



***Heterorhabditis bacteriophora'* NIN IN VITRO KATI  
KÜLTÜR ÜRETİMİNDE KANOLA YAĞI, GLİKOZ VE  
SODYUM KLORÜR' ÜN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Gölsüm ÇELİK**



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Heterorhabditis bacteriophora*' NİN IN VITRO KATI KÜLTÜR ÜRETİMİNDE  
KANOLA YAĞI, GLİKOZ VE SODYUM KLORÜR' ÜN ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Gülsüm ÇELİK**

Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

BURSA-2018

**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Gülsüm ÇELİK tarafından hazırlanan ‘‘*Heterorhabditis bacteriophora*’ nın In Vitro Katı Kültür Üretiminde Kanola Yağı, Glikoz ve Sodyum Klorür’ ün Etkisinin Araştırılması’’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı’ nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

**Başkan:** Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK  
Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,  
Bitki Koruma Anabilim Dalı

İmza:



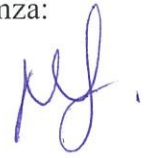
**Üye:** Doç. Dr. Gül ATANUR  
Bursa Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi,  
Peyzaj Mimarlığı Anabilim Dalı

İmza:



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

İmza:



Yukarıdaki Sonucu Onaylıyorum

  
Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

19./1./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.**

18.01.2018

  
İmza

**Gülsüm ÇELİK**



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### *Heterorhabditis bacteriophora*' NIN IN VITRO KATI KÜLTÜR ÜRETİMİNDE KANOLA YAĞI, GLİKOZ VE SODYUM KlorÜR' ÜN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**Gülsüm ÇELİK**

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Yararlı nematodlar olarak bilinen entomopatojen nematodlar (EPN) çevre dostu biyoinsektisit olarak kullanılmaktadır. Zararlı böceklerle mücadelede bu nematodların geniş ölçüde kullanımına en büyük engel üretim maliyetlerinin yüksek olmasıdır. Düşük maliyetli kitlesel üretim EPN'lerin biyolojik insektisit olarak başarılı bir şekilde geliştirilmesinde önemli bir ön koşuldur. Bu nedenle nematod üretimini arttırmak ve maliyetini azaltmak için yeni yöntemler araştırılmaktadır. Üretim yaklaşımları in vivo ve in vitro (katı veya sıvı fermantasyon) yöntemleri içermektedir. Nematodların 70 yıldan fazla bir süredir bu yöntemler kullanılarak kitle üretimleri gerçekleştirilmiştir. Entomopatojen nematodların kitle üretiminde kullanılan bu üç farklı yöntem in vivo üretim, in vitro katı üretim ve in vitro sıvı üretim yöntemlerinin her birinin avantaj ve dezavantajları vardır. In vivo üretim küçük çaplı çiftçiler, niş pazarlara odaklanmış küçük işletmelerde kolay kurulum ve düşük üretim sermayesi avantajıyla laboratuvar kullanımı için uygun görülmüştür. Ancak işgücü ve böceklerin maliyetlerinden dolayı ölçek ekonomisinden yoksundur. Büyük ölçekli üretimler için ise in vitro yöntemler kullanılmaktadır. In vitro sıvı kültür ticari üretimin büyük bir kısmını oluşturmakla birlikte sermaye harcamalarının da en fazla olduğu yöntemdir. In vitro katı üretim ise çoğu açıdan diğer iki yöntem arasındaki ara formdur. Bu yüzden bu çalışmada *Heterorhabditis bacteriophora* türünün in vitro katı üretimini arttırıp maliyeti azaltmaya yönelik olarak glikoz, kanola yağı ve sodyum klorür etkinliği araştırılarak daha uygun bir katı ortam geliştirmek amaçlanmıştır. Çalışmada entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora* ve simbiyotik bakterisi *Photorhabdus* spp. in vitro kitle üretimi için dört farklı katı kültür ortamı denenmiştir. Her bir ortama *Heterorhabditis bacteriophora*' dan  $2.1 \times 10^3$  IJ/ml aşılanmıştır. EPN gelişimi 4 hafta içinde görülmüştür. Denemeler sonucunda en yüksek verim  $51875 \times 10^3$  IJ/ml ile G. WOUTS 2 ortamından elde edilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen üretim sistemi petri kapları kullanılarak nispeten ucuz bir üretim ortamı ve basit katı kültür büyütme koşulları kullanılarak büyük ölçekli sıvı fermantasyon ekipmanına yatırım yapmaya gerek kalmadan EPN ürünlerini üretmek için rekabetçi bir teknoloji sunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Heterorhabditis bacteriophora*, entomopatojen nematod, in vitro katı üretim, kanola yağı, glikoz, sodyum klorür

**2018, vii + 54 sayfa**

## ABSTRACT

MSc Thesis

### IN VITRO SOLID CULTURE PRODUCTION OF *Heterorhabditis bacteriophora* INVESTIGATION OF THE EFFECT CANOLA OIL, GLUCOSE AND SODIUM CHLORIDE

**Glsm ÇELİK**

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences Department of Plant Protection

**Supervisor:** Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Entomopathogenic nematodes (EPN), known as useful nematodes, are used as *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. as environmentally friendly bio-insecticides. The greatest obstacle to the widespread use of these nematodes in combating pests is the high cost of production methods. Low cost mass production is an important precondition for the successful development of EPNs as biological insecticides. Therefore, new methods are being explored to increase nematode production and reduce cost. Production approaches include in vivo and in vitro (solid or liquid fermentation) methods. Nematodes are more than 70 years old and are produced using these methods. These three different methods of mass production of entomopathogenic nematodes have advantages and disadvantages in vivo production, in vitro solid production and in vitro liquid production methods. In vivo production Small farmers are considered suitable for laboratory use with the advantage of easy installation and low production costs in small businesses focused on niche markets. However, due to the costs of labor and insects, the scale lacks economics. For large scale production, in vitro methods are used. In vitro liquid culture is the method of forming a large part of commercial production as well as capital expenditures. In vitro solid production is often the intermediate form between the two other methods. Therefore, in this study, it was aimed to develop a more suitable solid medium by investigating glucose, canola oil and sodium chloride activity in order to increase the in vitro solid production of *Heterorhabditis bacteriophora* strain and reduce the cost. Entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and symbiotic bacteria *Photorhabdus* spp. four different solid culture media have been tested for in vitro mass production.  $2.1 \times 10^3$  IJ/ml was infused into each medium *Heterorhabditis bacteriophora*. EPN development was observed within 4 weeks. As a result, the highest yield was obtained from G. WOUTS 2 medium with  $51875 \times 10^3$  IJ / ml. The production system developed in this study offers competitive technology to produce EPN products without the need to invest in large scale liquid fermentation equipment using petri dishes and a relatively inexpensive production environment and simple solid culture growing conditions.

**Key words:** *Heterorhabditis bacteriophora*, entomopathogenic nematode solid production in vitro, canola oil, glucose, sodium chloride

**2018, vii + 54 pages**

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

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

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim süresince eğitim hayatıma katkıda bulunan Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi' nin değerli hocalarıyla tez çalışmasının yürütülmesinde, laboratuvarındaki çalışmanın hazırlanma sürecinin her aşamasında bilgilerini, tecrübelerini ve değerli zamanlarını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan çok değerli hocam Sayın Araş. Gör. Tufan Can ULU ve çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Büşra SADIÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

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 DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
3.1. Laboratuvarda <i>Galleria mellonella</i> Larvalarının Üretimi.....	21
3.2. Entomopatojen Nematod <i>H. bacteriophora</i> ve Mutualist Bakterisi <i>Photorhabdus</i> spp. Kültürlerinin Hazırlanması.....	23
3.3. <i>H. bacteriophora</i> 'nın İn Vitro Katı Kültür Üretimi İçin Kullanılan Ortamların İçeriği.....	26
3.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerileri.....	27
3.5. Çalışmada Kullanılan Besiyerilerinde Hermafrodit ve IJ Sayımı.....	33
3.5.1. Hermafrodit Sayımı.....	33
3.5.2. IJ Sayımı.....	34
3.6. İstatistiksel Analiz.....	38
4. BULGULAR.....	39
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	42
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	544

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

G	Gram
ml	Mililitre ( $1 \times 10^{-3}$ l)
$\mu$ l	Mikrolitre ( $1 \times 10^{-3}$ ml)
mm	Milimetre ( $1 \times 10^{-3}$ m)
$\mu$ m	Mikrometre ( $1 \times 10^{-3}$ mm)
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
cm	Santimetre ( $1 \times 10^{-2}$ m)
$\text{cm}^2$	Santimetrekaire ( $1 \times 10^{-4}$ m <sup>2</sup> )

