent No: TR 2013 06141 B). Üstün özelliklere sahip olmasının yanında, dünya genelinde yaygın bir EPN türüne bağlı olması, ülkemize adapte olmuş izolatlar kullanılarak elde edilmesi ve gelecekte EPN kullanımının artması ile birlikte üretimi yapılabilecek ticari bir ırka ihtiyaç duyulma ihtimali nedeniyle HBH hibrit ırkı seçilmiştir.

3.2. *Galleria mellonella* Larvalarının Üretimi

Laboratuvar, sera ve küçük çaplı arazi denemeleri için yapılan *in vivo* EPN üretimlerinde petek güvesi olarak adlandırılan *G. mellonella* larvasının son dönemi kullanılmıştır (Şekil 3.1). EPN' lere hassas olması, birçok larvaya oranla iri olması ve laboratuvar şartlarında üretimi kolay olduğu için *G. mellonella* larvası tercih edilmiştir (Akhurst ve Bedding 1975). İçerisinde kepek, mısır unu, soya unu, süt tozu, maya, bal ve gliserin bulunan bir besin ile beslenen larvalar, bir litre hacimli cam kavanozlar içerisinde yetiştirilmiştir (Şekil 3.2). Ortam sıcaklığına göre değişmekle birlikte yaklaşık 1.5 ayda yeni nesil veren güvenin üretimi düzenli olarak devam etmektedir. Etüv içerisinde yetiştirilen larvalarda ihtiyaca göre sıcaklık ayarlaması yapılarak düzenli biçimde larva temini sağlanmıştır (Şekil 3.3).



(Ulu ve Susurluk)

Şekil 3.1. *Galleria mellonella* larvaları



(Ulu ve Susurluk)

Şekil 3.2. Larvaların yetiştirildiği besin dolu kavanozlar

(Ulu ve Susurluk)



Şekil 3.3. Etüv içerisinde yer alan kavanozlar

3.3.Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ortamlar

Çalışmanın ana konusu *in vitro* üretim olmasına karşın, üretim yapabilmek için ön işlemler de dâhil olmak üzere birçok ortam ve kimyasal madde kullanılmaktadır. Katı ortamlar 6 cm çaplı steril plastik petriyelerde hazırlanmış ve her bir petri içerisine yaklaşık 15 gr ortam dökülmüştür. Sıvı ortamlar ise 250 ml hacimli Erlen şişelerinde yaklaşık 70 ml sıvı ortam olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan ortamların içerikleri aşağıda belirtilmiştir.

Ringer Solüsyonu

9.0 g	NaCl
0.42 g	KCl
0.37 g	CaCl ₂ * 2 H ₂ O
0.2 g	NaHCO ₃
1 l	distile su

Wouts Agar

16.0 g	Bacto® Nutrient Broth
12.0 g	Bacto® Agar
5.0 g	Ayçiçek yağı
1 l	distile su

NBTA Agar

37.0 g	Standard-I-Nutrient Agar
25.0 mg	Bromtimol mavisi
4.0 ml	2,3,5-Triphenyl-tetracolumchloride solüsyonu (1%, steril filtrelenmiş)
1 l	distile su

YS Ortamı

5.0 g	Maya ekstraktı
5.0 g	NaCl
0.5 g	NH ₄ H ₂ PO ₄
0.5 g	K ₂ HPO ₄
0.2 g	MgSO ₄ * 7 H ₂ O
1 l	distile su

Sterilizasyon Solüsyonu

0.5 ml	Sodyumhipoklorit NaOCl (12%)
1.5 ml	4 mol. NaOH
10 ml	distile su

3.4.HBH Hibrit Irkının *In Vivo* Üretimi

Çalışmada planlanan denemelere başlamadan önce EPN kültürleri sürekli olarak yenilenmiş ve buzdolabında 4 °C' de muhafaza edilmiştir. Kültür yenileme işlemleri 24 kuyulu hücre kültürü kaplarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Kuyuların her birine bir adet *G. mellonella* larvası konmuş ve üzerleri % 10 neme sahip ince taneli kum ile doldurulmuştur. Kaplar hazırlandıktan sonra her bir larva başına yaklaşık 100 adet IJ gelecek şekilde EPN inokulasyonu yapılmış ve kaplar parafilm ile kapatılarak 24 °C' de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.5). İnokulasyonu takip eden yaklaşık 3 – 4 gün içerisinde larvalar ölmüş ve ölen larvalar (kadavra) White Trap adı verilen düzeneğe yerleştirilmiştir (Şekil 3.6). White Trap düzeneğinde 2 hafta boyunca IJ çıkışları izlenmiş ve yeterli miktarda çıkış gözlemlendiğinde çıkan bireyler kültür kaplarına alınarak buzdolabına yerleştirilmiştir (Şekil 3.7).

(Ulu ve Susurluk)



Şekil 3.4. İnokulasyonun yapıldığı 24 kuyulu (well) hücre kültürü kabı

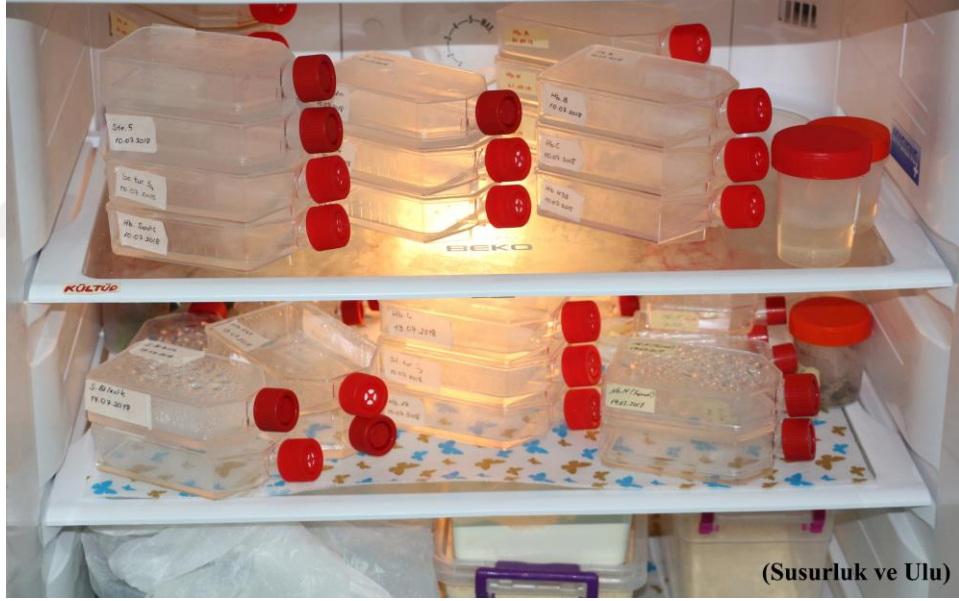
(Ulu ve Susurluk)



Şekil 3.5. İnokulasyon sonrası parafilm ile kapatılan ve inkübasyona bırakılan kaplar



Şekil 3.6. White Trap düzeneğindeki kadvralar



Şekil 3.7. Buzdolabında saklanan kültür kapları

3.5.HBH Hibrit Irkının Yumurta İzolasyonu

EPN' lerin *in vitro* sıvı ve katı ortamlarda kitle üretimi yapılabilmesi için yumurta izolasyonu adı verilen bir ön işlem gerekmektedir. Bu işlemde hermafrodit veya dişi bireylerin döllenmiş yumurtaları izole edilerek steril ortamda açılması ve belli bir süre gelişmesi amaçlanır. Bu işlem için her larva başına 100 adet IJ gelecek şekilde HBH hibrit

ırkı ile inokulasyon yapılmıştır. İnokulasyonlar, *in vivo* üretimdekine benzer şekilde 24 kuyulu hücre kültürü kaplarında ince taneli kum kullanılarak yapılmıştır. İnokulasyon sonrasında kaplar parafilm ile kapatılarak 24 °C’ de inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyonu takip eden 3-4 gün içerisinde larvalar sürekli kontrol edilmiş ve hermafroditlerin gelişme süresi dikkate alınarak en uygun zamanda kadavralar kaplardan çıkartılarak kumdan temizlenmiştir (Şekil 3.8). Kadavralar iğne ve pens yardımı ile Ringer solüsyonu ile dolu bir petri kabında disekte edilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Kumdan temizlenen kadavralar



Şekil 3.9. Disekte edilen kadavradan çıkartılan hermafroditler

Hermafroditler toplanmadan önce bir iki tanesi mikroskop altında incelenmiş ve yumurtaların döllendiği tespit edilmiştir (Şekil 3.10). Bu işlemden sonra diseksiyon sırasında kadavra içerisinden çıkartılan hermafrodit bireyler dikkatlice temiz Ringer solüsyonu bulunan bir beher içerisine alınmıştır. Yaklaşık 200 adet hermafrodit toplandıktan sonra laboratuvar tüpü içerisine alınmış ve yüzeyleri kadavra artıklarından temizleninceye kadar Ringer solüsyonu ile yıkanmıştır (Şekil 3.11). Hermafroditlerin yüzey yıkama işlemi tamamlandıktan sonra tüpün içerisine pense ile ufak parçalara bölünmüş zımba teli veya jilet konarak vorteks veya manyetik karıştırıcı üzerinde hermafroditlerin parçalanması sağlanmıştır. Bu sayede parçalanmış hermafroditlerin içerisinde yer alan yumurtalar açığa çıkmıştır. Hermafroditlerin yumurtalarının çıkartılması sırasında yüksek hız kullanmak veya süreyi uzun tutmak yumurtaların da parçalanmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle parçalama işleminden önce şeffaf bir yapıya sahip olan Ringer solüsyonu beyaz renge döndükten sonra parçalama işlemi tamamlanmıştır. Açığa çıkan yumurtalar 70 µm elek yardımı ile hermafrodit artıklarından filtrelenmiş ve farklı bir tüpün içerisindeki temiz Ringer solüsyonuna konmuştur.



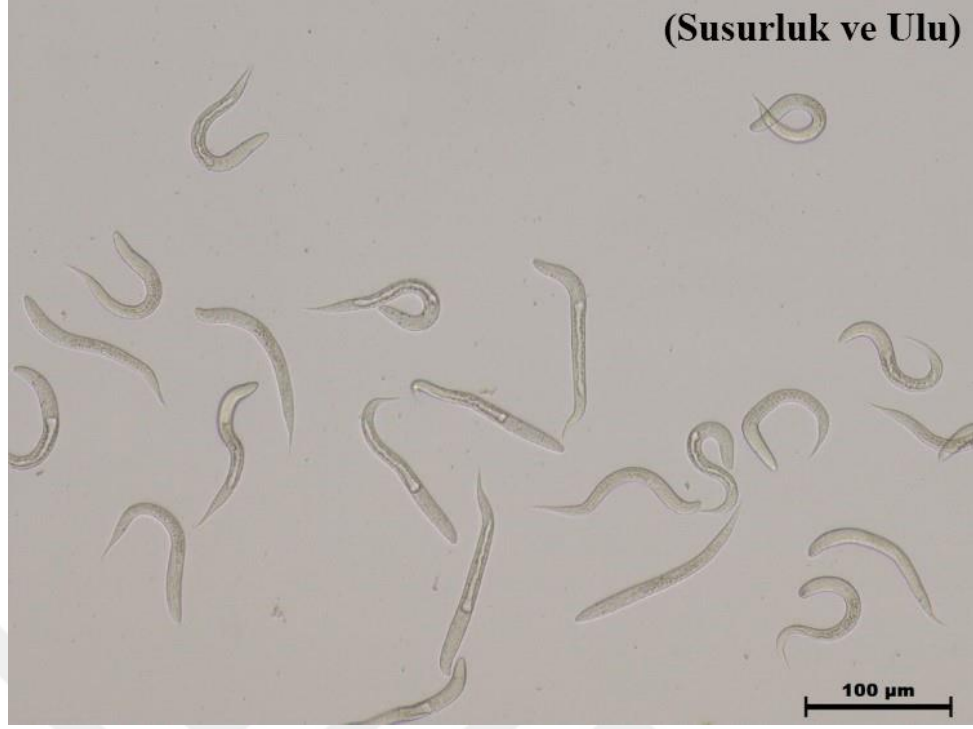
Şekil 3.10. Mikroskopta kontrol edilen döllenmiş yumurtalar



Şekil 3.11. Tüp içerisinde Ringer solüsyonu ile yıkanan hermafroditler

Yumurtalar elde edildikten sonra bu kez yumurtaların yüzeyinin temizlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, tüpte yer alan yumurtalar 1.5 mililitre hacimli santrifüj tüpleri içerisine eşit oranda bölüştürülmüştür. Tüpler 2000 devir/dakika hızında bir dakika boyunca santrifüj edilmiş ve çöken yumurtaların (pellet) üzerindeki sıvı (supernatant) pastör pipeti yardımı alınarak üzerinde temiz Ringer solüsyonu eklenmiştir. Bu işlem

supernatant tamamen temiz olana kadar tekrar edilmiştir. Bu işlem sırasında az da olsa yumurtaların bir kısmı kaybedilmektedir. Bu nedenle işlemi çok fazla tekrar etmek yumurtaların tamamen kaybedilmesine ve sonraki aşamalara geçilememesine neden olmaktadır. Yumurtaların yüzeyi temizlendikten sonra sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlem için en son santrifüjden sonra supernatant tamamen temizlenmiş ve tüplerin içine hazırlanan sterilizasyon solüsyonu eklenmiştir. Sterilizasyon işlemi yaklaşık yedi dakika sürmektedir. Bu işlemin bir dakika kısa yapılması durumunda ileriki aşamalarda kontaminasyon problemi ortaya çıkarken bir dakika uzun yapılması durumunda yumurtalar ölmektedir. Sterilizasyon solüsyonu eklendikten sonra dört dakika boyunca tüpler çalkalanmış ve daha sonra 2500 devir/dakika hızında iki dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Çöken yumurtaların üzerinde kalan supernatant (sterilizasyon solüsyonu) steril kabin içerisinde steril bir pastör pipeti ile alınmış ve üzerine steril besin ortamı eklenmiştir. Tüplerin içerisinde bulunan yumurtalar son kez santrifüj edilmiş ve çöken yumurtalar steril kabin içerisinde steril hücre kültür kaplarına alınmıştır. Parafilm ile kapatılan kaplar 24 °C' de üç gün süre ile inkübasyona bırakılmış ve yumurtaların sağlıklı bir biçimde açılması beklenmiştir (Şekil 3.12). Santrifüj işlemi sırasında çevirme hızının 4000 devir/dakika üzerine çıkması EPN' leri olumsuz etkilemeye başlamaktadır. Bu nedenle, santrifüj işlemleri sırasında daha hassas çalışılmıştır.