### Kısaltmalar

DO	Dissolved Oxygen- Çözünmüş Oksijen
Dk	Dakika
EPN	Entomopatojen Nematod
IJ	İnfektif Juvenil
J3	Üçüncü Dönem Larva
J4	Dördüncü Dönem Larva
L.	Linnaeus
L	Litre
NBTA	Nutrient agar + bromothymol blue + tetrazolium chlorid
Ordo	Takım
Psi	Basınç Birimi
spp.	Species (çoğul)
YS	Yeast extract + NaCl + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 3.1. Hazırlanmış olan besin ortamının görüntüsü .....	22
Şekil 3.2. Besin ortamının bulunduğu cam kavanozlarda <i>Galleria mellonella</i> yumurta ve son dönem larvalarının görüntüsü.....	22
Şekil 3.3. Besin ortamı içerisindeki <i>Galleria mellonella</i> larvalarının görüntüsü .....	23
Şekil 3.4. Sıvı besiyeri YS (Yeast Salt) ortamında yetiştirilen <i>Photorhabdus</i> spp. bakterisinin çalkalayıcı inkübatör içerisindeki görüntüsü.....	24
Şekil 3.5. Wouts agarında üretilmiş olan Hb. H. ırkının görüntüsü.....	25
Şekil 3.6. Dört farklı katı ortamın otoklavlanmadan önce 50 ml distile su içerisindeki görüntüsü.....	29
Şekil. 3.7. Her bir katı ortama ait 4 adet ve toplamda 16 adet petrinin görüntüsü.....	30
Şekil 3.8. Wouts ortamında gelişmiş olan simbiyont bakteri ve iki gün sonra bu ortama damlatılmış olan Hb.H. ırkının görüntüsü .....	31
Şekil 3.9. G. Wouts 1 ortamında gelişmiş olan simbiyont bakteri ve iki gün sonra bu ortama damlatılmış olan Hb.H. ırkının görüntüsü .....	32
Şekil 3.10. G. Wouts 2 ortamında gelişmiş olan simbiyont bakteri ve iki gün sonra bu ortama damlatılmış olan Hb.H. ırkının görüntüsü .....	32
Şekil 3.11. G. Wouts 3 ortamında gelişmiş olan simbiyont bakteri ve iki gün sonra bu ortama damlatılmış olan Hb.H. ırkının görüntüsü .....	33
Şekil 3.12 Petrielerde üremiş olan hermafroditlerin görüntüsü.....	34
Şekil 3.13. Petri kapağına çıkış yapan IJ' lerin görüntüsü.....	35
Şekil 3.14. Petri kapağındaki su damlacıkları içerisindeki IJ' lerin görüntüsü.....	36
Şekil 3.15. Sayım yapmak için steril kabin içerisinde kapağa çıkış yapan IJ' ler yıkanarak 1,5 ml' lik eppendörf tüplere alınmıştır. Her bir örnek için eppendörf tüplerden dört kez 10 µl alınarak sayım yapılmıştır. Sayım kabının bir bölmesinde bulunan IJ'lerin görüntüsü .....	37
Şekil 3.16. Petri kapağına çıkış yapan IJ'lerin falkon tüpe alınarak 15 ml'lik solüsyon elde edilmesi.....	37
Şekil 3.17. Bütün deneme grupları petriyelerinden elde edilen Hb. H. bireylerinin falkon tüplerde toplanması .....	38
Şekil 4.1. Her bir ortam için iki günde bir toplamada üç kez yapılmış olan sayım sonucunda elde edilen ortalama hermafrodit sayısı (df: 3, 12; F: 66.55; P<0.001) .....	39
Şekil 4.2. Her bir ortam için iki günde bir toplamada üç kez steril kabin içerisinde kapağa çıkış yapan IJ'lerin sayımı sonucu elde edilen ortalama IJ sayısı (df: 3, 8; F: 5.97; P= 0.009).....	40
Şekil 4.3. Her bir ortam için kapağa çıkış gözlenen üç adet petri kapağı ve agarlarının yıkanması sonucu elde edilen ortalama IJ sayısı (df: 3, 8; F: 10.37; P= 0.003) .....	41

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 3.1. <i>G. mellonella</i> besin ortamı içeriği.....	21
Çizelge 3.2. İn vitro katı üretim için dört farklı ortam hazırlanmış olup kullanılan maddeler ortamda Mevcut ise (+) işareti ile mevcut değilse (-) işareti ile yukarıdaki şekilde gösterilmiştir. ....	26



## 1.GİRİŞ

Nematodlar çok hücreli canlılar içerisinde birey sayısı bakımından yeryüzünde en fazla bulunan canlı grubu olup, kambriyen patlamasıyla ya da bundan kısa bir süre önce ortaya çıktıkları tahmin edilmektedir. Tür sayısının 400 000 ile 10 milyon arasında hatta daha yüksek bir rakam olan 100 milyon gibi olduğu düşünülmektedir (Adams ve ark. 2006). Şimdiye kadar böceklerle ilişkili olan 30' dan fazla nematod familyası tanımlanmıştır. Tanımlanan bu familyalar içerisinde 7 tanesinin [(Mermithidae ve Tetradonematidae (Ordo: Stichosomida); Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae ve Sphaerulariidae (Ordo: Tylenchida); Heterorhabditidae ve Steinernematidae (Ordo: Rhabditida)] bağlı olduğu türler böceklerle biyolojik mücadelede kullanılma potansiyeline sahiptir (Stock ve Hunt 2005, Koppenhöfer 2007). Ancak günümüzde yalnızca Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına bağlı olan nematodlar mikrobiyal insektisit olarak kullanılmakta ve dünya genelinde pek çok firma tarafından ticari olarak üretilmektedir (Koppenhöfer 2007).

Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına bağlı olan nematodlar doğada zorunlu böcek patojenleridir. Dünya üzerinde Antarktika kıtası hariç hemen her yerden izole edilmişlerdir. Bu nematodlar topraktan elde edilirler ve dağılımları öncelikle uygun konukçularının varlığı ile belirlenmektedir (Adams ve ark. 2006). Steinernematidae familyasında *Steinernema* ve *Neosteinernema* olmak üzere iki farklı cins bulunmaktadır. Şimdiye kadar *Steinernema* cinsinde 63 tür, *Neosteinernema* cinsinde ise yalnızca 1 tür tespit edilmiştir. Heterorhabditidae familyasında da iki farklı cins olmakla birlikte *Heterorhabditis* cinsinde 18 tür ve *Heterorhabditoides* cinsinde ise 1 tür olmak üzere toplam 19 tür tanımlanmıştır (Mráček ve ark. 2006, Uribe-Lorio ve ark. 2007, Zhang ve ark. 2008, Lee ve ark. 2009, Stock ve ark. 2009). Yapılan filogenetik çalışmalar omurgalı canlılarda parazit olan Strongylida ile Heterorhabditidae familyasının yakın akraba olduğunu göstermektedir. Strongylida ise serbest yaşayan ve bakteri ile beslenen Pellioditis ile en yakın ortak atayı paylaşmaktadır. Bu nedenle Heterorhabditlerin büyük olasılıkla serbest yaşayan ve bakteri ile beslenen bir atadan geldiği tahmin edilmektedir. Aynı hipoteze göre Steinernematidae familyasının serbest yaşayan, böceklerle ilişkili Panagrolaimoidae ve omurgalı paraziti Strongyloididae familyalarıyla yakın akraba olduğu düşünülmektedir.



Bu sonuçlara göre Steinernematidae familyası serbest yaşayan, fungusla beslenen ve bitki parazitlerini içeren taksonların bulunduğu daha geniş bir gruba aittir. Bu nedenle kökeni ile ilgili belirsizlikler vardır (Adams ve ark. 2006).

“Entomopatojen nematod (EPN)” terimi ile mutualistik bakteriler yardımıyla konukçularını kısa sürede öldürebilen (nematod ve konukçu türüne bağlı olarak 1-4 gün arasında değişen sürelerde) nematodlar kastedilmektedir (Adams ve ark. 2006). Steinernematidae familyası *Xenorhabdus*, Heterorhabditidae familyası ise *Photorhabdus* cinsi bakteriler ile mutualistik ilişki içerisindedirler (Bode 2009). Taksonomik çalışmalara göre her bir entomopatojen nematod türü sadece bir bakteri ile mutualistik ilişki içerisindeyken, bakteri simbiyotları birden fazla nematod türü ile ilişkili olabilmektedir (Hazır ve ark. 2003). Bu mutualistik ilişkinin Heterorhabdit ve Steinernematid nematodların atalarıyla *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* cinsi bakterilerin soylarını oluşturan Gram-negatif enterik bakteriler (Enterobacteriaceae) arasında birbirinden bağımsız olarak ilk defa Orta Paleozoikte (yaklaşık 350 milyon yıl önce) başladığı düşünülmektedir. Bakteriler bu simbiyotik ilişkide dış ortamdaki çevre şartlarından ve topraktaki rekabet ortamından korunarak besince zengin böcek dokusuna kendilerini taşıtırlar (Adams ve ark. 2006). Nematodlar ise bakterinin patojenik özelliği ile konukçuyu öldürmesinden faydalanmaktadır. Ayrıca bakteriler nematodun gelişimi ve üremesi için böcek dokusunu uygun hale getirmektedirler. Bunun yanı sıra bakteriler nematodların içerisinde üremekte olduğu kadavraya topraktaki diğer mikroorganizmaların yerleşmesini engellemektedir (Boemare 2002, Griffin ve ark. 2005). Ortaya çıkan bu bakteri - nematod kompleksinin zararlı böceklere karşı güçlü bir biyolojik mücadele silahı haline gelmesini son 15 yıldır bu gruplar üzerine yapılan araştırmaların artmasıyla açıklamak mümkündür (Adams ve ark. 2006).

Bilinen bütün EPN türleri benzer biyolojiye sahiptirler. Bu nematodların sadece infektif veya dauer juvenil (IJ) olarak adlandırılan evresi toprakta bulunmaktadır. Bu evrede ağız ve anüs kapalı durumda olup, beslenme ve üreme olayları gerçekleşmez (Kaya ve Gaugler 1993). Toprakta kendilerine uygun bir konukçu bulan IJ'ler, böceğin doğal açıklıklarından (ağız, spirakıl, anüs) veya kütikulasındaki hassas bölgelerden (sadece

heterorhabditlerde görülmüştür) hemosöl (vücut boşluğu) içerisine girip ortama simbiyont bakterilerini bırakmaktadırlar.