Şekil 3.12. İnkübasyon sonunda sağlıklı bir şekilde gelişen ve yumurtadan çıkan birinci dönem juveniller

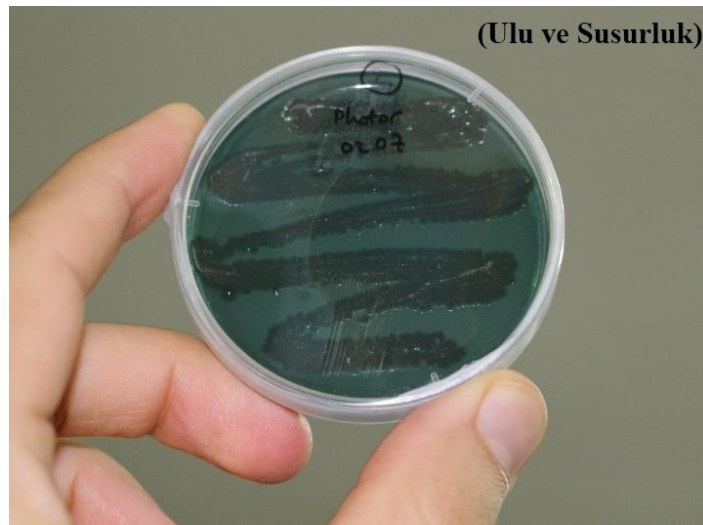
3.6.HBH Hibrit Irkının Bakteri İzolasyonu

EPN'lerin biyolojisi gereği, konukçu böceğin öldürülmesi ve yaşamlarının devamı için simbiyotik bakteriye ihtiyaç duyulmaktadır. Yumurta izolasyonu ile elde edilen yumurtalardan çıkış yapan birinci dönem juvenil bireylerde bakteri bulunmamaktadır. Yumurta izolasyonuna ek olarak, EPN'lerin *in vitro* üretiminde diğer bir işlem de bakteri izolasyonudur. Bu işlem için, yumurta izolasyonuna benzer şekilde her bir *G. mellonella* larvası üzerinde 100 adet IJ gelecek şekilde inokulasyon yapılmış ve hücre kültürü kapları 24 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyonu takip eden 24-36 saat içerisinde hareketleri yavaşlayan ve ölmek üzere olan larvalar kum içerisinde çıkartılarak % 95' lik etil alkol içerisinde beş dakika bekletilmiştir. Bu sayede yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen larvalar steril kabin içerisinde kurutulmuş ve bakteri izolasyonu işlemi için hazır hale getirilmiştir. Kurutulan larvalar, steril bir iğne yardımı ile intersegmental zar veya abdomen bacakları üzerinden delinmiş ve hemolimfin delikten çıkması sağlanmıştır (Şekil 3.13). Çıkan hemolimf steril bir öze yardımı ile NBTA agara sürülmüş ve agarlar parafilm ile kapatılarak 24 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Simbiyotik

bakterinin ilk olarak katı ortamda üretilmesinin amacı, izolasyon sırasında istenmeyen mikroorganizmaların tespiti ve henüz agar ortamındayken elemine edilmesidir. Agar üzerinde bakteri kolonileri oluşmaya başladığında (Şekil 3.14) öze yardımı ile kolonilerden bir miktar alınarak YS ortamına konmuş ve sıvı ortam içerisinde bakteri üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.15). Sıvı ortama aktarılmadan önce agar yüzeyinde koloni şekli, rengi ve biyoluminesans özelliği, mikroskop altında ise hücre şekli ve boyu gibi özellikler sayesinde simbiyotik bakteri teşhis edilmiştir.



Şekil 3.13. Bakteri izolasyonu için steril iğne yardımı ile delinen larva



Şekil 3.14. NBTA agar üzerinde üretilen bakteri kolonileri



Şekil 3.15. Sıvı YS ortamı içerisinde üretilmiş bakteri

3.7.Katı Kültürlerin Oluşturulması

EPN'lerin *in vitro* olarak üretimleri genellikle monoksenik kültür şeklinde yapılmaktadır. Monoksenik kültür, iki farklı organizmadan (EPN ve simbiyotik bakterisi) başka canlının yer almadığı kontrollü üretim şekli olarak özetlenebilir. EPN biyolojisi nematodun kendisi ve simbiyotik bakteri olmak üzere iki etmenden oluşmaktadır. Bu nedenle üretimde yumurta ve bakteri izolasyonu olarak iki farklı işlem gerçekleştirilmektedir. *In vitro* üretimi yapılacak HBH hibrit ırkının yumurta izolasyonu işlemi sonunda yumurtalar sağlıklı biçimde açılmış ve herhangi bir bulaşma olmamıştır. Bu sırada bakteri izolasyonu da gerçekleştirilmiş ve sıvı ortam içerisinde simbiyotik bakteri üretilmiştir. *In vitro* katı ortamda kullanılan standart Wouts agarlar üzerine, sıvı içerisinde üretilen bakterilerden yaklaşık altı damla (100 µl) damlatılmış ve bir gün boyunca bakterinin Wouts agar üzerinde üremesi sağlanmıştır (Şekil 3.16). Bakteri üremesi gerçekleştikten sonra, daha önceden izole edilen ve sağlıklı biçimde açılan yumurtalardan çıkan yaklaşık 500 adet birinci dönem juvenil (J1), Wouts agarda üretilen bakterilerin üzerine konmuştur. EPN'ler simbiyotik bakterinin ürettiği bileşikler ile beslendikleri için agardaki bireyler bakteri

ile karşılaştıklarında besin sinyalinin almış ve üremeleri sağlanmıştır. Bu işlem sayesinde EPN'ler *in vitro* katı ortam üzerinde üretilmiştir (Şekil 3.17, Şekil 3.18).

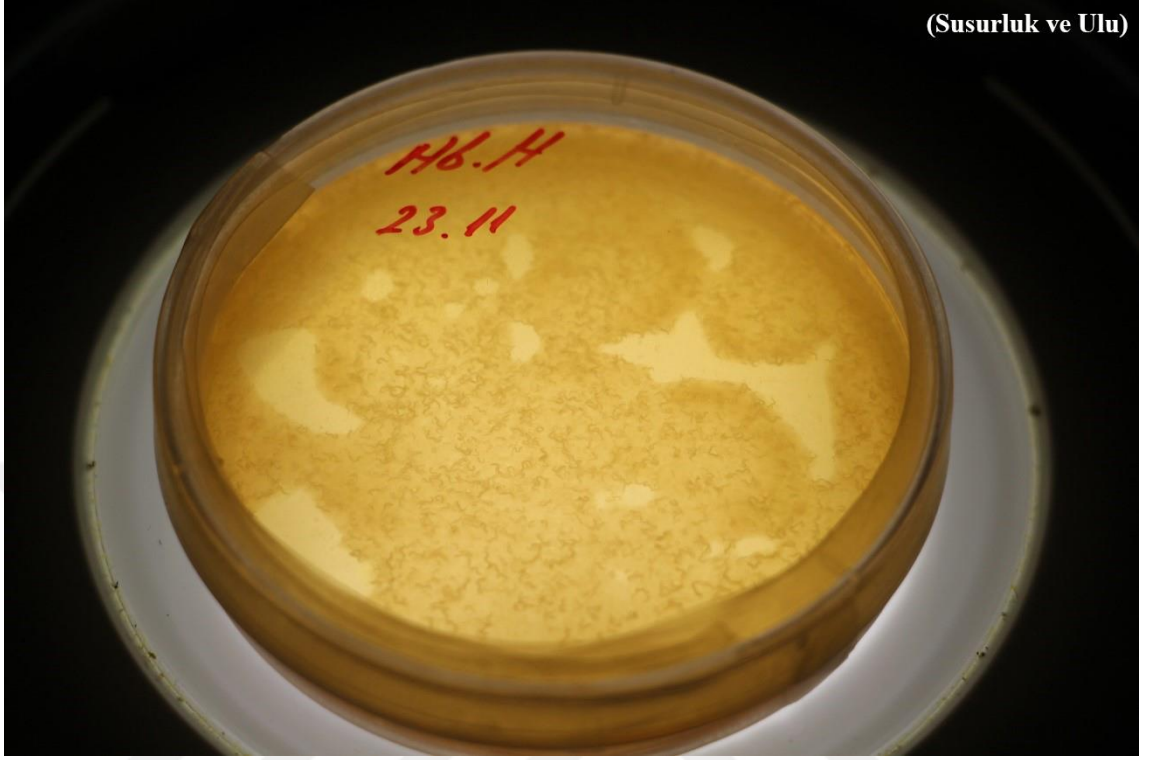


Şekil 3.16. Wouts agar üzerinde üretilmiş bakteriler

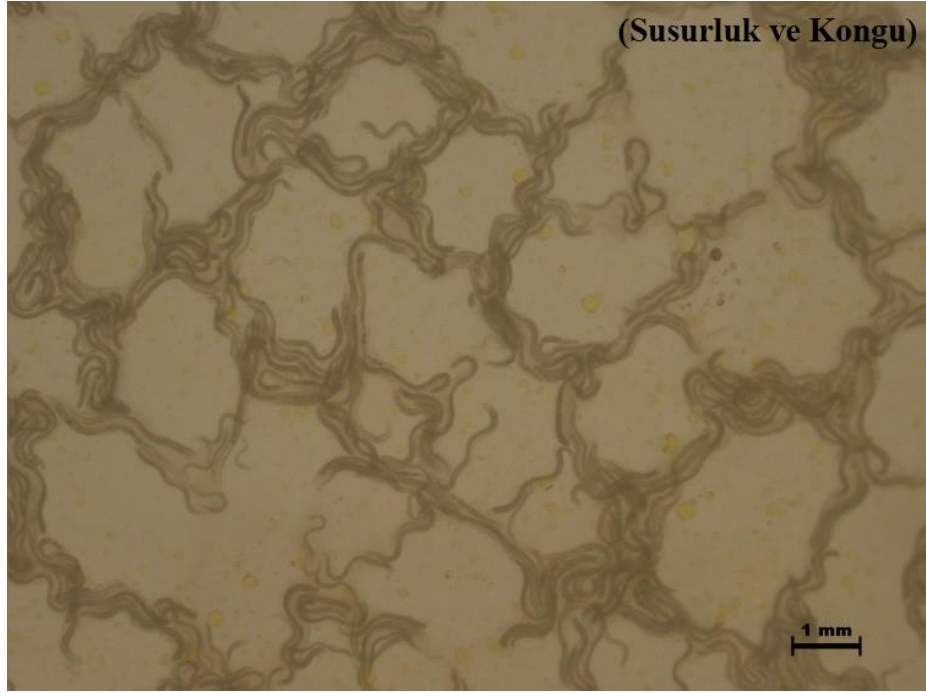
3.8.Ortam İçeriğinin Belirlenmesi için Yapılan Ön Denemeler

Ortam içeriklerini belirlemek için tez çalışmasından önce daha ufak çaplı bir ön deneme gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yumurta ve bakteri izolasyonu gerçekleştirilen HBH hibrit irki, içerisinde lesitin, yumurta sarısı ve lesitin + yumurta sarısı kullanılan *in vitro* katı kültür ortamlarında üretilmiştir. Agarlar üzerinde IJ eklenmesini takip eden birinci haftadan itibaren başlamak üzere birer hafta aralıklı toplam üç adet sayım yapılmıştır. Sayımlardan önce petrilerin kapağına çıkış yapan IJ'ler steril kabin içerisinde steril saf su ile yıkanmış ve sayım kaplarına alınmıştır. Petrilerde üretim sona erene kadar denemeler devam ettirilmiş ve yeni IJ çıkışı gözlemlenmediği dönemde tüm agarlar yıkanarak toplam IJ sayısı hesaplanmıştır. Ancak üretim süreci devam ederken petrilerin kapağının açılması, steril ortam şartlarında gerçekleştirilse dahi olumsuz sonuçlara neden

olmuştur. Bu nedenle tez çalışmasının denemelerinde ara sayımlar yerine üretimin sonunda tek bir sayım olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.17. EPN üretimi gerçekleştirilen petriler



Şekil 3.18. Agar üzerinde üreyen hermafroditlerin mikroskop görüntüsü

3.9. Üretim Optimizasyonunda Kullanılan Ölçütler

3.9.1. Ortam içerikleri

Standart Wouts agar içeriğinde kullanılan maddelere ek olarak protein kaynağı olarak yumurta sarısı ve yağ kaynağı olarak soya lesitini kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak standart Wouts agar kullanılırken, belirli oranda yumurta sarısı, lesitin ve ikisini birlikte içeren üç ortam daha hazırlanmıştır. Kullanılan ortamların içerdiği kimyasallar ve miktarları Tablo 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Denemelerde kullanılan ortamların içerikleri (100 ml için)

	W	WL	WE	WLE
Nutrient Broth	1.6 g	1.6 g	1.6 g	1.6 g
Agar	1.2 g	1.2 g	1.2 g	1.2 g
Ayçiçek Yağı	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Yumurta Sarısı	-	-	0.5 g	0.5 g
Lesitini	-	0.5 g	-	0.5 g

W: Wouts | WL: Wouts + Lesitin | WE: Wouts + Yumurta Sarısı | WLE: Wouts + Lesitin + Yumurta Sarısı

3.9.2. Sıcaklık

EPN türlerinin farklı sıcaklıklara farklı adaptasyonlar sağlaması ve biyolojilerinde farklılıklar göstermesi nedeniyle 24, 28 ve 32 °C’ lerde üretimler gerçekleştirilmiştir. Üç farklı etüv, belirlenen sıcaklıklara ayarlanmış ve ortam sıcaklığı istenilen düzeye ulaştıktan sonra denemelere başlanmıştır.

3.9.3. pH

Bakterinin üremesi sırasında pH değeri özellikle önem taşımaktadır. EPN’ lerin bakterileri de kendine özgü karakteristiklere sahiptir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda, farklı pH değerlerinde simbiyotik bakterilerin farklı metabolitler salgıladığı tespit edilmiştir (Yoo ve ark. 2001, Cabral ve ark. 2004). Bu nedenle ortamlar hazırlanırken pH 5, 7 ve 9 değerlerinde üç farklı ortam hazırlanmıştır. Ortamların pH

değerlerinin hazırlanmasında pH düşürücü olarak askorbik asit, yükseltici olarak ise sodyum bikarbonat kullanılmıştır. Bu kimyasallar, EPN' ler üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olmaması nedeniyle seçilmiştir.

3.10. Deneme Deseni

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Dört farklı üretim ortamı, üç farklı sıcaklıkta, üç farklı pH değerinde üretilmiş, her bir üretim için ilk aşamada on adet petri kullanılmıştır. Toplamda 36 farklı kombinasyonda katı kültür üretimi gerçekleştirilmiştir. Deneme süresince bulaşma görülen veya çeşitli nedenlerle üretimi aksayan petriiler çıkartılmış ve sonuç olarak her bir deneme için beş adet petri üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Karışıklığı önlemek için her bir deneme grubuna bir özel kod oluşturulmuştur. Örneğin Wouts ortamında 24 °C' de pH 5 değerinde üretim yapılan grubun kodu "W-24-5" şeklinde belirlenmiştir. Her bir değerlendirme ölçütü için beş petriden örneklemeler yapılmış ve beş petrinin ortalaması bir tekerrürü temsil etmiştir. Denemeler üç tekerrürlü olarak kurulmuştur. Kontrol grubu olarak en optimum şartlar olarak belirtilen W-24-7 ortamı kullanılmıştır.

3.11. Optimizasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesinde Kullanılan Ölçütler

3.11.1. Hermafroditlerin yumurta sayısı

Hermafroditler *H. bacteriophora* türüne özel ilk nesil erginleridir. Bu nedenle üretimin devamında elde edilen toplam IJ sayısını da doğrudan etkileyen bir ölçüttür. Üretim sırasında hermafrodit oluşumu gözlemlendiğinde petriiler steril kabin içerisinde açılarak her bir petriden iğne yardımı ile beş adet hermafrodit alınmış ve mikroskop altında parçalanarak yumurtaları sayılmıştır (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. Hermafroditlerin içerisinde yer alan döllenmiş yumurtaların mikroskop görüntüsü

3.11.2. Üretilen toplam IJ sayısı

EPN çalışmalarında üretimin verimi değerlendirilirken üretilen IJ miktarı ana ölçüt olarak kullanılmaktadır. Hermafrodit yumurta sayısı ile ilgili olmasına karşın üretim sırasında çeşitli nedenlerden dolayı toplam IJ sayısı ile hermafrodit yumurta sayısı arasında doğrusal bir bağlantı kurulamamaktadır (Ehlers ve ark. 2000). Bu doğrultuda, petri içerisindeki üretim tamamlandıktan sonra petri ler saf su ile yıkanmış ve üretilen tüm IJ' ler bir tüpe aktarılmıştır. Buradan altı adet 10 µl örnekleme yapılmış ve sayım kabında yer alan örnekler mikroskop altında sayılmıştır (Şekil 3.20). Örnekleme ortalamasından elde edilen IJ sayısı toplam solüsyona orantılanmış ve petriden elde edilen toplam IJ sayısı hesaplanmıştır.

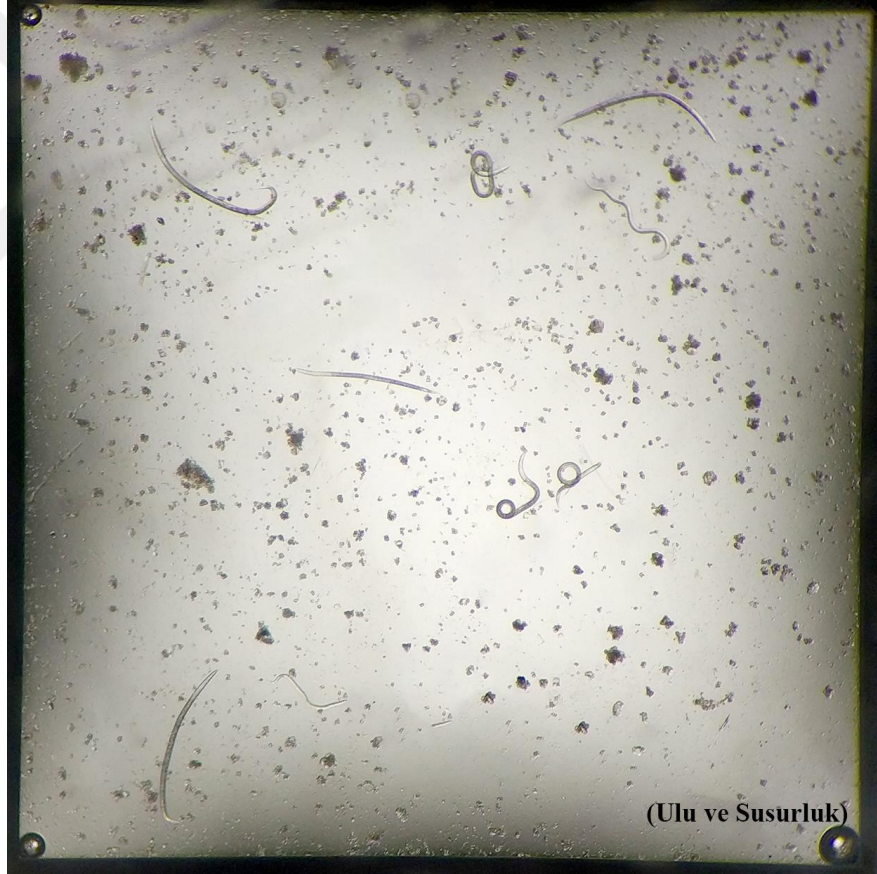
3.11.3. Üretilen IJ' lerin uzunlukları

IJ' lerin uzun süre beslenmeden yaşaması ve etkinliği, vücutlarındaki yağ oranıyla ilişkilidir (Susurluk ve Ehlers 2008). IJ uzunluğu arttıkça içerisindeki yağ oranının da

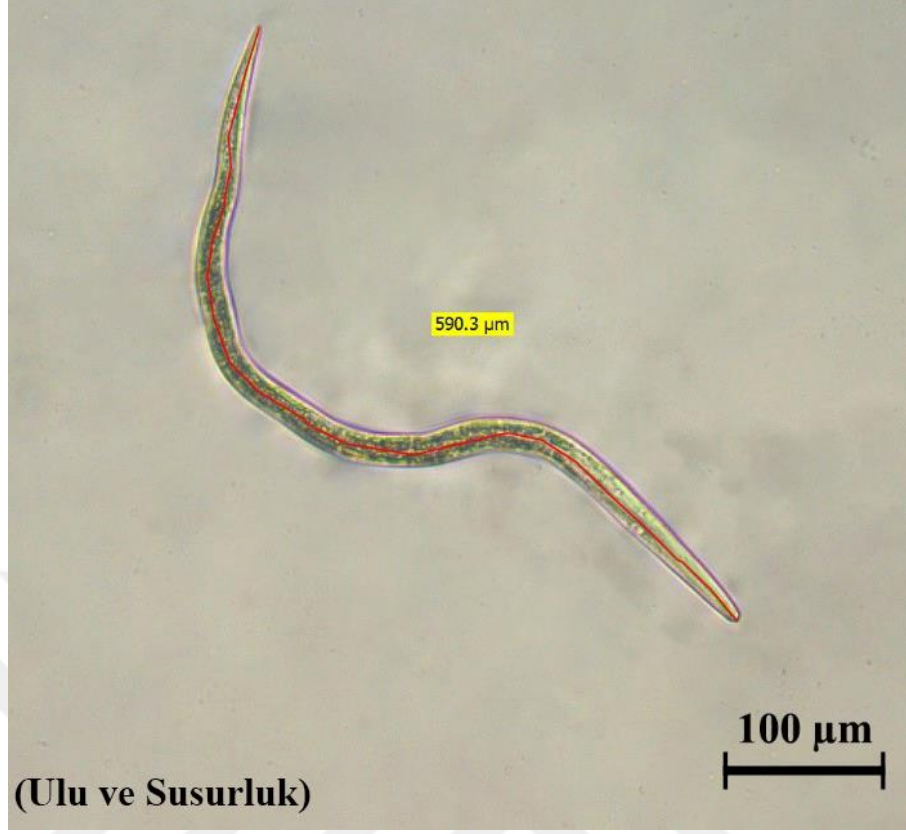
arttığı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Johnigk ve Ehlers 1999). Üretim sonunda elde edilen IJ' lerin boy uzunlukları Leica Application Suite (LAS) yardımı yazılımı aracılığı ile ölçülmüştür. Mikroskop altında çekilen toplu fotoğraflardan ölçümler yapılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir (Şekil 3.21).

3.11.4. Üretilen IJ' lerin *Galleria mellonella* üzerindeki etkinliği

Üretim sonunda elde edilen IJ' lerin etkinlikleri, ürün kalitesini belirten ölçütlerden biridir. Her bir *G. mellonella* larvasına 50 adet IJ gelecek şekilde hücre kültürü kaplarında inokulasyon yapılmış ve dört gün sonunda larvaların ölüm oranları belirlenerek üretilen IJ' lerin etkinlikleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.20. Sayım kaplarında sayımların yapılan IJ' ler



Şekil 3.21. Mikroskop altında LAS yazılımı ile yapılan ölçümler

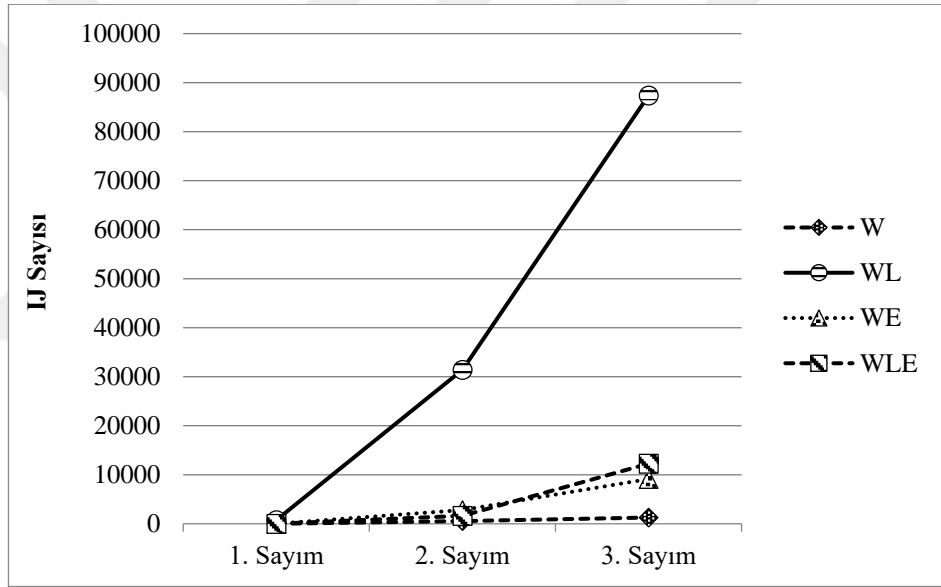
3.12. İstatistiksel Analizler

Çalışma sonunda elde edilen verilerin analizinde tek yönlü ve faktöriyel ANOVA (Analysis of Variance) testi kullanılmıştır. Muamele ortalamalarının karşılaştırılmasında $\alpha = 0.05$ düzeyinde LSD (Least Significant Differences) testi uygulanmıştır. Tüm analizler JMP® 11.0 yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

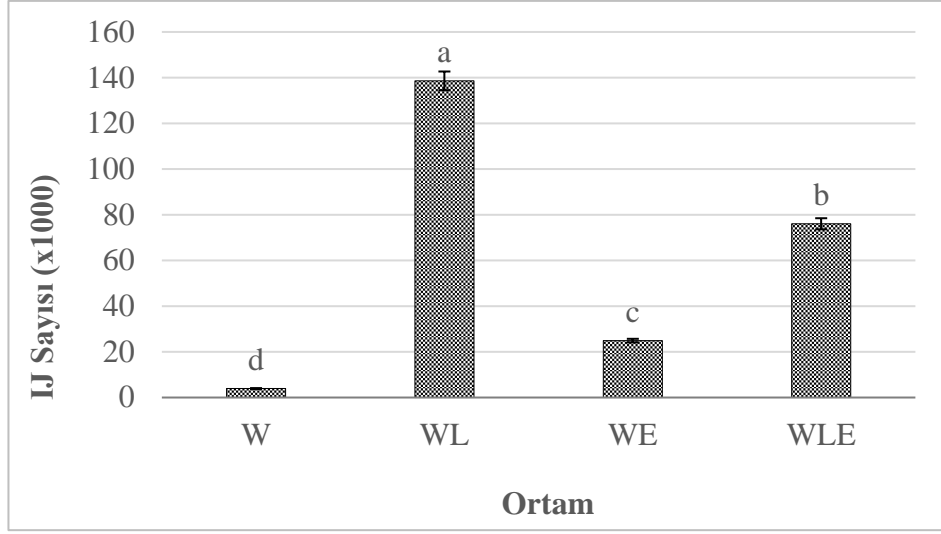
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1.Ön Deneme Sonuçları

Tez çalışmasında kullanılacak ortam içeriğini belirlerken ön çalışmalar gerçekleştirilmiş ve bu ön çalışmalarda üretim verimi üzerine bazı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan ara sayımlarda içerisinde soya lesitini bulanan WL ortamının IJ üreme hızının diğer ortamlara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Üretim sonunda agarların yıkanması ile yapılan sayımda ise WL ortamının kontrol ve diğer ortamlara göre istatistiksel olarak daha verimli olduğu belirlenmiştir (<0.05) (Şekil 4.2).