*Xenorhabdus* cinsi bakteriler nematodların anüsünden, *Photorhabdus* cinsi bakteriler ise nematodların ağzından konukçu hemosöline salınmaktadır (Adams ve ark. 2006). Böcek hemosölü içerisine salınan bakteriler burada hızlı bir şekilde üremeye başlayarak bir dizi toksin ve hidrolitik enzim üretirler. Konukçu böcek bu olay sonucunda 24-48 saat içerisinde septisemiadan (kan zehirlenmesi) ölmektedir. Salınan enzimler aynı zamanda böcek dokusunu parçalayıp nematodların üreme ve gelişimleri için gerekli olan bir besin çorbası oluştururlar. Ayrıca bakteriler ürettikleri bazı maddeler sayesinde kadavrayı diğer mikroorganizmaların istilasına karşı korumaktadır (Forst ve Clarke 2002, Clarke ve Eberl 2006). Konukçu içerisinde gelişmeye başlayan infektif juvenil nematodlar, parçalanmış böcek dokusu ve bakterilerden oluşan karışımla beslenerek 4. juvenil evre, ardından ergin dişi ve erkek nematodlar haline gelmektedir. Çiftleşen dişiler yumurtalarını konukçu dokusuna bırakabilir veya olgun dişiler uterusları içerisinde yumurtalarını bekletebilmektedir. Gelişimlerini tamamlayıp açılan yumurtalardan çıkan yeni nesil nematodlar konukçunun veya dişi bireyin vücut dokusuyla beslenmeye başlamaktadır. Bu sırada vücutlarının içerisi yeni nesil infektif juvenillerle dolu olan dişi nematodların bu durumuna “Endotokia matricida” evresi adı verilmektedir (Griffin ve ark. 2005). Genel olarak bakıldığında EPN’lerin hayat döngülerinde yumurta, 4 adet juvenil (J1, J2, J3, J4) evre ve ergin evre olmak üzere 6 evre bulunmaktadır. Nematodların üremesi kadavradaki besin tükeninceye kadar devam etmektedir. Bu sırada konukçunun büyüklüğüne bağlı olarak birlikte genellikle 1-3 jenerasyon meydana getirilmektedir. Besin tükendiği zaman gelişimlerini infektif juvenil (J3) safhasında durduran ve simbiyont bakterilerini vücutlarında tekrar depolayan yeni nesil IJ’ler kadavrayı terk ederek yeniden konukçu aramaya başlamaktadır (Adams ve Nguyen 2002, Hazır ve ark. 2003). Heterorhabditler ile Steinernematid’lerin hayat döngüleri arasındaki en önemli farklılık Heterorhabditis erginlerinin kadavra içerisindeki ilk jenerasyonda hermafrodit bireylerden oluşmasıdır. Sonraki nesillerde ise hermafroditlerle birlikte ayrı eşeyli bireyler de görülmektedir (Gaugler ve Kaya 1990). Oysa *Steinernema* erginlerinde bütün jenerasyonlarda bireyler

ayrı eşeylidir. Bir istisna olarak *Steinernema hermaphroditum* türünde ilk jenerasyonda hermafrodit bireylere rastlanmıştır (Stock ve ark. 2004).

Zararlıları kontrol altına almak için kullanılan böcek ilacı kullanım sıklığı günümüzde giderek artmaktadır (Rahim 2010). Sentetik pestisitlerin sürekli kullanımı, ikincil zararlıların artışına neden olabileceği gibi hedef olmayan böceklerin yok edilmesi ve ekosistem yapısını oluşturan hayvanlar da dâhil olmak üzere çevreye zarar vermektedir (Djunaedy 2009).

Steinernematidae ve Heterorhabditidae familyalarına ait olan nematodlar geniş bir konukçu dağılımına sahiptirler. Ayrıca kitlesel olarak in vivo ve in vitro yöntemlerle üretilebiliyor olmaları, sadece böceklere özelleşmiş olmaları, çevre ve insan sağlığı açısından herhangi bir tehdit oluşturmamaları nedeniyle bu grup nematodların güvenilir biyolojik mücadele ajanı olarak adlandırılmalarını sağlamıştır (Gaugler ve Kaya 1990, Koppenhöfer 2000).

EPN' ler hem in vivo hem de in vitro ortamda toplu olarak (Uhan 2008) katı veya sıvı ortamda yetiştirilebilir (Malik 2010). In vivo üretim, böceklerin bir nematod süspansiyonuna daldırılması veya (bazı durumlarda) böceklerin gıdasına nematodların uygulanmasıyla başarılabilir. Konukçuların daldırılması genellikle daha verimli ancak diğer işlemlerden daha fazla nematod gerektirir (Shapiro-Ilan ve ark. 2002a). İn vitro seri üretimin öncüsü olarak Glaser (1931) kabul edilir (Stoll 1952). EPN' lerin in vitro üretimi, nematodların besleyici bir ortamda simbiyontlarının saf bir kültürüne dâhil edilmesine dayanır (Akhurst 1980, Wouts 1981). İn vitro katı kültür ilk olarak iki boyutlu alanda, çeşitli ortamlar kullanılarak petri tabakalarında gerçekleştirilmiştir (Hara ve ark. 1981, Wouts 1981). Daha sonra in vitro katı kültür parçalanmış polieter poliüretan sünger üzerinde nematod kültürü içeren üç boyutlu yetiştirme sisteminin icadı ile önemli ölçüde ilerleme kaydetmiştir (Bedding 1981). Sıvı ortam köpük ile karıştırılmış otoklavlanmış ve daha sonra bakteri ile inokule edilmiştir (aşılanır) bunu nematodlar izlemiştir. Nematodlar daha sonra suya daldırılmış eleklerin üzerine köpük yerleştirilerek 2-5 hafta içerisinde toplanmıştır (Bedding 1981, Bedding 1984). Bu yaklaşımın ortamının başlangıçta hayvansal ürün bazlı olduğu (örneğin domuz böbreği

veya tavuk sakatı) ancak daha sonra geliştirildiği ve pepton, maya ekstraktı, yumurta, soya unu ve domuz yağı içeren çeşitli bileşenleri içerdiği belirtilmiştir (Han ve ark. 1992, 1993).

Bedding (1981) tarafından geliştirilen yaklaşım filtrelenmiş hava pompalanan otoklavlanabilir torbalara dönüştürülmüştür (Bedding 1984). Havalandırma, otomatik karıştırma ve otoklavlama aynı anda nematod ve bakteri inokulasyonu, steril oda teknolojisi, santrifüjlü elekler yoluyla otomatik hasat ve gaz geçirgen Tyvac şeritleri olan torbalar da dahil olmak üzere çeşitli ölçülerle büyük ölçekli üretim geliştirilmiştir (Gaugler ve Hand 2002).

EPN' ler sıvı kültür içinde ise ilk defa Stoll (1952) tarafından üretilmiştir. Genellikle sıvı kültürde de ilk önce simbiyotik bakteriler bulaştırılmış ardından nematodlar bulaştırılmıştır. (Buecher ve Popiel 1989, Surrey ve Davies 1996, Strauch ve Ehlers 2000). Soya unu, maya ekstraktı, kanola yağı, mısırözü yağı, devedikenini yağı, yumurta sarısı, kazein pepton, süt tozu, karaciğer ekstraktı ve kolesterol dâhil olmak üzere in vitro sıvı kültür üretimi için çeşitli ürünler bildirilmiştir (Surrey ve Davies 1996, Ehlers ve ark. 2000, Yoo ve ark. 2000). Kültür sürelerinin ortam ve türe göre değiştiği ve üç hafta kadar uzun olabileceği (Surrey ve Davies 1996, Charvveris-Hernandez ve de la Torre 2001) ve birçok tür iki hafta veya daha kısa sürede maksimum IJ üretimine ulaşabilmiştir (Friedman 1990, Ehlers ve ark. 2000, Neves ve ark. 2001, Strauch ve Ehlers 2000, Yoo ve ark. 2000). Kültür tamamlandıktan sonra, nematodlar ortamdan santrifüj yoluyla toplanabilmiştir (Surrey ve Davies 1996).

Düşük maliyetli kitlesel üretim, EPN' lerin biyolojik insektisit olarak başarılı bir şekilde geliştirilmesinde önemli bir ön şarttır. Nematodlar 70 yıldan fazla bir süredir in vivo ve in vitro teknikler kullanılarak üretilmiştir, in vitro katı ve sıvı ortamlar büyük ölçekli ticarileştirme amaçlı kullanılmaktadır (Gaugler ve Han 2002). İn vivo üretim küçük çaplı çiftçiler, niş pazarlara odaklanmış küçük işletmelerde kolay kurulum ve düşük üretim sermayesi avantajıyla laboratuvar kullanımı için kabul edilmiştir. Sermaye gereksinimi düşük olmasına rağmen, bu yöntem el işçiliği yüksek girdiler gerektirir.

In vivo üretim yöntemi duyarlı konukçuların sürekli sağlanmasına dayanır. En sık kullanılan konukçu böcek, EPN' ye duyarlı olan ve yüksek verim sağlayan büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella*, L.) (Lep.: Pyralidae) son dönem larvalarıdır (Woodring ve Kaya 1988). İn vivo üretim, düşük bir hacim ile karakterize edilen bir ev içi üretim sanayi için uygundur ve üretim Beyaz tuzaklar veya değiştirilmiş Beyaz tuzakların kullanımı ile yapılır (Sharma ve ark. 2011).

In vivo kitle üretimindeki son gelişme Gaugler ve arkadaşları tarafından geliştirilen nematod göçüne dayanmayan bir hazne LOTEK sisteminin geliştirilmesiydi. Sistem böcekleri korumak için delikli tepsiler, tutma tepsileri boyunca IJ'leri merkezi bir toplu depolama tankında yıkayan ve tıkanıklığı gidermek, konsantre hale getirmek için sürekli bir saptırma ayırıcı kullanmak üzere püskürtme sistemi ile toplama makinesinden oluşur.