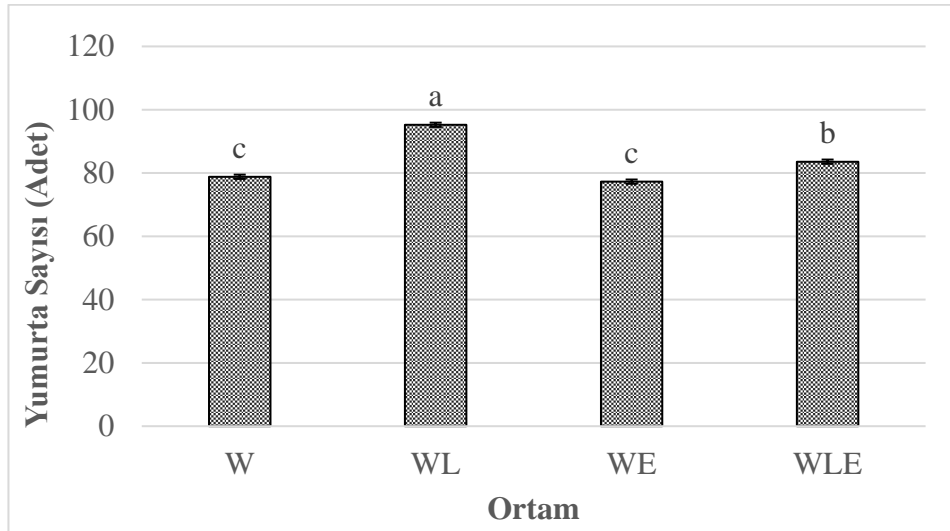
Şekil 4.1. Ön denemelerde elde edilen sayım sonuçları



Şekil 4.2. Ön denemelerde ortam içeriklerinin karşılaştırılması

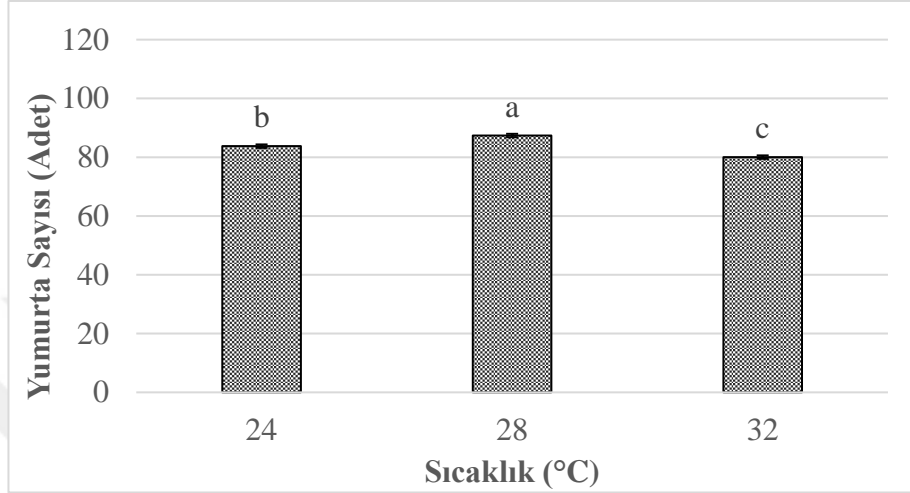
4.2.Optimizasyonun Hermafroditlerin Yumurta Sayısına Etkisi

Deneme sonuçları incelendiğinde içerisinde lesitin bulunan WL ortamının kontrol olarak belirlenen W ortamı ve diğer ortamlara göre istatistiksel olarak önemli oranda etki ettiği tespit edilmiştir (<0.05). İçerisinde yumurta sarısı bulunan ortam ise hermafrodit yumurta sayısı açısından değerlendirildiğin kontrol grubu olan W ortamından istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($F = 144.28$; $df = 3, 104$; $p < 0.0001$) (Şekil 4.3).



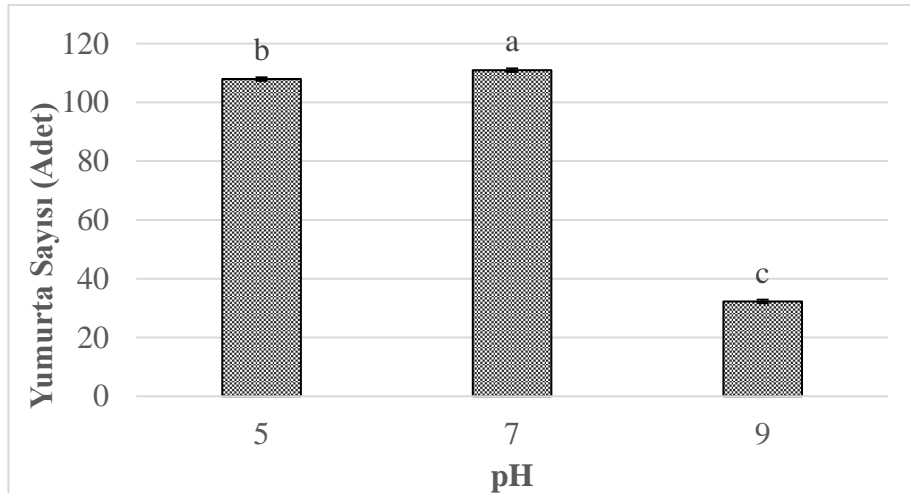
Şekil 4.3. Ortam içeriğinin hermafrodit yumurta sayısına etkisi

Sıcaklığın hermafrodit yumurta sayısına olan etkisi incelendiğinde 28 °C' nin diğer sıcaklıklara göre olumlu yönde etki ettiği istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir (<0.05). En kötü sonucun elde edildiği sıcaklık ise 32 °C olmuştur (F = 39.17; df = 2, 105; p < 0.0001) (Şekil 4.4).



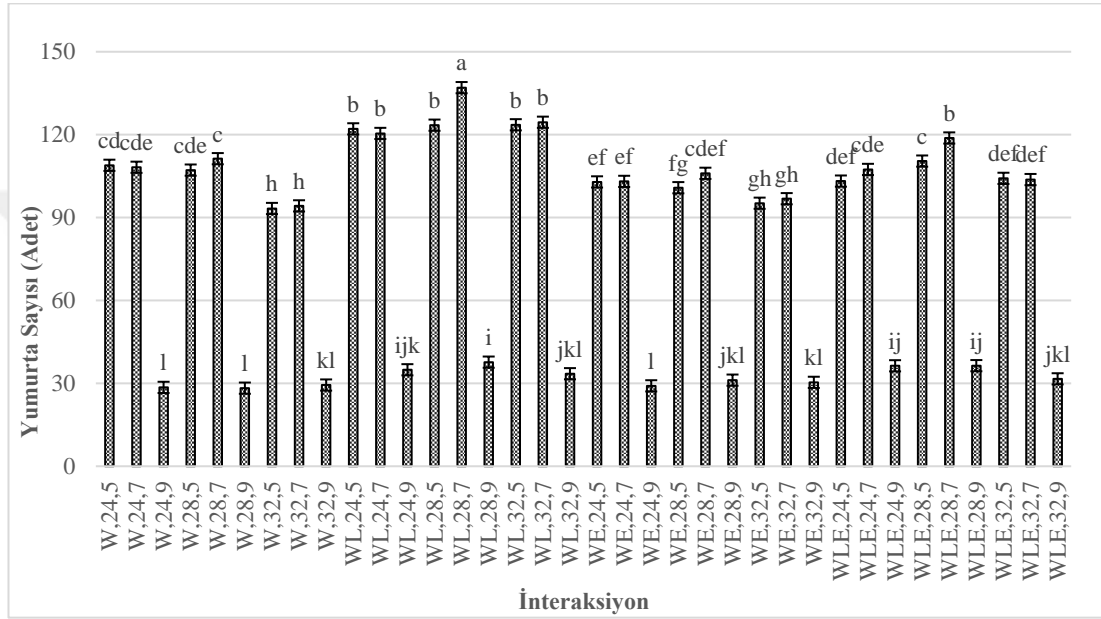
Şekil 4.4. Sıcaklığın hermafrodit yumurta sayısına etkisi

pH değerinin hermafrodit yumurta sayısına etkisinde ise değerler arasında önemli oranda farklılıklar meydana gelmiştir (F = 5783.42; df = 2, 105; p < 0.0001) (Şekil 4.5). pH değerinin 9 olduğu ortamlarda istatistiksel olarak ciddi bir düşüş meydana gelmiş ve hermafrodit yumurta sayısı kontrol grubu olan pH 7 değerine göre yaklaşık üç kat daha düşük olmuştur (<0.05).



Şekil 4.5. pH değerinin hermafrodit yumurta sayısına etkisi

Tüm interaksiyonların hermafrodit yumurta sayısına olan etkisinin karşılaştırıldığı sonuçlar incelendiğinde, lesitin içeren WL ortamının 28 °C sıcaklıkta ve pH 7 değerinde (WL-28-7) en iyi sonucu verdiği belirlenmiştir ($F = 2.69$; $df = 12, 95$; $p = 0.0048$) (Şekil 4.6). pH değerinin 9 olduğu ortamlarda ise istatistiksel olarak ciddi düşüşler gözlenmiş hermafrodit yumurta sayısı bakımında düşük sonuçlar elde edilmiştir (<0.05).



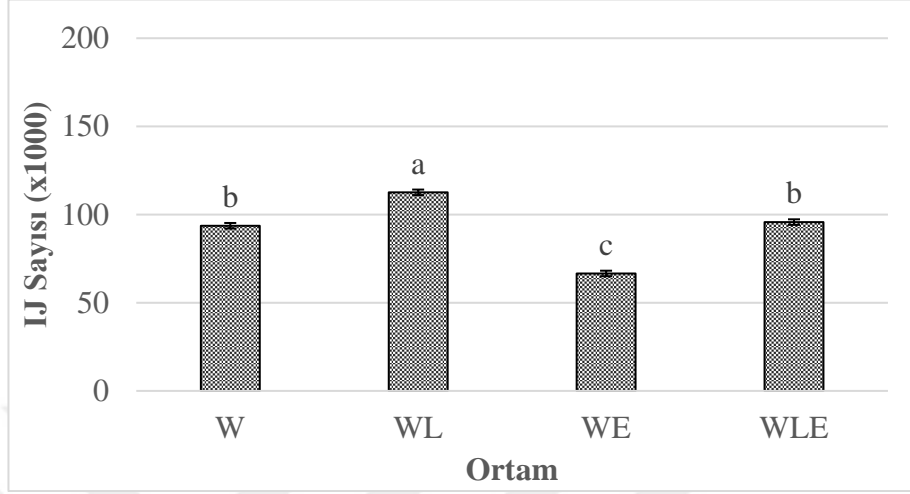
Şekil 4.6. İnteraksiyonların hermafrodit yumurta sayısına etkisi

Optimizasyonun hermafrodit yumurta sayısına etkisi genel olarak değerlendirildiğinde istatistiksel olarak önemli farklılıkların ortaya çıkarıldığı görülmektedir. Hermafrodit yumurta sayısı *in vitro* katı ve sıvı üretimde ölçümü yapılan bir özelliktir (Zioni ve ark. 1992, Ciche ve ark. 2008, Clarke 2008). Üretim sürecinin ilerleyen dönemlerinde oluşan IJ' lerin kaynağı, hermafroditler içerisinde yer alan yumurtalardır (Ehlers 2001). Bu nedenle iyi bir hermafrodit gelişimi, üretim verimini de artırma potansiyeline sahiptir.

4.3.Optimizasyonun Üretilen Toplam IJ Sayısına Etkisi

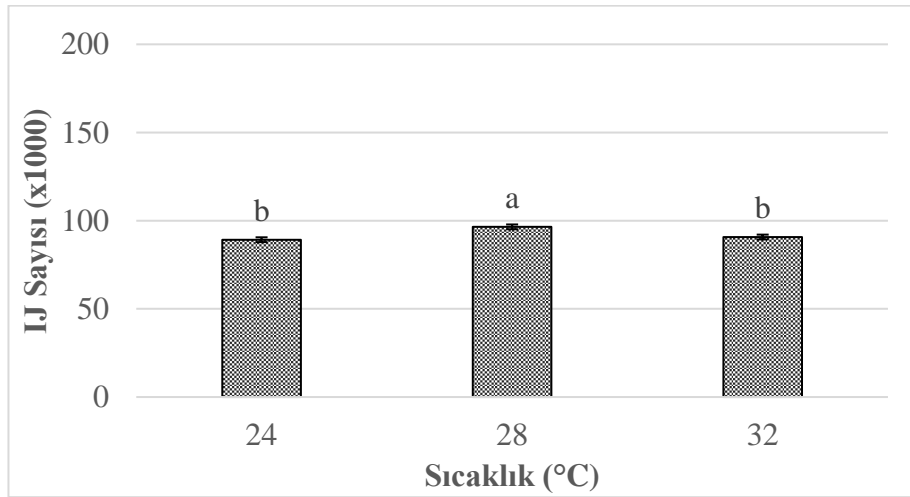
Diğer bir değerlendirme ölçütü olan toplam IJ sayısına bakıldığında, ortam içeriğinin istatistiksel olarak önemli etkide bulunduğu tespit edilmiştir (<0.05). Hermafrodit yumurta sayısına benzer şekilde toplam IJ sayısında da içerisinde lesitin bulunan WL

ortamının diğer ortamlardan daha iyi sonuç gösterdiği ve daha fazla üretim verimi sağladığı belirlenmiştir ($F = 146.2069$; $df = 3, 104$; $p < 0.0001$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Ortam içeriğinin IJ sayısına etkisi