In vitro seri üretim, büyük sermaye yatırımları (biyoreaktörler, fermantasyon teknolojisi vb.) gerektirir ve bu nedenle büyük ölçekli ticarileştirme için daha uygundur (Lacey ve Georgis 2012). In vitro sıvı kültür, EPN' lerin üretilmesi için en uygun maliyetli yöntem olarak düşünülür ve bu nedenle EPN' lerdeki dünya pazarının büyük kısmını oluşturur. Entomopatojen nematodların sıvı kültürü 80 000 litreye kadar biyoreaktörlerde üretilmiştir (Georgis ve ark. 1995). Sıvı kültür diğer üretim yöntemlerine göre üretim verimliliğini arttırmasına rağmen, daha fazla sermaye yatırımı ve ileri düzeyde teknik uzmanlık gerektirir. Birkaç rapor in vitro sıvı kültürde üretilen EPN' lerde katı kültür veya in vivo üretilenlere kıyasla kalitenin veya etkinliğin azaldığını belirtmiştir (Gaugler ve Georgis 1991, Cotrell ve ark. 2011) oysa diğer karşılaştırmalarda herhangi bir fark tespit edilmemiştir (Georgis ve Gaugler 1991, Shapiro ve McCoy 2000a). Dolayısıyla, yüksek kaliteli EPN' lerin in vitro sıvı kültürü kullanılarak üretilebileceği açıktır; ancak biyoreaktördeki ortam bileşimi ve çevresel koşullar gibi faktörler veya sonraki işlemler kaliteyi düşürebilir. Sıvı kültür teknolojisinde son zamanlardaki bazı gelişmeler, üretim kalitesini ve verimliliğini arttırmaya örneğin modelleme yoluyla ortam ve biyolojik süreç kinetiğini en iyi duruma getirilmesinin yanı sıra (Chawaria-Hernandez ve ark. 2006, 2010), inokulum ve bakteri hücre yoğunluğundaki iyileşmelere (Hirao ve Ehlers 2010), inokulasyon zamanlaması (Johnigk ve ark. 2004) ve sonraki

işlem basamaklarına (Young ve ark. 2002) hizmet etmektedir. Sıvı kültürde gelecekteki araştırma ve geliştirmeye (en uygun ortam ve biyoreaktör tasarımı üzerinde durulması) yüksek verim ve düşük maliyet gibi ek faydalar getirmesi bekleniyor. Son zamanlarda EPN'lerin in vitro katı üretiminin artırılmasına yönelik ilerlemeler yapılmıştır. Örneğin Çin' de daha düşük işçilik maliyetine gelişmiş ortam ve makineleşme sürecine dayanan çeşitli EPN türlerinin katı üretimi için bir pilot fabrika kurulmuştur.

Üretim verimliliğini etkileyen faktörler araştırılarak, ortam geliştirme kültür parametrelerinin optimizasyonu, IJ inokulünün geri kazanımı, IJ' lerin oluşumu, IJ' lerin çıkartılması ve toplanması dahil edilmiştir (Han ve ark. 1995,1997). Guangdong Entomological Enstitüsü gözetiminde Century Horse Development Ltd. adlı bir şirket şu anda ticari üretimde; katı kültür yöntemiyle elde edilen ürünlerini Çin' den iç ve dış pazarlara saha denemeleri için sağlamaktadır.

EPN' lerin in vitro üretimi yapay ortam kullanılarak yapılır (Somwong ve Petcharat 2012, Yoo ve ark. 2000). Maksimum nematod gelişimi ve üremesi, ortam bileşiminin en uygun hale (yani kaliteli, yüksek verim, kısa fermentasyon döngüsü) getirilmesiyle başarılabılır. Lipidler, diğer herhangi bir nematod beslenme bileşiminden daha fazla ilgi çekmiştir (Selvan ve ark. 1993, Abu Hatab ve Gaugler 1997b). Çünkü beslenmeyen infektif juvenillerde toplam enerjinin % 60' ı metabolizan (metabolizma için kullanılan) lipidlerden türemiştir (Selvan ve ark. 1993). Entomopatojen türler, lipid sentezinde sınırlı bir yeteneğe sahiptirler ve ihtiyaç duydukları temel lipidleri için konukçuya güvenirlir. *Heterorhabditis bacteriophora* infektif juvenilleri % 39 lipid içerir (Çoğunlukla triasil – gliserol; Selvan ve ark. 1993; Barret ve Wright 1999) ve yağ asitlerinin % 45' i tekli doymamıştır (Abu hatab ve Gaugler 1999). Buna göre entomopatojen nematodların lipid bileşimi yetiştirme ortamının lipid bileşimi ile önemli ölçüde değişir (Abu Hatab ve ark. 1998, Abu Hatab ve Gaugler 1999). Ayrıca simbiyotik bakterilerin lipidleri de sıcaklık ve besin kaynağından etkilenir (Abu Hatab ve Gaugler 1997a, Fodor ve ark. 1997). Verimi olumlu yönde etkilediği bildirilen diğer besin maddeleri arasında glikoz (Jeffke ve ark. 2000) ve maya özütü içeriği vardır (Chavvaria-Harnandez ve de la Torre 2001). Ortam bileşimi katı kültürde verim üzerinde önemli etkilere sahip olabilir (Dunphy ve Webster 1989, Han ve ark. 1992).

Nematodun doğal konukçu bileşimini yansıtan lipid bileşenleri en uygundur (Abu Hatab ve Gaugler 2001, Abu Hatab ve ark. 1998). İn vitro sıvı kültürde, nematod ve bakteri üremesi için başlıca karbon kaynakları olarak zeytinyağı ve kanola yağı gibi lipid bileşikleri kullanılır (Ehlers ve ark. 1998, Yoo ve ark. 2000). Nematod verimi üzerinde bir etkiye sahip olabilecek diğer ortam bileşenleri proteinler ve tuzları içerir (Dunphy ve Webster 1989).

EPN artık doğal zirai ilaç formunda üretilmektedir. Ancak EPN dayanıklı değildir, kolayca zarar görebilir ve pahalıdır. Çiftçiler uygun ve düşük maliyetli teknoloji ile yetiştirilen EPN cinsine ihtiyaç duymaktadırlar.

Yetiştirme teknolojisi bileşenlerinden biri EPN' lerin yetiştirildiği ortamıdır. Tarım alanındaki doğal mücadele ajanlarının talebini karşılamak için acilen EPN üretimi gereklidir. Bu nedenle erişilebilir ve uygun fiyatlı bir talebi karşılamak için ortam formülü değişikliği gerekmektedir. EPN üretimi için uygun teknoloji ile ortam formülünde bir değişikliğe ihtiyaç olduğu gibi talebi karşılamak ve çiftçiler için erişilebilir bir EPN üretim teknolojisi yapılmalıdır. Bu tez çalışmasında ortam formülünde bir değişikliğe gidilerek *Heterorhabditis bacteriophora* ve simbiyont bakterisi *Photorhabdus* spp. in vitro katı üretimini arttırmaya ve maliyeti azaltmaya yönelik olarak glikoz, kanola yağı ve sodyum klorür içeren dört farklı ortam denenmiştir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Shapiro-Ilan ve ark. (2012), yapmış olduğu bu araştırma Epn' lerin üretimini ve uygulamasını etkileyen faktörlerin bir özetini ve analizini sağlamak ve biyolojik kontrolde daha büyük başarı elde etmek için üretim yaklaşımların geliştirilmesine yönelik fikir sunmaktadır. Entomopatojen nematod üretim yaklaşımlarının karşılaştırılmasında faktör olarak altı değişken başlangıç masrafları/sermaye harcamaları, uzmanlık, kaliteye ulaşma kolaylığı, yeni nematod türlerine tekniğin uygulanması, iş gücü gereksinimleri, ölçek ekonomisi incelenmiş olup bu değişkenlerin üretim yaklaşımlarına (in vivo, in vitro katı ve in vitro sıvı) etkisi ortaya konulmuştur. Araştırma sonucunda in vivo EPN üretimi in vitro kültürle karşılaştırıldığında en az sermaye harcaması ve başlangıç için en az teknik uzmanlık gerektiren birçok avantaj sunmaktadır ek olarak in vivo üretilen nematodların kalitesi diğer yaklaşımlarla üretilen EPN'lere eşit veya bundan daha fazla olma eğilimindedir. Dahası üretim tekniklerini yeni veya ilave nematod türlerine veya ırklarına uyarlamak in vivo üretim için basittir; buna karşılık in vitro yöntemler ortam veya üretim parametrelerinde önemli ayarlamalar gerektirebilir. İn vivo EPN kültürünün in vitro yöntemlere göre birincil zorluğu in vivo kültürü en uygun maliyetli yaklaşım haline getirme eğiliminde olan böceklerin maliyetidir. Sermaye harcamaları ve ölçek ekonomisi bakımından in vitro katı kültürün yararları genellikle in vivo ve in vitro sıvı kültür arasındaki ara form olarak düşünülür. İn vivo üretimde de benzer şekilde makineleşme (emek-işçi azaltma) ve ortam geliştirme ile verimlilik artırılabilir. Birçok çalışma kalitenin in vivo yöntemlerle üretilen nematodlar ile benzer olduğunu belirtmektedir.

Shapiro-Ilan ve ark. (2014), yapmış olduğu bu çalışmanın amacı entomopatojen nematodların üretim metodolojisini gözden geçirmek ve analiz etmektir. Entomopatojen nematodların üç farklı yöntem kullanılarak seri olarak üretildiği in vivo üretim, katı ortamdaki in vitro kültür ve sıvı ortamdaki in vitro kültür; her yöntemin avantaj ve dezavantajlarından bahsedilmiştir. Örneğin in vivo üretim en az sermaye harcamasını gerektirir ancak iş gücü ve böceklerin maliyetlerinden dolayı ölçek ekonomisinden yoksundur. İn vitro sıvı kültür (ticari üretimin büyük bölümünü oluşturur) en büyük



sermaye harcamalarına ihtiyaç duyar ancak genellikle en yüksek ekonomik verimliliği sunar. İn vitro katı kültür çoğu açıdan diğer iki yöntem arasındaki ara formdur.