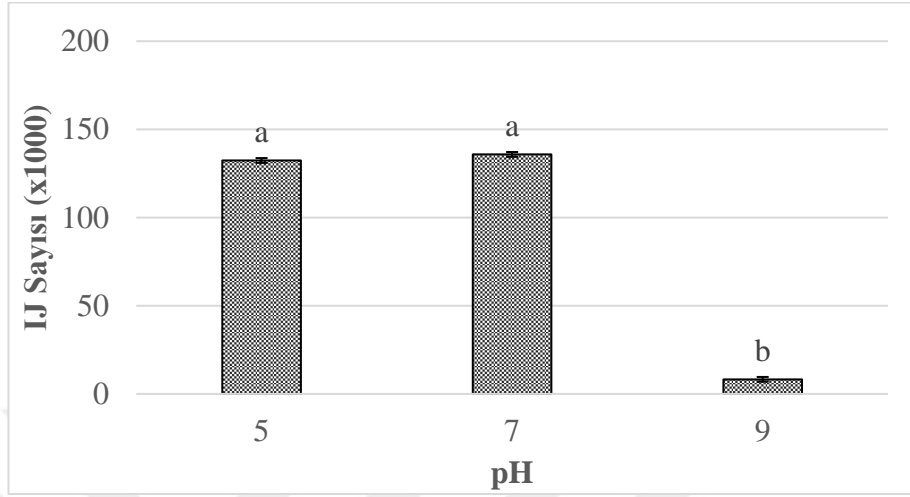
Sıcaklığın toplam IJ sayısına etkisi incelendiğinde özellikle 28 °C sıcaklığın diğer iki sıcaklığa göre daha fazla olduğu ve istatistiksel olarak önemli ölçüde fark yarattığı belirlenmiştir (<0.05). Diğer iki sıcaklık olan 24 ve 32 °C' lerin arasında ise istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunamamıştır ($F = 7.9651$; $df = 2, 105$; $p = 0.0007$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Sıcaklığın IJ sayısına etkisi

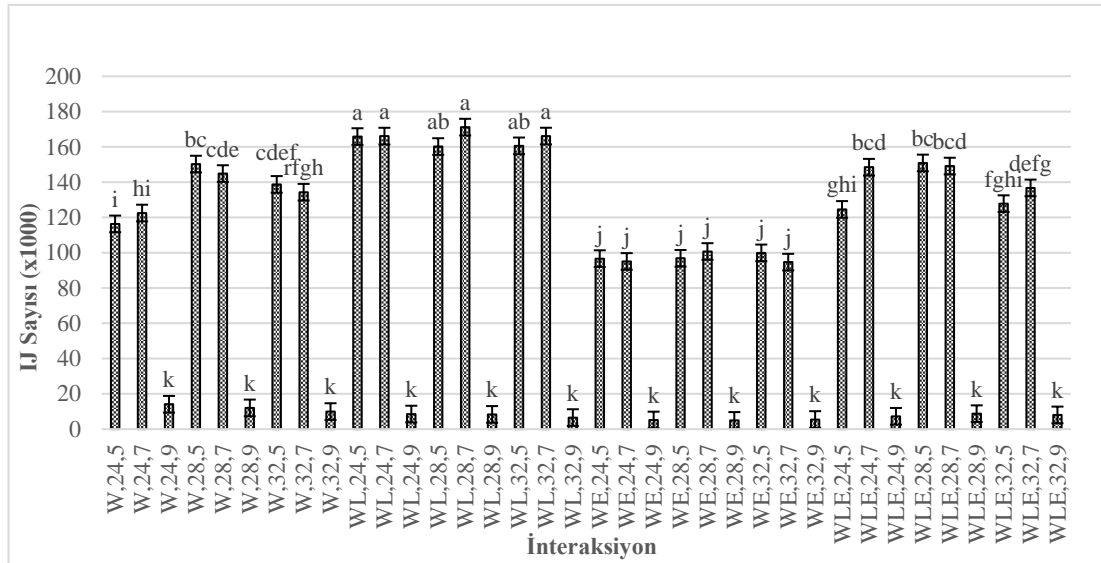
Hermafrodit yumurta sayısı sonuçlarına benzer şekilde toplam IJ sayısının en az olduğu sonuç pH 9 değerinde gerçekleşmiştir ($F = 2842.401$; $df = 2, 105$; $p < 0.0001$) (Şekil 4.9).

Diğer iki pH değeri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamışken, pH 9 değeri daha düşük üretim verimine neden olmuştur (<0.05).



Şekil 4.9. pH değerinin IJ sayısına etkisi

Tüm interaksiyonların toplam IJ sayısına etkisi karşılaştırıldığında genel olarak lesitin içeren WL ortamı kullanılarak yapılan üretimlerin istatistiksel olarak olumlu yönde öne çıktığı (<0.05), pH 9 değerine sahip ortamlarda yapılan üretimin ise istatistiksel olarak olumsuz yönde etkilendiği görülmektedir ($F=1.7438$; $df = 12, 95$; $p = 0.0751$) (Şekil 4.10).

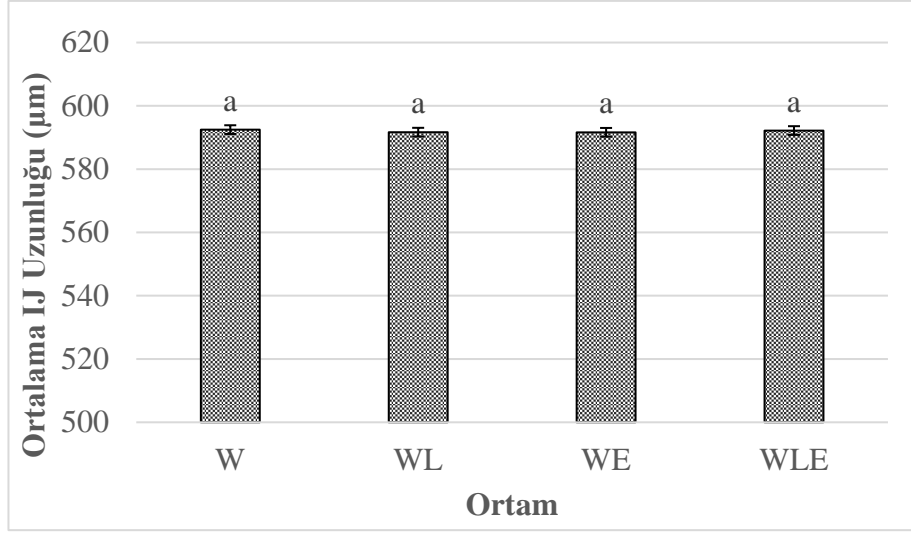


Şekil 4.10. İnteraksiyonların IJ sayısına etkisi

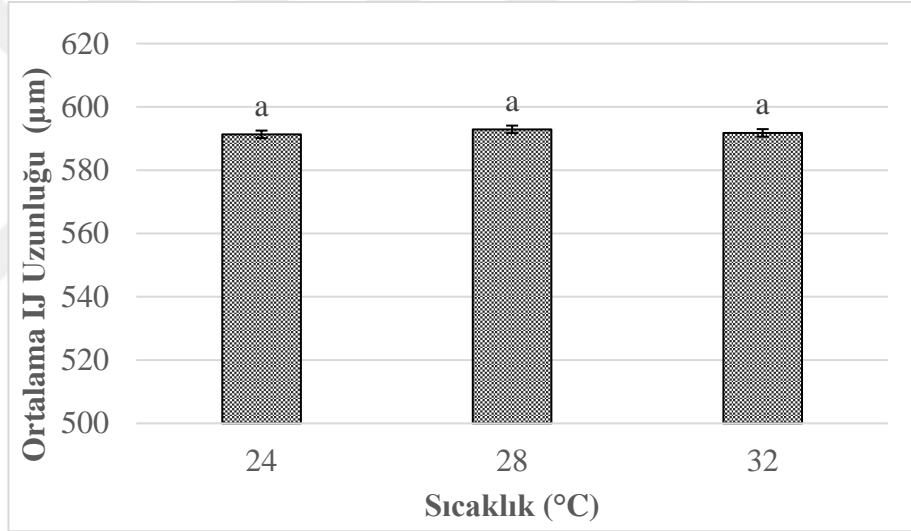
Üretim sonunda elde edilen toplam IJ sayısı, genel olarak en önemli üretim ölçütlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Hirao ve Ehlers 2010, Addis ve ark. 2016, Leite ve ark. 2016). Hermafrodit yumurta sayısı ile toplam IJ sayısı birbiriyle doğrudan ilişkili iki ölçüt olarak görülebilmese rağmen, üretim sürecinde simbiyotik bakteri ile ilgili çeşitli nedenlerden dolayı bu iki ölçüt arasında paralel ilişki kurulabilmektedir (Johnigk ve Ehlers 1999, Ehlers ve ark. 2000). *In vitro* katı ve sıvı üretim süreci boyunca ortamın içeriğinde meydana gelen değişimler nedeniyle bakterinin salgıladığı metabolitler değişmekte ve bu sonuç doğrudan üretim verimine etki etmektedir. Nitekim hermafrodit yumurta sayısı ve toplam IJ sayısı ölçütleri incelendiğinde aralarında benzer sonuçlar olmadığı görülmektedir. Ortam içeriği ve pH değerindeki farklılıkların simbiyotik bakteri üzerindeki etkileri ile ilgili nedenlerden dolayı üretimin ilerleyen aşamalarında IJ gelişimi için olumsuz şartların oluştuğu düşünülmektedir. Diğer taraftan en verimli üretim ortamı olan ve lesitin içeren WL ortamındaki verim sonuçlarına bakıldığında 1 gr ortam başına yaklaşık 10.000 adet IJ üretildiği görülmektedir. Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen verimler ile uyumluluk göstermektedir (El-Sadawy 2011). Bazı çalışmalarda ise katı kültürde 1 gr ortam başına 100.000 adetten fazla IJ üretim gerçekleştirilmiştir (Tabassum ve Shahina 2004). Bunun en büyük nedeni, çalışmalarında kullanılan katı ortamın agar yerine sünger olmasıdır. Sünger ortam hem agara göre daha düşük yoğunluklu, hem de üç boyutlu olarak üretim yapılmasına izin verilen bir ortamdır. Agar içeren ortamlarda ise yoğunlukla yüzey üzerinde üreme gerçekleşir.

4.4.Optimizasyonun Üretilen IJ' lerin Uzunluğuna Etkisi

Yapılan ölçümler sonunda üretilen IJ' lerin uzunluğuna ortam içeriği ($F = 0.0896$; $df = 3, 104$; $p = 0.9655$) (Şekil 4.11) ve sıcaklığın ($F = 0.4603$; $df = 2, 105$; $p = 0.6329$) (Şekil 4.12) istatistiksel olarak önemli bir etkide bulunmadığı belirlenmiştir (<0.05). IJ' lerin, katı ortam üzerinde üreyen bakteri ile beslendiği düşünüldüğünde, bu sonuç ortam içeriği ve sıcaklığın bakteri salgıladığı kimyasal bileşikler (Cabral ve ark. 2004) üzerinde olumlu veya olumsuz bir etki yaratmadığını göstermektedir.



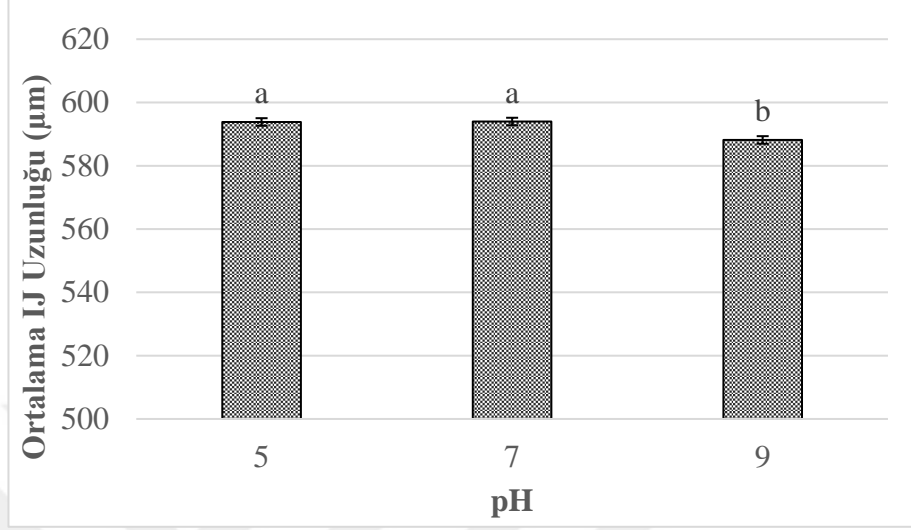
Şekil 4.11. Ortam içeriğinin ortalama IJ uzunluğuna etkisi



Şekil 4.12. Sıcaklığın ortalama IJ uzunluğuna etkisi

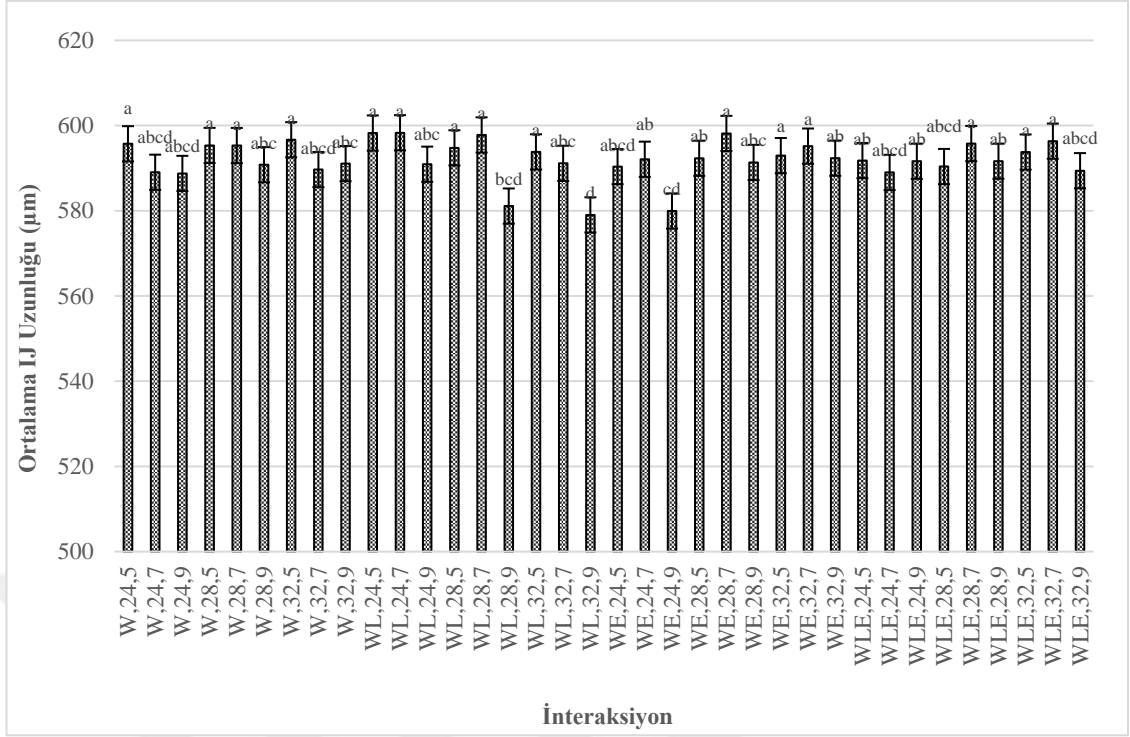
pH değerinin IJ boyuna etkisi incelendiğinde ise özellikle yüksek değerlerde olumsuz bir etkinin olduğu belirlenmiştir ($F = 7.7302$; $df = 2, 105$; $p = 0.0009$) (Şekil 4.13). Simbiyotik bakterinin optimum pH isteği türlere göre değişmekle beraber 6-7 arasında değişmektedir (Yoo ve ark. 2001). Bakterinin gelişimi sırasında salgıladığı kimyasal bileşikler ortamın pH değerinin değişmesine neden olmakta ve uzun vadede olumsuz etki yapmaktadır. Bu nedenle sıvı kültür üretiminde pH sürekli olarak takip edilmekte ve üretim süreci bu duruma göre yönlendirilmektedir. Tez çalışmasında kullanılan ortamın

yüksek pH değerine sahip olması nedeniyle özellikle simbiyotik bakteri gelişimi sırasındaki olumsuz etkiler nedeniyle IJ' lerin boyunun kısa ölçüldüğü düşünülmektedir.



Şekil 4.13. pH değerinin ortalama IJ uzunluğuna etkisi

Tüm interaksiyonların IJ uzunluğuna etkisi incelendiğinde, önceki iki ölçüte göre birbirine daha yakın değerlerin ortaya çıktığı görülmektedir ($F = 0.4054$; $df = 12, 95$; $p = 0.9570$) (Şekil 4.14). Diğer iki ölçütte interaksiyonlar arasında ciddi farklılıklar yer almasına karşın IJ uzunluğunda istatistiksel farklılıklar görülmesine rağmen değerler birbirine yakın çıkmıştır.

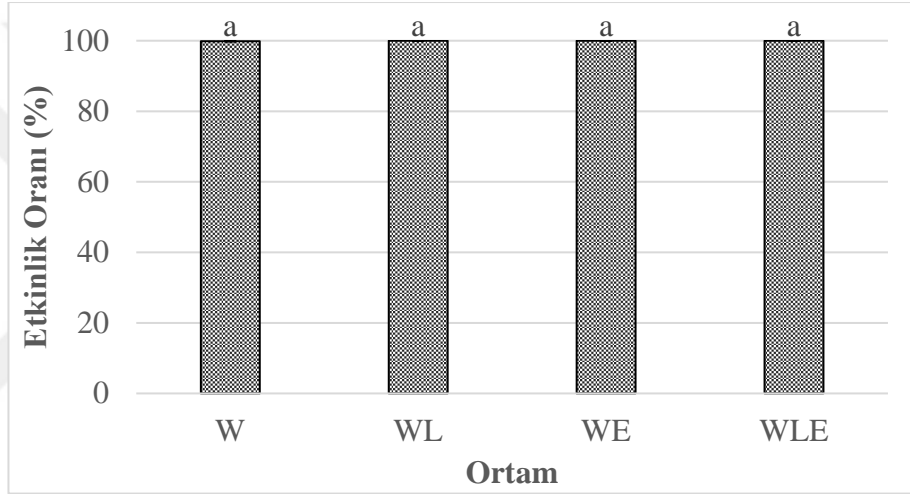


Şekil 4.14. İnteraksiyonların ortalama IJ uzunluğuna etkisi

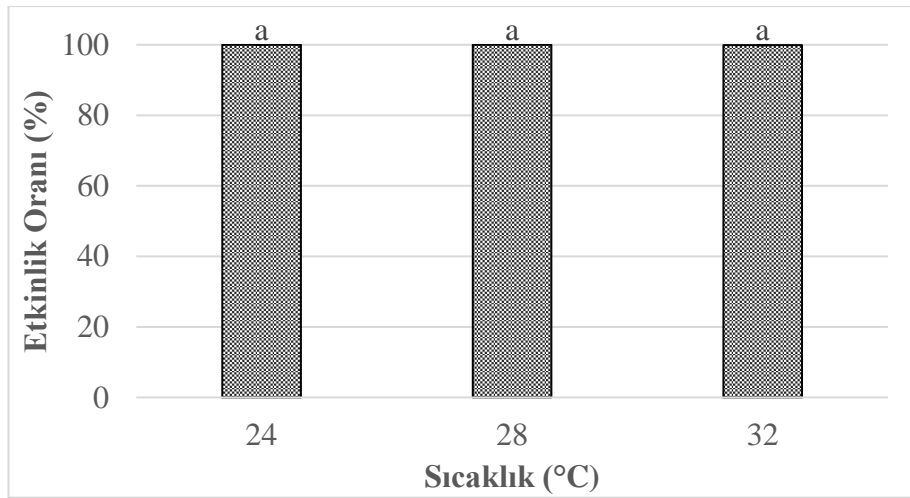
IJ' ler toprak altında uzun süre beslenmeden yaşayabilen ve EPN' lerin böceklere karşı etki mekanizmasında kilit rol oynayan biyolojik dönemdir. IJ' lerin beslenmeden yaşamlarını devam ettirmesi sırasında kendi vücutlarında bulunan lipid rezervlerini kullandıkları bilinmektedir (Smart 1995, Qiu ve Bedding 2002). Ayrıca EPN' ler kendi vücutlarında biriktirdikleri lipidleri beslendiklerin ortamdan almaktadırlar (Blackburn ve ark. 2016). Bu nedenle üretim ortamı içeriğine yağ kaynağı olabilecek besin maddelerinin eklenmesi üretim kalitesini artırmaktadır (Yoo ve ark. 2000, 2001, Singh ve Upadhyay 2018). Yapılan tez çalışmasında yağ kaynağı olarak lesitin kullanılmıştır. Simbiyotik bakterilerin salgıladığı lesitinaz enzimleri sayesinde lesitini parçaladığı ve yağ asitlerini ortaya çıkardığı tespit edilmiştir (Boemare ve ark. 1996). Çalışma sonunda elde edilen verilerde özellikle lesitin içeren ortamın birden fazla ölçüt üzerinde olumlu etkide bulunması daha önceki çalışmalar ile uyumluluk göstermiştir.

4.5.Optimizasyonun Üretilen IJ' lerin Etkinliğine Etkisi

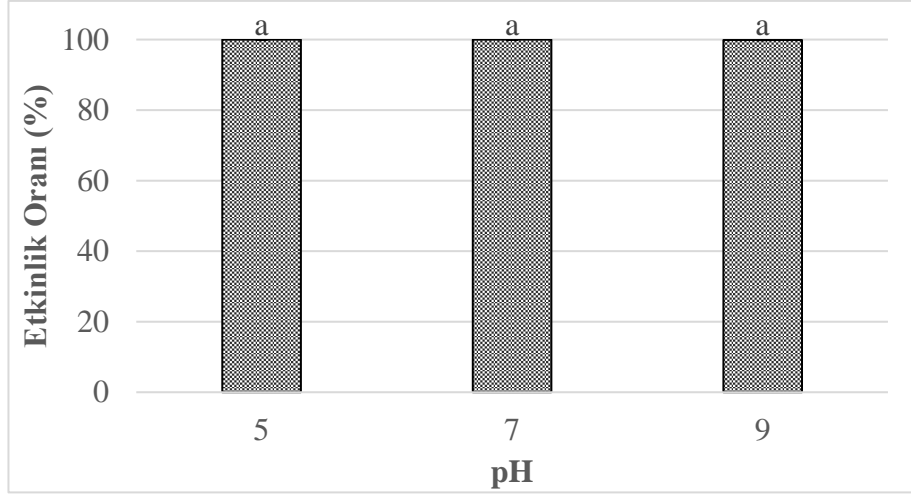
Etkinlik denemesinin sonuçları incelendiğinde ortam içeriğinin IJ' lerin *G. mellonella* larvası üzerindeki etkinliklerine herhangi bir etkide bulunmadığı tespit edilmiştir ($F = 1.000$; $df = 3, 104$; $p = 0.3979$) (Şekil 4.15). Sıcaklık denemesinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir ($F = 1.000$; $df = 2, 105$; $p = 0.3979$) (Şekil 4.16). pH denemesi sonuçları incelendiğinde de diğer iki ölçütteki sonuçlara benzer şekilde etkinlik üzerinde istatistiksel olarak bir etki gözlemlenmemiştir ($F = 1.000$; $df = 2, 105$; $p = 0.3729$) (<0.05) (Şekil 4.17).



Şekil 4.15. Ortam içeriğinin IJ etkinliğine etkisi



Şekil 4.16. Sıcaklığın içeriğinin IJ etkinliğine etkisi



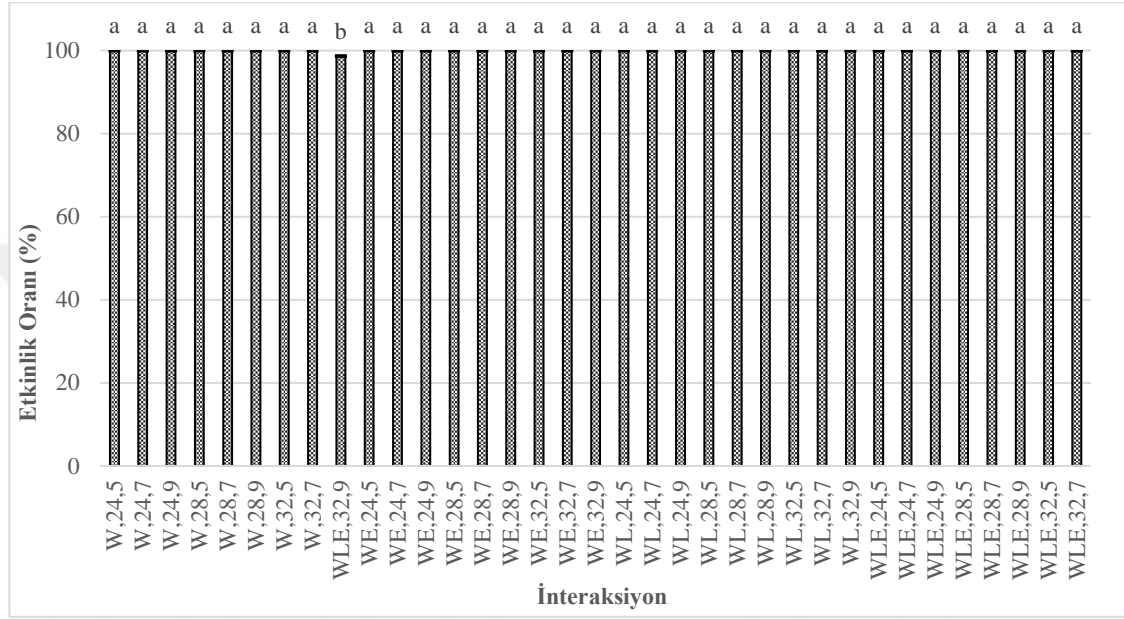
Şekil 4.17. pH değerinin IJ etkinliğine etkisi

Üretim sonuçları incelendiğinde, bazı ortamlarda çok az üretim gerçekleştiği görülmektedir. Düşük üretim verimi elde edilen petrilerdeki IJ' ler kullanılarak yapılan etkinlik denemelerinde yüksek ölüm oranı görülmesi karışıklığa sebep olabilmektedir. Bu çelişkinin en temel nedeni, tüm ortamlarda larva başına 50 adet IJ kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Ortamın üretim verimi düşük olsa dahi, etkinlik için larva başına 50 adet IJ kullanıldığı için etkinlik oranları yüksek çıkmıştır.

Bu durum farklı açılardan değerlendirilebilir. *In vivo* veya *in vitro* üretim sonunda elde edilen ürünün önemli özelliklerinden birisi de etkinliğidir. Bu nedenle, ticari olarak üretilen EPN' lerin etkinliklerinin yüksek olması da önemlidir. Bu tez çalışmasında yapılan etkinlik denemelerinden elde edilen veriler optimum şartlarda (W-24-7) üretilen IJ' lerin etkinliğinin, diğer tüm interaksiyonlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farkı olmadığı görülmektedir.

Yüksek etkinlik olumlu bir sonuç olarak görülebilir. Ortam içeriği IJ' lerin üremesi için uygun olmamasına rağmen simbiyotik bakterinin konukçu böceği öldürmesi konusunda olumsuz etkiye bulunmamıştır. Ancak verim çok düşük olduğu için hem üretim maliyeti hem de uygulama yapılacak alan için yeterli miktarda EPN gerekliliği üzerinden değerlendirme yapıldığında, etkinliğin önemi ikinci plana düşmektedir. Bu durum bazı çalışmalarda da vurgulanmıştır (Susurluk ve ark. 2013a, 2013b, Ulu ve Susurluk 2014).

İnteraksiyonların etkinlik üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde sadece “WLE-32-9” ortamında istatistiksel bir farklılık görülmektedir ($F = 1.000$; $df = 12, 95$; $p = 0.4580$) (0.05) (Şekil 4.18). Diğer tüm kombinasyonların etkinliğinin % 100 olmasından dolayı en ufak bir değişimde bile istatistiksel farklılıklar oluşmaktadır. Bahsedilen ortamdaki farklılığın deneme sırasında meydana gelen hatadan kaynaklandığı tahmin edilmektedir.



Şekil 4.18. İnteraksiyonların İJ etkinliğine etkisi

4.6.Optimizasyonun Maliyeti

EPN’ lerin *in vitro* katı üretiminde kullanılan kimyasal maddelerin masrafları değerlendirildiğinde bugün 1 gr ortam için yaklaşık 1 TL maliyet ortaya çıkmaktadır. Toplam İJ sayısı verilerine bakıldığında standart Wouts agar üzerinde 1 gr katı ortam başına yaklaşık ortalama 8000 adet İJ üretildiği görülmektedir. Bu durum da çalışmada üretilen 8.000 adet İJ’ nin yaklaşık 1 TL tutarında olduğunu göstermektedir.