Üretim verimliliğini ve biyo-kontrol potansiyelini arttırmak için bir takım gelişmeler yapılabileceğinden bahsedilmiştir. İn vivo kültürün ev içi böcek üretmek ve iş gücünü azaltmak için tüm süreci mekanize etmek suretiyle kolaylaştırılabilir olduğundan bahsedilmiştir. İn vitro sıvı kültürün ise ortam optimizasyonu ve biyoreaktör işleme ile maksimize edilerek geliştirilebilir olduğu dile getirilmiştir. Üretim yaklaşımlarının tümü, gelişmiş ırk geliştirme programlarından ve yararlı özelliklerin stabilize edilmesine yönelik mekanizmalardan (seçilen benzer soyların kullanımı gibi) yararlanacaktır. Üretim verimliliği arttıkça entomopatojen nematodların biyolojik kontrolde kullanımı yaygınlaşacaktır.

Wouts (1981), EPN *Heterorhabditis heliothidis*' in kitlesel üretimi için yapay bir ortam hazırlamıştır. *H. heliothidis* IJ' leri tarladan toplanarak elde edilmiştir. Simbiyotik bakteri *Xenorhabdus luminescens* ise yaklaşık 10 IJ' nin büyük balmumu güvesi larvalarının karnına enjekte edilip 24 saat sonra larvaların hemolimfinin % 0,8 g Difco Bacto Nutrient Broth ve % 1,2 g agar içeren Nutrient Agar (NA) plakalarına çizilmesiyle elde edilmiştir. Ancak NA plakalarındaki simbiyotik bakteri nematod gelişimini desteklemediği için nutrient broth ikiye katlanmış ve % 1 mısırozü yağı eklenmiştir. Böylece güçlendirilmiş ortam nematodların doğal bir konukçu kadar hızlı geliştiği bir bakteri gelişimini desteklemiştir. Kitlesel üretim için hazırlanan ortamın içeriği 0,44 g Difco Bacto Nutrient Broth, 0,16 g Difco Bacto Yeast Extract, 7,2 g soya unu, 5,2 g mısır özü yağı ve 27 g sudan oluşmaktadır. Bu bileşenler suda eritilmiş ve unlu olan bu karışım pişirilerek daha fazla yüzey alanı oluşturmak için polieter poliüretan sünger parçalarına emdirilip 250 ml' lik Erlenmeyer şişesine yerleştirilip 100 kpa 15 dakika otoklavlanmıştır daha sonra nematodun simbiyotik bakteri *Xenorhabdus luminescens* süspansiyonu ile inokule edilerek 25 °C' de üç gün inkübe edilmiştir. Bakteri süspansiyonu ile inokulasyondan üç gün sonra güçlendirilmiş NA plakaları üzerinden alınan nematodlar (çoğunlukla beslenme aşamaları) ile nutrient agar kültüründen alınan nematodlar şişelere aktarılmıştır. Güçlendirilmiş NA plakalarından alınan nematodlar ile enfekte olmuş şişelerin, nutrient agar kültürlerinden alınan

nematodlarla enfekte olmuş şişelerden daha yüksek verim elde ettiği gözlenmiştir. Her iki durumda da iki hafta sonra şişe içinde dişiler gözlenmiştir. Yaklaşık üç hafta sonra da bu dişilerin yavruları infektif juvenillere dönüşmüştür.

Popülasyonun dört hafta sonra ekstraksiyona hazır olduğu ve her şişenin yaklaşık on milyon infektif juvenil ürettiği belirtilmiştir. Ayrıca ortam maddelerinin kullanılabilirliklerine göre adapte edilebileceği bağlayıcı bir ajan olarak işlev gören soya ununun yerine öğütülmüş darı, buğday tohumu veya ince taneli mısır unu ile değiştirilebileceği ancak gluten ununun zehirli olduğu dile getirilmiştir. Agarın uygun bir bağlayıcı ajan olmadığı çünkü sterilizasyon sırasında otoklavda sıvılaştığı dile getirilmiştir. Agar ortamında % 1' den fazla yağ kullanılması plaka yüzeyinde sürekli bir yağ tabakası oluşmasına ve bakteri gelişimini engelleyeceği dile getirilmiştir. Ortamın yağ bileşenin mısırözü yağı ile sınırlı olmadığı bunun yerine soya yağı, aspir yağı, ayçiçeği yağı ve hayvansal yağlar gibi yağlar kullanılabileceği gibi bir miktar tereyağının da kullanılabileceği söylenmiştir.

Floyd ve ark. (2012), entomopatojen nematodların sıvı ortamda kitle halinde üretilip ticarileştirilmesinin büyük bir zorluk haline geldiğini bunun sebebinin ise üreticilerin seri üretimin ticari sırlarını paylaşmak istememelerine bağlamışlardır. Üreticilerin bunu yaparak EPN' lerin mevcut teknolojiyle ilerlemesinde bir engel oluşturduğunu dile getirmişlerdir. Bununla birlikte teorik olarak sıvı ortamda kitle üretimin maliyet etkinliğini ve nematod sayısını arttırdığı için ideal bir kültürleme yöntemi olduğunu düşünmektedirler. Bu çalışmada mevcut kültür yöntemleri incelenmiş ve kitle üretim için temel kültür parametreleri önerilmiştir. Bu çalışma *Heterorhabditis bacteriophora*' ya odaklanmıştır; ancak buradaki bilgilerin diğer nematod türleri için de yararlı olabileceği dile getirilmiştir. Sıvı kültürde faydalı nematodların üretilmesi için gerekli üreme ortamının varyant bakteriler tarafından kullanılabilen bir sıvı ortam formülasyonu içermesini, biyolojik bir korumanın (tamponun) ve bir kültür dengeleyicisinin eklenmesinin kültürleme işlemine fayda sağlayacağı dile getirilmiştir. Kullanılacak kültür için parametrelerden biri PH değerinin her iki simbiyont tarafından tolere edilebilir (PH= 7.0-7.3) olmasını önermişlerdir. Başka bir işlem parametresi olarak çözülmüş oksijen (DO: dissolve oxygen-çözülmüş oksijen) miktarının da önemli

olduğu söylenmiş ve nemotodların oksijen isteklerinin nematod büyüme evresine bağlı olduğunu ve IJ'lerin fazla olduğu zamanlarda DO' nun % 40, erginlerin fazla olduğu zamanlarda ise DO' nun % 60' a kadar çıkartılması gerektiği önerilmiştir.

Fermantasyonda bir başka önemli parametre olan ajitasyonun ergin döllenmiş nematodlar üzerindeki olumsuz etkisinin; çalkalama isteniyorsa 60 rpm' yi geçmemesi gerektiği vurgulanmıştır.

Bunun dışında IJ' lerin yayınlanan verimleri ml başına ortalama 20 000 ile 40 000 arasında ortalama sayıma göre önemli ölçüde değişiklik gösterdiği ve bu çalışmada belirtilen ortam formülasyonu ve proses parametreleriyle diğer araştırmacılar tarafından elde edilen veri aralığını aşan ml başına 50 000 IJ sayımı elde edilebileceği (yayınlanmamış veriler) söylenerek nematod veriminde tutarlılığın günümüzde de devam eden bir sorun olduğu dile getirilmiştir.

Somwong ve Petcharat (2012), bu çalışmada entomopatojen nematod *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Rhabditida: Steinernematidae) ve simbiyotik bakterisi *Xenorhabdus nematophila* üretiminde dört farklı kültür ortamı (üç suni ortam bir in vivo ortam) denemişlerdir. (1) numaralı ortam % 45 köpek maması, % 50 su, % 5 domuz yağı; (2) numaralı ortam % 6 toz haline getirilmiş balık, % 85,56 su, % 8,44 domuz yağı; (3) numaralı ortam % 8,75 ipekböceği pupaları, % 85,16 su, % 6,09 domuz yağı; (4) numaralı ortam *Spodoptera litura*' nın son dönem larvalarından oluşturulmuştur. İlk üç ortam in vitro kültür yöntemiyle hazırlanmış olup tüm bileşenler bir blender yardımıyla eşit bir şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra taşıyıcı malzeme olarak kullanılan sünger, 1 x 1 x 1 cm ebadında küçük parçalara kesilmiş ve her bir ortam, 500 ml/şişe konmadan önce, 1,5 g: 55 g oranında (sünger: ortam) ezilmiş sünger parçalarına emdirilmiş ve ortam şişeleri 121 °C'de 15 dakika ve 1,5 bar otoklavlanmıştır. Her bir ortam 5 ml YS broth içerisindeki *X. nematophila* ile inokule edilmiştir. Bakteri kültürleri 23 °C'de 20 gün inkübe edilmiş ve şişe içerisindeki sünger parçaları alınarak Beyaz tuzağa aktarılmış ve nematodlar temelde ayrı olarak her gün % 0,1 formalinde toplanmışlardır. şişe başına üretilen toplam nematod sayısı hesaplanmış ve kaydedilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur. İn vivo kültür yöntemiyle oluşturulan ortam

4' te ise 15 × 90 mm' lik petri tabağına Whatman filtre kağıdı yerleştirilerek 500 ml/IJ içeren *S. carpocapsae* ile emdirilmiş ve *S. litura* larvaları filtre kağıdının üzerine yerleştirilmiştir 24-48 saat içerisinde *S. litura larvaları*'nın öldüğü gözlenmiştir. 30 °C'de 7 gün inkübe edildikten sonra kadavra larvalardan çıkış yapan IJ 'ler toplanarak sayımları gerçekleştirilmiştir.

1, 2, 3 ve 4 numaralı ortamdan elde edilen sonuçlar sırasıyla  $3.038 \times 10^5$ ,  $2.445 \times 10^5$ ,  $2.989 \times 10^5$  ve  $5.547 \times 10^5$  IJ/gram olarak verilmiştir. Ortam 1, 2 ve 3' te bulunan nematod sayısının konukçuda yetiştirilenden (ortam 4) önemli ölçüde farklı olduğu gözlenmiştir. 1 ve 3. Ortamdaki nematod sayısının önemli ölçüde farklı olmadığı gözlenmiştir.