Ortam içeriği haricindeki diğer ölçütlerin tüm ortamlar için hemen hemen eşit olduğu göz önüne alındığında ortamlar arasında maliyet bakımından en büyük etkiyi kullanılan kimyasal maddeler oluşturmaktadır. En yüksek verime sahip ortam incelendiğinde içerisinde lesitin olduğu görülmektedir. Katı ortam içerisinde eklenen 1 gr lesitin, toplam maliyeti 10 kuruş artırmaktadır. Bu durum da genel maliyette % 10 oranında artış

anlamına gelmektedir. İçerisinde lesitin bulunan WL ortamında üretilen toplam IJ sayısına bakıldığında 1 gr ortam başına yaklaşık ortalama 11.500 adet IJ retilmiştir. Yani % 10 maliyet artışı ile yaklaşık % 45' lik bir verim artışı sağlanmıştır. Geniş çaplı üretimlerde bu farkın daha da olumlu yönde artacağı düşünülmektedir.

Günümüzde EPN' lerin 1 m² alan için maliyeti firmalara göre büyük farklılıklar göstermesine rağmen sadece ürün için 2 TL civarındadır. Buna işçilik, yakıt, su vb. diğer girdiler de eklendiğinde maliyetin daha da artması beklenmektedir. Bu durum ne yazık ki lkemizde EPN kullanımını önünde ciddi bir engel olarak durmaktadır. Bu açıdan değerlendirme yapıldığında EPN üretiminin verimi ve kalitesi üzerine yapılan katkılarının, ileride EPN' lerin yaygınlaşması konusunda olumlu etki yapması beklenmektedir.

5. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında, Türkiye' nin farklı coğrafik bölgelerinden elde edilen *H. bacteriophora* izolatlarından elde edilen HBH hibrit ırkının *in vitro* katı kültürde üretiminin optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu doğrultuda yapılan laboratuvar denemelerinde, kitle üretimde kullanılan bazı önemli parametrelerin HBH hibrit ırkı için optimum değerleri tespit edilmiş ve bu sayede birim üretim alanından elde edilen verim artırılmıştır. Birim alandan elde edilen verimin artmasının yanında hermafrodit bireylerin yumurta sayıları ve üretim sonunda elde edilen IJ' lerin *G. mellonella* üzerindeki etkinlikleri de belirlenmiştir. *In vitro* katı ve sıvı ortam içerisinde üretim konusunda çok fazla parametre bulunmasına karşın, tez çalışmasında laboratuvar imkânları dâhilinde kontrol edilebilecek en önemli parametreler kullanılmıştır. Dünya genelinde ticari anlamda *in vitro* sıvı kültür kullanıldığı daha önce belirtilmiştir. Tez çalışmasında katı kültürde üretim yapılmasına karşın, sıvı kültürde de benzer etkileri gösterecek parametrelerin seçilmesi sayesinde çalışma sonuçlarının sıvı kültürde de yakın sonuçlar ortaya koyacağı düşünülmektedir.

Tarımın ülkemizde hak ettiği seviyede olmadığı düşünülmele birlikte, dünya genelinde birçok ülke tarafından ana gelir kaynaklarından biri olarak görülmektedir. Tarımın ekonomik değerinin büyümesi ile birlikte tarımsal ürünlerde hastalık, zararlı ve yabancı otlar tarafından meydana gelen ekonomik kayıp da sürekli olarak artmaktadır (Oerke 2006). Yapılan bazı araştırmalarda tarımda kimyasal kullanımının miktar ve maliyet olarak sürekli artmasına karşın, hastalık ve zararlılar ile mücadelede yeteri kadar başarı sağlanamadığı ve ekonomik kaybın sürekli olarak arttığı tespit edilmiştir (Nicolopoulou-Stamati ve ark. 2016). Yıllar içerisinde kimyasal kullanımının artmasına rağmen istenen başarının elde edilememesi, hedef dışı organizmaların, doğanın ve insanın zarar görmesi ile kimyasal ilaçlara alternatifler aranmıştır. Bu arayışın günümüzde de devam ettiği net bir şekilde görülmektedir.

Son yıllarda ülkemizde de yaygınlaşan EZY fikri ile kimyasal ilaçlara alternatif yöntemler birbirleri ile uyumlu bir şekilde kullanılmakta, tarımsal ürünlerde ekonomik kayba neden olan etmenler ile mücadele ederken doğada mümkün olduğunca az hasar

oluşturmak hedeflenmektedir. Bu amaçla, şu anki adıyla T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yaklaşık 20 üründe EZY programları ilan edilmiştir. Dünya genelinde hastalık, zararlı ve yabancı otlar ile mücadelede eğilimin bu yönde olduğu düşünüldüğünde, biyolojik mücadelenin gelecekte daha fazla pazar payına sahip olacağı açık bir şekilde görülmektedir. Daha önceki kısımlarda belirtildiği gibi 2050' li yıllarda biyolojik ürünlerin kimyasal ürünleri pazar payı olarak geçeceği tahmin edilmektedir. Bu nedenle A.B.D. ve Avrupa Birliği ülkelerinin birçoğunda biyolojik pestisitlerin üretimi, ithalatı ve kullanımına önemli destekler verilmektedir (Ehlers 2005).

Tarımın asıl amacı insana besin sağlamak olmasına rağmen, birçok ülke için ekonomik geçim kaynağı haline gelmiştir. Bununla birlikte son yıllarda gelişen teknoloji sayesinde, tarım çeşitli ülkeler için bir güç göstergesi haline gelmiş ve diğer ülkeleri bağımlı hale getirmek için kullanılan bir araç olmuştur. Ülkemizin tarım ve hayvancılık kapasitesi göz önüne alındığında, doğru politikalar ile çok ciddi ekonomik kaynak oluşturabileceği belirtilmektedir (Anonim 2017).

Tarımda ekonomik kayba neden olan hastalık, zararlı ve yabancı otlar için en yaygın kullanılan yöntem kimyasal mücadeledir. Kullanılan kimyasalların neredeyse tamamı dış kaynaklara bağımlı ve ithalat yoluyla ülkemize giren ürünlerdir. Her yıl kimyasal kullanımının artmasına ek olarak döviz kurundaki artışlar ile ürün fiyatları da artmakta ve bu durum çiftçiye ek maliyet olarak yansımaktadır. Çiftçinin üretim maliyetlerinin artması sonucunda oluşan etki, son tüketicinin karşısına fiyat artışı olarak çıkmaktadır.

Biyolojik mücadelenin yaygınlaşmasının önündeki engellerden biri de biyolojik ürünlerin fiyatının pahalı olması ve çiftçiye çekici gelmemesidir. Özellikle üretim, formülasyon ve depolama maliyetlerinin fazla olması nedeniyle biyolojik ürünler kimyasal ürünler ile rekabet edememektedir. Bu nedenle biyolojik ürünlerin üretim, formülasyon ve depolama aşamasındaki maliyetlerini azaltmak için yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Shapiro-Ilan ve ark. 2012, Blackburn ve ark. 2016). Yeni teknolojiler ve yöntemler kullanılarak maliyet doğrudan azaltılabileceği gibi; etkinlik, verim, depo ömrü gibi konularda iyileştirmeler yapılarak dolaylı yoldan da maliyet azaltılabilmektedir.

Bu tez çalışmasında da bir biyolojik mücadele etmeni olan entomopatojen nematod *H. bacteriophora*'nın üstün özelliklere sahip HBH hibrit ırkının *in vitro* katı kültürdeki kitle üretiminin optimizasyonu sağlanmıştır. Bu sayede kitle üretiminden elde edilen verim artırılmış ve dolaylı yoldan da olsa maliyet konusunda olumlu yönde etki etmesine katkıda bulunulmuştur. EPN'ler konusunda bazı firmalar yatırım yapmakta ülkemizde EPN kullanımının yaygınlaşması beklenmektedir. Gelecekte EPN kullanımının yaygınlaşması sonucunda, kullanılan türlerin / ırkların ülkemize adapte olmuş canlılar olması uygulama başarısını artıracaktır. Bu duruma ek olarak EPN üretiminde ülkemize ait yerel türler / ırklar kullanılması, dışa bağımlılığı azaltma konusunda ufak da olsa etki sağlayacaktır.

EPN'lerin üzerinde yapılan çalışmalar günden güne artmakta ve bilimsel gelişmeler ile birlikte yeni çalışma alanları açılmaktadır. EPN'ler için önemli çalışma alanlarından biri olan *in vitro* ortamda kitle üretim konusu ülkemiz için yeni sayılabilecek bir konudur. Bu tez çalışması da, EPN'lerin kitle üretiminin optimizasyonu konusunda ülkemizde yapılan ilk çalışmalardan biri olma özelliği taşımaktadır. Dünya genelinde uzun yıllardır araştırma yapılmasına rağmen, ülkemize ait patentli bir ırkın kullanılması nedeniyle çalışmanın önem taşıdığı düşünülmektedir. *In vitro* üretimde kullanılan birçok parametre olmasına karşın, ekonomik ve laboratuvar imkanları dahilinde katı ve sıvı kültür için en önemli parametreler kullanılmıştır. Üretim verimi ve üretimden sonra elde edilen IJ'lerin kalitesini artırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abu Hatab, M., Gaugler, R. 1999.** Lipids of *in vivo* & *in vitro* cultured *Heterorhabditis bacteriophora*. *Biological Control*, 15: 113–118.
- Abu Hatab, M., Gaugler, R. 2001.** Diet composition and lipids of *in vitro*-produced *Heterorhabditis bacteriophora*. *Biological Control*, 20(1): 1–7.
- Addis, T., Teshome, A., Strauch, O., Ehlers, R.U. 2016.** Life history trait analysis of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* provides the basis for prediction of dauer juvenile yields in monoxenic liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(10): 4357–4366.
- Akhurst, R.J. 1983.** Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. *Cultures*, 33(1): 38–45.
- Akhurst, R.J., Bedding, R.A. 1975.** A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21(1): 109–110.
- Akhurst, R.J., Boemare, N.E. 1990.** Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. (ss. 75–90). CRC Press Inc.
- Anonim. 2017.** Why Invest in Turkish Agri-Food Industry. Investment Support & Promotion Agency.
- Atwa, A.A., Shamseldean, M.M., Yonis, F.A. 2013.** The effect of different pesticides on reproduction of Entomopathogenic nematodes. *Turkiye Entomoloji Dergisi*, 37(4): 493–502.
- Bedding, R.A. 1981.** Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica*, 27(1): 109–114.
- Bedding, R.A., Molyneux, A.S. 1982.** Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica*, 28(3): 354–359.
- Blackburn, D., Shapiro-Ilan, D.I., Adams, B.J. 2016.** Biological control and nutrition: Food for thought. *Biological Control*, 97: 131–138.
- Boemare, N., Laumond, C., Mauleon, H. 1996.** The Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complex: Biology, Life Cycle and Vertebrate Safety. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3): 333–346.
- Brown, I., Gaugler, R., Shapiro-Ilan, D. 2004.** LOTEK: An improved method for *in vivo* production of entomopathogenic nematodes. *International Journal of Nematology*, 14(1): 9–12.
- Buecher, E.J., Popiel, I. 1989.** Liquid culture of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont. *Journal of Nematology*, 21(4): 500–504.
- Cabral, C.M., Cherqui, A., Pereira, A., Simões, N. 2004.** Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. strain Az29. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7): 3831–3838.
- Chavarría-Hernández, N., De La Torre, M. 2001.** Population growth kinetics of the nematode, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnology Letters*, 23(4): 311–315.
- Chavarría-Hernández, N., Espino-García, J.J., Sanjuan-Galindo, R., Rodríguez-Hernández, A.I. 2006.** Monoxenic liquid culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using a culture medium containing whey. Kinetics and modeling. *Journal of Biotechnology*, 125: 75–84.

- Chavarría-Hernández, N., Maciel-Vergara, G., Chavarría-Hernández, J.C., Rodríguez-Hernández, A.I. 2011.** Mass production of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, through the submerged monoxenic culture in two internal-loop airlift bioreactors with some geometric differences. *Biochemical Engineering Journal*, 55: 145–153.
- Ciche, T., Darby, C., Ehlers, R.U., Forst, S., Goodrichblair, H. 2006.** Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biological Control*, 38(1): 22–46.
- Ciche, T.A., Kim, K.-S., Kaufmann-Daszczuk, B., Nguyen, K.C.Q., Hall, D.H. 2008.** Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8): 2275–2287.
- Clarke, D.J. 2008.** Photorhabdus: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cellular microbiology*, 10(11): 2159–67.
- De Bach, P. 1964.** Biological control of insect pests and weeds. *Biological control of insect pests and weeds*.
- De Nardo, E.A.B., Grewal, P.S.P. 2003.** Compatibility of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) with pesticides and plant growth regulators used in glasshouse plant production. *Biocontrol Science and Technology*, 13(4): 441–448.
- Ehlers, R.U. 1996.** Current and future use of nematodes in biocontrol: practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 303–316.
- Ehlers, R.U. 2001.** Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5–6): 623–633.
- Ehlers, R.U. 2005.** Forum on Safety and Regulation. *Nematodes as biocontrol agents* (ss. 107–114). Wallingford: CABI.
- Ehlers, R.U., Lunau, S., Krasomil-Osterfeld, K. 1998.** Liquid culture of the entomopathogenic nematode-bacterium-complex *Heterorhabditis megidis/Photorhabdus luminescens*. *BioControl*, 43: 77–86.
- Ehlers, R.U., Niemann, I., Hollmer, S., Strauch, O., Jende, D., Shanmugasundaram, M., Mehta, U., Easwaramoorthy, S., Burnell, A. 2000.** Mass production potential of the bacto-helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica-Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol Science and Technology*, 10(5): 607–616.
- El-Sadawy, H.A. 2011.** Mass production of *Steinernema* spp. on in-vitro developed solid medium. *World Applied Sciences Journal*, 14(6): 803–813.
- Ferreira, T., Addison, M., Malan, A. 2014.** In vitro liquid culture of a South African isolate of *Heterorhabditis zealandica* for the control of insect pests. *African Entomology*, 22(1): 80–92.
- Ferreira, T., Addison, M.F., Malan, A.P. 2016.** Development and population dynamics of *Steinernema yirgalemense* (Rhabditida: Steinernematidae) and growth characteristics of its associated *Xenorhabdus indica* symbiont in liquid culture. *Journal of Helminthology*, 90(3): 364–371.
- Friedman, M.J. 1990.** Commercial production and development. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. (ss. 153–172). CRC Press Inc.
- García del Pino, F., Jové, M. 2005.** Compatibility of entomopathogenic nematodes with fipronil. *Journal of Helminthology*, 79(4): 333–337.
- Gaugler, R. 2002.** *Entomopathogenic nematology*. Wallingford: CABI.