Bu iki ortamın ortam 2'den daha fazla lipid içerdiği belirtilmiştir. Köpek maması ve ipekböceği pupası ile tamamlanmış besiyerlerde, her iki besiyeri de toz haline getirilmiş balık ortamından daha fazla nematod çoğalmasını desteklemiştir. 1, 2, 3 ve 4 numaralı ortamlarda beslenen infektif juvenillerin ortalama vücut genişliği sırasıyla  $25.33 \pm 1.24$ ,  $26.17 \pm 1.98$ ,  $25.40 \pm 1.75$  ve  $24.85 \pm 1.73$  µm olduğu ve vücut uzunluklarına bakıldığında sırasıyla  $536.45 \pm 31.57$ ,  $579.85 \pm 23.91$ ,  $572.39 \pm 31.57$ , ve  $554.57 \pm 37.06$  µm ile ortam 2' dekilerin en uzun ve en geniş gövdeye sahip olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, nematodun uzunluğunun genişliği kadar önemli olmadığı çünkü enfeksiyon işlemi sırasında nematodların konukçunun doğal açıklıklardan vücuduna girmesinin önemli olduğu vurgulanmıştır. Ortam 1, 2, 3 ve 4' te yetiştirilen nematodlar sırasıyla % 5.58, % 4.30, % 5.70 ve % 5.76 penetrasyon oranına sahip olduğu belirtilmiştir. Ortam 2'de yetiştirilen nematodların en düşük penetrasyon oranına sahip olduğu, ortam 1, 3 ve 4' te yetiştirilen nematodların farklı penetrasyon yüzdesine sahip olduğu görülmüştür. Bunun sebebinin ise nematod gövde genişliğiyle ilgili olabileceği ortam 2' den alınan nematodların en büyük gövde büyüklüğüne sahip olmaları konukçularının vücut açıklığından içeri girmek için bazı tıkanıklıklara neden olabilecekleri bunun aksine vücutlarının genişliği daha düşük olan diğerlerinin daha iyi nüfuz ettikleri şeklinde açıklanmıştır. 24 ve 48 saat içinde IJ' ler tarafından gerçekleştirilen *S. litura* ölüm yüzdeleri test edilmiştir. 1, 2, 3 ve 4 ortamında yetiştirilen nematodlar sırasıyla 24 saat içinde % 36, % 24, % 38 ve % 40 ölümlere neden olurken 48 saat içinde % 64, % 76, %

62 ve % 60 ölüm oranları belirtilmiştir. 24 saat içindeki en düşük ölüm oranı ortam 2' de gözlenmiştir tam aksine 48 saat içinde en yüksek ölüm oranı yine ortam 2' de gözlenmiştir. Bunun sebebinin ise ortam 2' de yetiştirilen nematodların daha büyük vücutlu olmasıyla daha fazla sayıda bakteri içermesine ve zaman geçtikçe bakterilerin çoğalıp daha fazla ölüme yol açtığı düşünülmüştür.

Tess ve ark. (2016), yapmış olduğu bu çalışmanın odak noktasını farklı yüzey alanlarına sahip tepsiler kullanarak katı agar ortamında *Heterorhabditis bacteriophara*'nın kitle üretimini sağlamak ve yüzey alanını iyileştirerek yararlı nematodların verimini arttırmak amaçlanmıştır. Çalışmada nematodların ilk büyüme döngüsü tamamlandıktan sonra 7 gün içinde toplandığı ve daha uzun bir kültür süresi uygulandığında mortalitenin arttığı dile getirilmiştir. Bu çalışmayla nematodların ortalama seri üretimi % 10' luk varyasyonla  $5,5 \times 10^5$  IJ/gram olmuştur. Katı agar ortamı, bu nematodların tüm yaşam döngüsü boyunca canlılığını koruyacak ideal bir büyüme ortamı sağlayacak % 2 agar ve % 1 zeytinyağı ile desteklenmiş  $2 \times$  nutrien broth (besleyici etsuyu) oluşturulmuştur. Otoklavlanmış ortam steril petri tepsileri, kurabiye tepsileri ve cam tepsiler içine aseptik olarak dağıtılmıştır. Petri tepsisi, cam tepsi ve kurabiye tepsinin yüzey alanları sırasıyla  $56 \text{ cm}^2$ ,  $742 \text{ cm}^2$  ve  $1218 \text{ cm}^2$  den oluşmaktaydı. Kültür plakalarına uygulanan ortalama inokulum yaklaşık  $0,5 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  yüzey alanıydı. Üç farklı yüzey alanı için inokulum hacimleri sırasıyla  $30 \mu\text{l}$ ,  $600 \mu\text{l}$  ve  $800 \mu\text{l}$  idi. Katı ortamın yüzeyine *P. luminescens* (yaklaşık olarak RLU  $1 \times 10^6$ ) optimal büyümesi elde edildiğinde petri tepsisi ( $56 \text{ cm}^2$ ), cam tepsi ( $742 \text{ cm}^2$ ), kurabiye tepsisi ( $1218 \text{ cm}^2$ ) yüzey alanına sırasıyla 500, 700 ve 900 nematod/ $\text{cm}^2$  inokule edilmiştir. IJ' ler 3. günün sonuna kadar hermafroditlere dönüştüğü ve daha sonra 4. günde erginlere dönüştüğü söylenmiştir. Yumurta ve 1. dönem IJ' lerin 5. günde gözlemlendiği 6. günde yumurta bırakmayan erginler endotokia haline ve ergin dişi vücudunda ilk nesil IJ'lere dönüştüğü bildirilmiştir. Her ortamın yüzeyinde 7. günün sonunda maksimum nematod yoğunluğuna ulaşılmıştır. 7. günde petri tepsisi ( $56 \text{ cm}^2$ ), cam tepsi ( $742 \text{ cm}^2$ ) ve kurabiye tepsisi ( $1218 \text{ cm}^2$ ) yüzeyinde sırasıyla 8000 nematod/ $\text{cm}^2$ , 17 000 nematod/ $\text{cm}^2$  ve 23 000 nematod/ $\text{cm}^2$  maksimum yoğunluklar elde edilmiştir. Petri tepsisi yüzeyinde nematod verimi  $X_{\text{max}} = 8000$ ,  $X_0 = 500$  IJ/ $\text{cm}^2$  olan çarpım faktörü  $X_{\text{max}}/X_0 \approx 16$  elde edilmiştir. Bununla birlikte cam tepsinin ve kurabiye tepsisinin yüzey

alanı üzerinde sırasıyla yaklaşık 24 ve 25 çarpım faktörü ile nematod verimleri artmıştır. Yoğunluk 700 nemtod/cm<sup>2</sup>, den 900 nemtod/cm<sup>2</sup>, ye yükseltilmiş olmasına rağmen cam tepsi ve kurabiye tepsisine inokule edilmiş nematodların benzer verim ürettiği bildirilmiştir.

Ramakuwela ve ark. (2016), yapmış olduğu bu çalışmada *Steinernema innovation*' nin in vitro seri üretimi için farklı inokulum tipleri altı adet katı yüzey ortamı hazırlanarak değerlendirilmiştir. Ayrıca maliyet analizi yapılarak tahmini satış fiyatı hesaplanmıştır. Daha sonra bu hesaplama piyasadaki ticari EPN ürünlerinin maliyeti ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada her inokulum tipi için altı farklı ortam test edilmiştir. Ortam (1) *Musca domestica* larva püresi 5 g + 0,15 g kanola yağı + 5 g soya unu + 0,13 g yeast extract; ortam (2) *Musca domestica* larva püresi 5 g + 0,15 g kanola yağı + 0,5 g soya unu + 0,37 g yeast extract; ortam (3) *Musca domestica* larva püresi + 0,15 g kanola yağı + 1,67 g soya unu + 0,13 g yeast extract; ortam (4) *Musca domestica* larva püresi 5 g + 0,15 g kanola yağı + 1,67 g soya unu + 0,37 g yeast extract; ortam (5) *Musca domestica* larva püresi 5 g; ortam (6) *Musca domestica* larva püresi 5 g + 0,15 g kanola yağından oluşturulmuştur. Her bir ortam 100 ml' de 0.5 g sünger küpleri (her biri 0,5 cm<sup>2</sup> ölçülmüştür) ile absorbe edilmiştir. Erlenmeyer şişeleri 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmış ve ortam 0,5 ml bakteri süspansiyonu ile inokule edilerek 27 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Şişeler daha sonra 0,5 ml monoksenik nematod kültürü ile BSA ortamı veya agar parçası [1,5 cm<sup>2</sup> Nutrient Lipid Agar (16 g Bacto nutrient broth, 12 g bacto agar, 5 g kanola yağı ve 1 L damıtılmış su)] ile inokule edilerek üreme boyutu ve inokulum tipinin nematod verimi üzerine etkisi test edilmiştir. Deney 1' de dört haftalık sıvı kültür inokulumu ile [918±761 IJ], deney 2' de iki haftalık katı kültür inokulumu [733±160 IJ], deney 3' te iki haftalık sıvı kültür inokulumu [418±79 IJ], deney 4' te Marmite (maya özütü Bokomo Foods tarafından üretilmiştir. 100 g başına karakteristik değer: 37,3 g protein, 0,5 g toplam yağ, 18,1 g karbonhidrat, 3480 mg sodyum ve 2 g lif) eklenmiş farklı bir ortam beş günlük sıvı kültür inokulumu [225±7 IJ] ile her bir ortam için beş şişe hazırlanmış ve ve şişeler 22 °C, de 28 gün inkübe edilmiştir. Ortam formülasyonu her üç deney için de verim üzerinde etkili olmuştur. IJ' lerin en yüksek verimi (781,678±221 IJ/5 g ortam) 6 numaralı ortamdandır (Musca domestica larva püresi 5 g + 0,15 g kanola yağı) elde edilmiştir. Bu ortam aynı zamanda toplama anında (28

gün) orta ve ölü IJ'lerin (< % 10) kalan en düşük ergin sayısına da sahip olmuştur. Ortam 6' dan sonra en yüksek verim ortam 1 ve 5' de gözlenmiştir. En yüksek konsantrasyonda yeast extract ve en düşük konsantrasyonda soya unu bulunan ortam 2 inokulum konsantrasyonundan bağımsız olarak üç deneyde de düşük bir verim üretme eğiliminde ancak tüm deneylerde anlamlı olarak düşük olmadığı görülmüştür.