- Gaugler, R., Brown, I., Shapiro-Ilan, D., Atwa, A. 2002.** Automated technology for in vivo mass production of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 24(2): 199–206.
- Georgis, R. 1990.** Formulation and application technology. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. (ss. 173–191). CRC Press Inc.
- Gil, G., Choo, H., Gaugler, R. 2002.** Enhancement of entomopathogenic nematode production in in-vitro liquid culture of *Heterorhabditis bacteriophora* by fed-batch culture with glucose supplementation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 751–755.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L., Stewart, A. 2012.** Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, 30(5): 250–258.
- Glazer, I. 2002.** Survival biology. *Entomopathogenic nematology* (ss. 169–187). Wallingford: CABI.
- Grewal, P., Selvan, S., Gaugler, R. 1994.** Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology*, 19(4): 245–253.
- Grewal, P.S. 2002.** Formulation and application technology. *Entomopathogenic nematology* (ss. 265–287). Wallingford: CABI.
- Griffin, C.T., Downes, M.J., Block, W. 1990.** Tests of Antarctic soils for insect parasitic nematodes. *Antarctic Science*, 2(3): 221–222.
- Han, R., Ehlers, R.U. 2001.** Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the *in vivo* and *in vitro* development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *FEMS microbiology ecology*, 35(3): 239–247.
- Hirao, A., Ehlers, R.U. 2009.** Effect of temperature on the development of *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Rhabditida) in liquid culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(6): 1061–7.
- Hirao, A., Ehlers, R.U. 2010.** Influence of inoculum density on population dynamics and dauer juvenile yields in liquid culture of biocontrol nematodes *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* (Nematoda: Rhabditida). *Applied microbiology and biotechnology*, 85(3): 507–15.
- Hirao, A., Ehlers, R.U., Strauch, O. 2010.** Life cycle and population development of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* (Nematoda, Rhabditida) in monoxenic liquid culture. *Nematology*, 12(2): 201–210.
- Hominick, W.M. 2002.** Biogeography. *Entomopathogenic nematology* (ss. 115–143). Wallingford: CABI.
- Hominick, W.M., Reid, A.P., Bohan, D.A., Briscoe, B.R. 1996.** Entomopathogenic nematodes: Biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3): 317–332.
- Inman, F.L., Singh, S., Holmes, L.D. 2012.** Mass Production of the Beneficial Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and Its Bacterial Symbiont *Photorhabdus luminescens*. *Indian Journal of Microbiology*, 52(3): 316–324.
- Jeffke, T., Jende, D., Mätje, C., Ehlers, R.U., Berthe-Corti, L. 2000.** Growth of *Photorhabdus luminescens* in batch and glucose fed-batch culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(3): 326–30.

- Johnigk, S., Ecke, F., Poehling, M., Ehlers, R.U. 2004.** Liquid culture mass production of biocontrol nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida): improved timing of dauer juvenile inoculation. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(5): 651–8.
- Johnigk, S., Ehlers, R.U. 1999.** Endotokia matricida in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of the food supply. *Nematology*, 1(7–8): 717–726.
- Kassab, A.S., Entsar, H.T. 2016.** New approaches for extracting and *in vivo* mass-rearing of entomopathogenic nematodes. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26(3): 557–562.
- Kaya, H.K., Gaugler, R. 1993.** Entomopathogenic Nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38(125): 181–206.
- Koppenhöfer, A.M. 2000.** Nematodes. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (ss. 249–264). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S. 2015.** Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132: 1–41.
- Leite, L.G., Shapiro-Ilan, D.I., Hazir, S., Jackson, M.A. 2016.** Effect of inoculum age and physical parameters on *in vitro* culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *Journal of Helminthology*, 1–10.
- Lewis, E.E., Gaugler, R., Harrison, R. 1992.** Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*, 105(02): 309.
- Lunau, S., Stoessel, S., Schmidt-Peisker, A.J., Ehlers, R.U. 1993.** Establishment of monoxenic inocula for scaling up *in vitro* cultures of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Nematologica*, 39(1–4): 385–399.
- Miles, B.C., Blethen, C., Gaugler, R., Shapiro-Ilan, D., Murray, T. 2012.** Using Entomopathogenic Nematodes for Crop Insect Pest Control. *Pnw*, 1–9.
- Nguyen, K.B., Smart, G.C. 1995.** Morphometrics of Infective Juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida). *Journal of nematology*, 27(2): 206–12.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., Hens, L. 2016.** Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Article*, 4: 1.
- Oerke, E. 2006.** Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144: 31–43.
- Olson, S. 2015.** An Analysis of the Biopesticide Market Now and Where It is Going. *Outlooks on Pest Management*, 2023: 33–37.
- Peters, A. 1996.** The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3): 389–402.
- Poinar, G.O. 1979.** Nematodes for biological control of insects. *Boca Raton, FL USA: CC. Press*, 143.
- Poinar, G.O. 1990.** Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. (ss. 23–61). CRC Press Inc.
- Poinar, G.O., Grewal, P. 2012.** History of entomopathogenic nematology. *Journal of nematology*, 44(2): 153–61.
- Qiu, L., Bedding, R.A. 2002.** Characteristics of protectant synthesis of infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* and importance of glycerol as a protectant for survival of the nematodes during osmotic dehydration. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 131(4): 757–65.

- Ramakuwela, T., Hatting, J., Laing, M.D., Hazir, S., Thiebaut, N. 2016.** *In vitro* solid-state production of *Steinernema innovationi* with cost analysis. *Biocontrol Science and Technology*, 26(6): 792–808.
- Rovesti, L., Heinzpeter, E.W., Tagliente, F., Deseö, K. V. 1988.** Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica*, 34(4): 462–476.
- Sarwar, M. 2015.** The killer chemicals as controller of agriculture insect pests: the conventional insecticides. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 1(3): 141–147.
- Schroer, S., Ehlers, R.U. 2005.** Foliar application of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* for biological control of diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*). *Biological Control*, 33(1): 81–86.
- Shapiro-Ilan, D.I., Gaugler, R. 2002.** Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 28(3): 137–146.
- Shapiro-Ilan, D.I., Gaugler, R., Tedders, W.L., Brown, I., Lewis, E.E. 2002.** Optimization of inoculation for in vivo production of entomopathogenic nematodes. *Journal of nematology*, 34(4): 343–350.
- Shapiro-Ilan, D.I., Han, R., Dolinski, C. 2012.** Entomopathogenic Nematode Production and Application Technology. *Journal of nematology*, 44(2): 206–17.
- Sharma, M.P., Sharma, A.N., Hussaini, S.S. 2011.** Entomopathogenic nematodes, a potential microbial biopesticide: mass production and commercialisation status – a mini review. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 44(March 2015): 855–870.
- Singh, A., Upadhyay, V. 2018.** A Review on Entomopathogenic Nematodes: *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Advances in Bioresearch*, 9(2): 214–222.
- Singh, S., Eric, M., Floyd, I., Leonard, H.D. 2012.** Characterization of *Photorhabdus luminescens* Growth for the Rearing of the Beneficial Nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Indian Journal of Microbiology*, 52(3): 325–331.
- Smart, G.C. 1995.** Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *Journal of nematology*, 27(4S): 529–34.
- Smith, H.S. 1919.** On some phases of insect control by the biological method. *Journal of Economic Entomology*, 12(4): 288–292.
- Stoll, N.R. 1973.** Rudolf William Glaser, and Neoplectana. *Experimental Parasitology*, 33(2): 189–196.
- Strauch, O., Ehlers, R.U. 1998.** Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(3): 369–374.
- Strauch, O., Ehlers, R.U. 2000.** Influence of the aeration rate on the yields of the biocontrol nematode *Heterorhabditis megidis* in monoxenic liquid cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 9–13.
- Surrey, M.R., Davies, A.R.J. 1996.** Pilot-Scale Liquid Culture and Harvesting of an Entomopathogenic Nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 92–99.
- Susurluk, I.A. 2008.** Potential of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae*, *S. weiseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* for the biological control of the sugar beet weevil *Bothynoderes punctiventris* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Pest Science*, 81(4): 221–225.

- Susurluk, I.A., Ehlers, R.-U. 2008.** Field persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* in different crops. *BioControl*, 53(4): 627–641.
- Susurluk, I.A., Kongu, Y., Ulu, T. 2013a.** Quality control of *in vitro* produced *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strains isolated from Turkey. *Turkiye Entomoloji Dergisi*, 37(3): 283–291.
- Susurluk, I.A., Ulu, T., Kongu, Y. 2013b.** Tolerances of hybridized entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strains to heat and desiccation. *Turkiye Entomoloji Dergisi*, 37(2): 221–228.
- Tabassum, K.A., Shahina, F. 2004.** In Vitro Mass Rearing of Different Species of Entomopathogenic Nematodes in Monoxenic Solid Culture. *Pakistan Journal of Nematology*, 22(2): 167–175.
- Testa, A.M., Shields, E.J. 2017.** Low labor “*in vivo*” mass rearing method for entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 106: 77–82.
- Ulu, T.C., Sadıç, B., Susurluk, I.A. 2016.** Effects of different pesticides on virulence and mortality of some entomopathogenic nematodes. *Invertebrate Survival Journal*, 13: 111–115.
- Ulu, T.C., Susurluk, I.A. 2014.** Heat and desiccation tolerances of *Heterorhabditis bacteriophora* strains and relationships between their tolerances and some bioecological characteristics. *Invertebrate Survival Journal*, 11(1): 4–10.
- Van den Bosch, R., Messenger, P.S., Gutierrez, A.P. 1982.** *An introduction to biological control*. Plenum Press.
- Vemmer, M., Patel, A. V. 2013.** Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67(3): 380–389.
- Wouts, W.M. 1981.** Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on artificial media. *Journal of nematology*, 13(4): 467–469.
- Wright, D.J., Peters, A., Schroer, S., Fife, J.P. 2005.** Application technology. (P. S. Grewal, R. U. Ehlers, & D. I. Shapiro-Ilan, Ed.) *Nematodes as biocontrol agents*, 91–106.
- Yoo, S.K., Brown, I., Gaugler, R. 2000.** Liquid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: Lipid source and concentration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 759–763.
- Yoo, S.K., Gaugler, R., Brey, C.W. 2001.** Growth optimization of *Photorhabdus luminescens* isolated from entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 29(2): 104–109.
- Zioni, S., Glazer, I., Segal, D. 1992.** Life cycle and reproductive potential of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88. *Journal of Nematology*, 24(3): 352–358.
- Zyl, C. van, Malan, A.P. 2014.** Optimization of inoculation techniques for *in vivo* mass culture of entomopathogenic nematodes through nematode and insect host manipulation. *African Entomology*, 22(2): 405–416.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : TUFAN CAN ULU
Doğum Yeri ve Tarihi : ÜSKÜDAR – 25/09/1988
Yabancı Dili : İNGİLİZCE

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İSTEK VAKFI BİLGE KAĞAN LİSESİ - 2005
Lisans : BURSA ULUDAĞ ÜNİ. ZİRAAT FAK. - 2009
Yüksek Lisans : BURSA ULUDAĞ ÜNİ. FEN. BİL. ENS. - 2012

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ – 2009-2018

İletişim (e-posta) : tculu@uludag.edu.tr

Yayımları :

Armağan, B., Ulu, T.C., İkizer, T. 2010. Survey of entomopathogenic nematodes in soil of Görükle Region of Nilüfer Town in Bursa. *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 98(1): 91–98.

Kurtulmuş, F., Ulu, T.C. 2014. Detection of dead entomopathogenic nematodes in microscope images using computer vision. *Biosystems Engineering*, 118(1): 29–38.

Susurluk, I.A., Kongu, Y., Ulu, T.C. 2013a. Quality control of *in vitro* produced *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strains isolated from Turkey. *Turkiye Entomoloji Dergisi*, 37(3): 283–291.

Susurluk, I.A., Ulu, T.C. 2015. Virulence comparisons of high-temperature-adapted *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae* and *S. carpocapsae*. *Helminthologia (Poland)*, 52(2): 118–122.

Susurluk, I.A., Ulu, T.C. 2018. Bazı maddelerin *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının *in vitro* kitle üretimi üzerine etkileri. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 31(3): in press.

Susurluk, I.A., Ulu, T.C., Kongu, Y. 2013b. Tolerances of hybridized entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (rhabditida: Heterorhabditidae) strains to heat and desiccation. *Turkiye Entomoloji Dergisi*, 37(2): 221–228.

Ulu, T.C., Sadic, B., Susurluk, I.A., Aksit, T. 2015. Virulence of four entomopathogenic nematode species for plum sawfly , *Hoplocampa flava* L . (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Invertebrate Survival Journal*, 12: 274–277.

Ulu, T.C., Sadıç, B., Susurluk, I.A. 2016a. Effects of different pesticides on virulence and mortality of some entomopathogenic nematodes. *Invertebrate Survival Journal*, 13: 111–115.

Ulu, T.C., Sadıç, B., Susurluk, I.A. 2016b. Bazı pestisitlerin entomopatojen nematod *Steinernema feltiae* TUR-S3' ün zerine etkileri. *Turkish Journal of Biological Control*, 7(1): 55–63.

Ulu, T.C., Susurluk, I.A. 2014. Heat and desiccation tolerances of *Heterorhabditis bacteriophora* strains and relationships between their tolerances and some bioecological characteristics. *Invertebrate Survival Journal*, 11(1): 4–10.