Ayrıca Marmite® ortamda bir maya proteini kaynağı olarak eklendiğinde üretimin düştüğü belirtilmiştir. Marmite®'nin yüksek tuz içeriği (100 g başına 11) verim üzerinde olumsuz bir etkiye neden olduğu düşünülmektedir. İnokulasyonları karşılaştırdığımızda iki haftalık sıvı kültür inokulasyonu altı farklı ortam formülasyonunda da sayısal olarak daha fazla nematod üretimi sergilediği dile getirilmiştir. Sonuç olarak katı kültür sistemi ile üretilen *S. innovationi* için tahmini perakende fiyatı (50 milyon IJ başına R243,27 olup) E ~ Nema, BASF şirketi, Koppert, Biobest ve Natural Insect Control tarafından satılan diğer *Steinernema* tür ürünlerinden daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen üretim sistemi Erlenmeyer şişeleri kullanılarak nispeten ucuz bir üretim ortamı ve basit katı kültür büyütme koşulları kullanılarak büyük ölçekli sıvı fermentasyon ekipmanına yatırım yapmaya gerek kalmadan EPN ürünlerini üretmek için rekabetçi bir teknoloji sunmuştur.

Leite ve ark. (2017), sıvı, katı ve bifazik (modifiye edilmiş katı) ortamlarda nematod inokulum yaşının *Steinernema feltiae* üretimine olan etkisi ile çeşitli fiziksel parametreler ortam vizkozitesi (akışkanlığı), şişe boyutu ve havalandırma hızının infektif juvenillerin geri kazanımı, verimi üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışma inokulum yaşının EPN' nin büyüme ve verimi üzerindeki etkisini değerlendiren ilk araştırmadır. İnokulum yaşı 7, 14, 21 ve 28 günlük inokulum sıvı kültürlerini içeriyordu. Her bir inokulum yaşı için aynı sıvı kültürden alınan nematodlar daha önce *Xenorhabdus bovienii* ile kültürlenmiş bir sıvı ortam içine ilave edilmiştir; burada bakteriler önce sıvı ortamda yetiştirilmiş ve sonra nematod ile inokule edilerek homojen bir bakteri kültür sağlamak amacıyla süngerlere batırılmıştır. Deneyler Erlenmeyer şişeleri içinde yürütülmüştür. İki değişken ortam (% 0,2 g agar içeren ve içermeyen), iki şişe boyutu (250 ml ve 150 ml) ve iki ajitasyon hızı (180 rpm ve 280 rpm) olmak üzere sekiz işlem kombinasyonu ile yapılmıştır. Her bir nematod, inokulum yaşındaki her

kültür için (sıvı, katı ve bifazik) üç çoğaltma şişesi kurulduğu böylece toplam 36 tekrarlama şişesi (3 kültür işlemi × 4 inokulum yaşı × 3 kopya) ile yapıldığı dile getirilmiştir. Sıvı kültürde 7, 14, 21 ve 28 günlük inokulum yaşlarında sırasıyla 32.722, 77.361, 89.556 ve 98.444 nematod/ml konsantrastonda üreme olduğu belirtilmiştir. Genel olarak inokulum yaşının artması ile nematod verimi arasında olumlu bir eğilim gözlenmiştir.

Nitekim 28 günlük inokulum ile inokule edilen sıvı kültürler 98 444 nematod/ml ile en yüksek nematod verimi göstermiştir ve inokulumdan sonraki ilk haftada % 65 IJ oluşturmuştur. Hem katı hem de bi-fazik kültürler farklı inokulum yaşları ile inokule edildiğinde nematodların veriminin benzer olduğu dile getirilmiştir. Katı ve bi-fazik kültürlerin sıvı kültür ile karşılaştırıldığında sonuçların farklı olmasının nedeninin belli olmadığı ancak nematodların dağılımına ve katı ortam yüzeyinde yiyecek için rekabetin sıvı ortama göre daha fazla olmasına bağlanmıştır. Ortamda agar bulunması, şişe boyutu, ve havalandırma hızı deneylerinde ortamda agarın bulunmasının yanı sıra büyük şişe kullanılması bakteri popülasyonunu arttırdığı dile getirilmiştir. Bu iki koşul (ortamda agar bulunması ve daha büyük bir şişe kullanımı) ile birlikte yüksek ajitasyon hızının kullanılması nematod gelişimini ve verimini arttırdığı bildirilmiştir. Nematod artışının bakteri kültürüne bağlı olmayıp artan havalandırma ile (yüksek ajitasyona bağlı olarak) artış gösterdiği söylenmiştir.

Sonuç olarak inokulum yaşının 28 güne kadar yükselmesiyle sıvı kültürde nematod veriminin arttığı ancak katı ve bi-fazik kültürde artış olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca ortama % 0,2 g agar eklenmesi ve havalandırma oranının artırılması, daha büyük şişeler ve daha yüksek ajitasyon hızları kullanılarak nematod iyileştirilmesinin arttırılabileceği dile getirilmiştir.

Kary ve ark. (2017), *Steinernema carpocapsae* SH1 ve *Steinernema feltiae* SH12 ırkını İran' ın kuzeybatısında sardunya bitkisinde yetiştirmiş ve yarı kurak bir bölgenin toprağından izole ederek kalsiyum aljinat ve formaldehit varlığında dehidrasyon ve rehidrasyon açısından osmotik tepkileri araştırılmıştır. İnfektif juveniller farklı seviyelerde osmotik konsantrasyonlara maruz bırakılmış sıcaklık ve dehidrasyon



süreleri ile IJ' nin canlılığı incelenmiştir. Farklı sıcaklıklarda optimum gliserol konsantrasyonunu belirlemek için on test konsantrasyonu (4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 w/v) her birinde sterilize edilmiş gliserol (Arian chemical), damıtılmış su içinde % 0,02 formaldehit ile 5000 IJ/ml süspansiyonuna ilave edilmiştir. Denemeler 24 yuvalı plastik plakalarda yapılmıştır. Denemelere iki kontrol işlemi dâhil edilmiştir: IJ' lerin sadece distile suda olması ve IJ' lerin % 0,02 formaldehit içinde olması. Her bir işlem bir falcon tüpünde ana karışım şeklinde ayrı olarak hazırlanmış yaklaşık 5 saniye hafifçe vortekslenmiştir.

Elde edilen süspansiyonun 1 ml' si çoğaltma olarak plakanın her oyuğuna ilave edilerek üç sıcaklıkta inkübe edilmiştir: 8, 15 ve 25 °C. Kalsiyum aljinat granüllerinin depolanmasında bir IJ bulamacı % 2 aljinat çözeltisi içeren 5 ml damıtılmış su içerisinde süspansiyon edilmiş 5000 IJ/ml elde etmek için iyice karıştırılmıştır. İşlemlere bağlı olarak bazı muameleler için ana karışım % 0,02 formaldehit veya % 22 gliserol içeriyordu. Her kuyucukta süspansiyon damlacıkları (toplam hacim: 300 µl) kalsiyum aljinat granülleri oluşturmak üzere damıtılmış su içerisinde % 5 CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O içeren 700 µl' lik bir çözelti ile karıştırılmış. Granüllerin yaklaşık çapı 0,4 cm ve oyuk başına üretilen granül sayısı 60 civarında olduğu belirtilmiştir. IJ' lerin osmotik tepkileri önemli farklılıklar göstermiş olup sırasıyla osmotik olarak dehidrate *S. feltiae* ve *S. carpocapsae* en yüksek verim % 14 ve % 12 gliserol solüsyonu olarak belirtilmiştir. IJ' nin geri kazanımına en elverişli dehidrasyon koşulları en yüksek osmotik konsantrasyonda % 22 gliserolde gözlenmiştir. 8 °C' de dehidre edilen *S. feltiae* geri kazanımı daha yüksek sıcaklıklarda dehidre edilenlere göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. *S. carpocapsae* için de benzer bir eğilim gözlenmiş olup 8 ve 15 °C' de dehidrate edilen nematodların canlılığı 25 °C' de elde edilenlerden daha yüksek olduğu görülmüştür. *S. feltiae*' nin hayatta kalması *S. carpocapsae* göre daha düşük olduğu görülmüştür. Damıtılmış suda depolanan IJ'nin canlılık oranı benzer olduğu; ikinci ayın sonunda *S. feltiae* IJ' lerinin tümünün 25 °C 'de ölü olduğu halde *S. carpocapsae* IJ' nin 25 °C' deki damıtılmış su içindeki % 100 ölüm oranı üçüncü ayın sonunda görülmüştür. Damıtılmış su içerisine formaldehit eklenmesi IJ' nin canlılığını olumsuz olarak etkileyerek ikinci ayın sonunda % 100 ölüm görülmüştür. IJ' nin kalsiyum aljinat ile

kapsüllenmesi formaldehitin zararlı etkisini azaltarak IJ canlılığını önemli ölçüde arttırdığı belirtilmiştir.

Seenivasan (2017), Hindistan'ın Tamil Nadu bölgesindeki farklı pamuk tarlalarından toprak örnekleri alarak daha önce Coimbatore' de bulunan TNAU Nematoloji Departmanında izole edilen iki EPN ırkı KKMH1 (*H. bacteriophora*) ve APKS2 (*S. carpocapsae*)'nin in vitro kitle üretimi için on üç farklı bitki ve hayvan proteinli ortam: nutrient agar ortamı (1), nutrient agar ortamı (2), Wouts ortamı, modifiye edilmiş Wouts ortamı, buğday unu ortamı, modifiye edilmiş buğday unu ortamı, yumurta sarısı ortamı (1), yumurta sarısı ortamı (2), modifiye edilmiş yumurta sarısı ortamı, köpek bisküvisi ortamı, modifiye edilmiş köpek bisküvisi ortamı, bengal gram ortamı (1), bengal gram ortamı (2) test edilmiştir. Ortamların 100 ml damıtılmış su için bileşimleri: nutrient agar ortamı (1) 0,3 g sığır ekstraktı, 0,5 g pepton, 0,2 g agar, 0,8 g NaCl, 10,0 g tavuk yağı; nutrient agar ortamı 2 0,3 g sığır ekstraktı, 0,5 g pepton, 0,2 g agar, 0,8 g NaCl, 5,0 g soya fasulyesi yağı; Wouts ortamı 0,88 g nutrient broth, 0,32 g yeast extract, 14,40 g soya unu, 10,40 g yer fıstığı yağı; modifiye edilmiş Wouts ortamı 0,88 g nutrient broth, 0,32 g yeast extract, 14,40 g soya unu, 5 g sığır ekstraktı; buğday unu ortamı 15 g buğday unu, 5 g kabuligram unu, 5 g sığır ekstaktı, 6 g yeast extract, 1 g agar, 6 g hindistan cevizi yağı; modifiye edilmiş buğday unu ortamı 15 g buğday unu, 5,0 g soya unu, 1 g yeast extract, 10 g yer fıstığı yağı; yumurta sarısı ortamı (1) 7 g püskürtülerek kurutulmuş yumurta sarısı tozu (SDEY), 2 g yeast extract, 0,80 g NaCl, 15,0 g yağ; yumurta sarısı ortamı (2) 10 g püskürtülerek kurutulmuş yumurta sarısı tozu (SDEY), 5 g yeast extract, 0,80 g NaCl, 12 g yağ; modifiye edilmiş yumurta sarısı ortamı 7 g yumurta sarısı, 20 g soya unu, 2 g yeast extract, 0,80 g NaCl, 15 g yağ; köpek bisküvisi ortamı 15 g köpek bisküvisi, 1 g yeast extract, 3 g pepton, 2 g agar, 10 g yağ; modifiye edilmiş köpek bisküvisi ortamı 20 g köpek bisküvisi, 0,5 g pepton, 1,0 g yeast extract, 5 g sığır ekstraktı, 7 g yağ; bengal gram ortamı (1) 1,5 g nutrient broth, 0,7 g yeast extract, 20 g bengal gram unu, 20 g yer fıstığı yağı; bengal gram ortamı (2) 1,75 g nutrient broth, 0,5 g yeast extract, 20 g bengal gram unu, 32,5 susam yağından oluşturulmuştur. Her bir ortam steril 6 adet 1,5 cm<sup>3</sup> poliüretan sünger içeren 250 ml hacimdeki şişelere dökülmüş ve her ortam 5 kez çoğaltılmıştır (bir şişe = bir kopya). Ardından şişeler otoklavda 10 psi' de 10 dakika steril edilerek ilgili simbiyont bakteri

ile inokule edilmiştir. 48 saat boyunca 25 °C’ de inkübe edilmiştir. Sonuçlar modifiye edilmiş Wouts ortamı ve nutrient agar ortamı (1)’ in 250 ml’ lik bir şişe başına 39,02-39,14 x 10<sup>5</sup> IJ’ lik *H. bacteriophora* ırkı KKMH1’ in sayısını çoğalttığı görülmüştür. Bu ortamlarda üretilen IJ’ lerin *Helicoverpa armigera*, *Earias vitella* ve *Spodoptera litura* gibi pamuk zararlılarına karşı daha öldürücü olduğu tespit edilmiştir. *S. carpocapsae* ırkı APKS2 modifiye edilmiş köpek bisküvisi ortamı ve nutrient agar ortamı (1) en yüksek IJ popülasyonuna 49,69-52,31 x 10<sup>5</sup>/250 ml’ lik şişe için belirgin şekilde daha yüksek bir canlılığa sahip olduğu belirtilmiştir. Bu ortamda üretilen IJ’ ler *Helicoverpa armigera*, *Earias vitella* ve *Spodoptera litura*’ nın % 100 ölümüne neden olmuştur.

Bu çalışmanın sonuçları *H. bacteriophora* ırkı KKMH1’in modifiye Wouts ortamı veya nutrient agar ortamı (1) üzerinde *S. carpocapsae* ırkı APKS2’ nin de modifiye edilmiş köpek bisküvisi ortamı veya nutrient agar ortamı 1 üzerinde kitlesel üretiminin yapılabileceğini tavsiye etmiştir ve bu ırkların pamuktaki böcek zararlıları *H. armigera*, *E. Vitella* ve *S. litura*’ ya karşı potensiyel biyo pestisit olarak teşvik edileceği konusunda umut verici bir çalışmadır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Laboratuvarda *Galleria mellonella* Larvalarının Üretimi

In vivo üretim, duyarlı konukçuların sürekli sağlanmasına dayanır. En sık kullanılan konukçu böcek, EPN duyarlı olan ve yüksek verim sağlayan büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella*, Linnaeus) son dönem larvalarıdır (Woodring ve Kaya 1988).

*Galleria mellonella* yumurtaları 30-32 °C' ye ayarlı inkübatörde üzeri sık gözenekli tel ile gerilmiş (gözenek çapı 2 mm) cam kavonoz içerisinde yetiştirilmiştir. Yumurtadan çıkan larvaların beslenmesi için bal, gliserin, kepek, mısır unu, soya unu, süt tozu ve maya karışımından oluşan bir besin ortamı kullanılmıştır (Kaya ve Stock 1997) (Şekil 3.1). Besin ortamı (Çizelge 3.1.) hazırlanırken ilk olarak bal ve gliserin besin yapılacak kap içerisine alınmıştır. Bal ve gliserin kaynama noktasına geldiğinde maya eklenmiş ardından geriye kalan besin maddeleri de ilave edilerek ~150 °C sıcaklıkta besin ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan besin ortamı soğuduktan sonra cam kavonozun üçte ikisine kadar besin konularak yumurtalar besin içerisine alınmıştır (Şekil 3.2). Besin içerisine alınan yumurtalar son dönem larva (~ 4 hafta) oluncaya kadar gözlemlenmiş ve son larva dönemine ulaşıldığında larvalar besin ortamından ayıklanarak EPN' lerin etkinlik ve üreme denemelerinde kullanılmıştır (Şekil 3.3). Larva üretiminin sürekliliğini sağlamak için belirli miktarda larva ayrılarak *Galleria mellonella*' nın yaşam döngüsünü tamamlayarak yumurta, larva, pupa, ergin ve tekrar yumurta bırakması sağlanmıştır.

**Çizelge 3.1.** *G. mellonella* besin ortamı içeriği

200 g bal
200 g gliserin
200 g kepek
150 g mısır unu
100 g soya unu
100 g süt tozu
50 g maya



Şekil 3.1. Hazırlanmış olan besin ortamının görüntüsü



Şekil 3.2. Besin ortamının bulunduğu cam kavanozlarda *Galleria mellonella* yumurta ve son dönem larvalarının görüntüsü



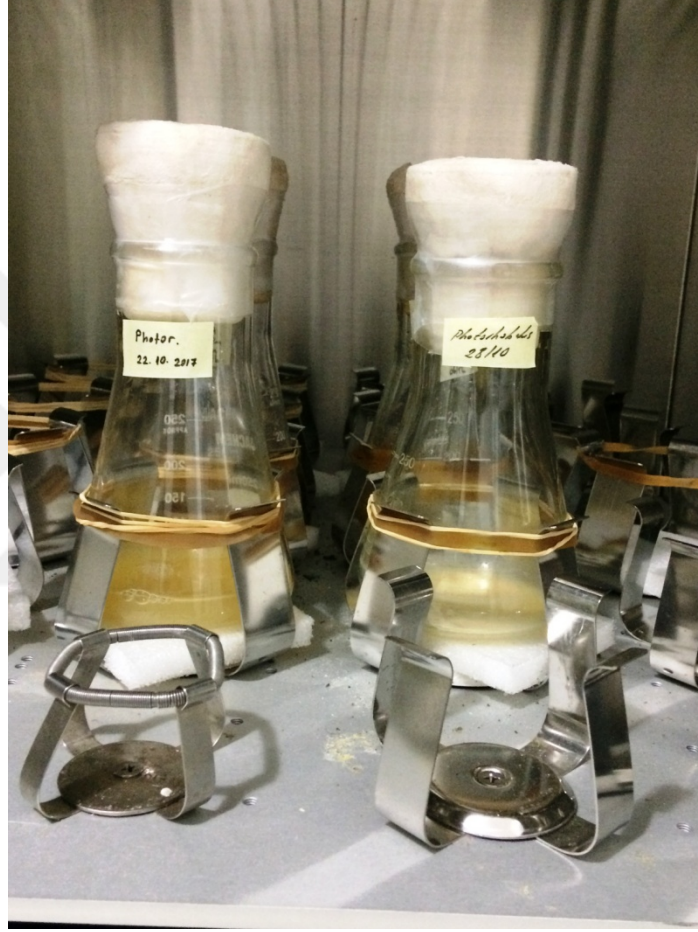
Şekil 3.3. Besin ortamı içerisindeki *Galleria mellonella* larvalarının görüntüsü

### 3.2. Entomopatojen Nematod *H. bacteriophora* ve Mutualist Bakterisi *Photorhabdus* spp. Kültürlerinin Hazırlanması

*Photorhabdus* spp. bakteri kültürünün hazırlanmasında *H. bacteriophora*'nın hibrit Hb. H ırkı kullanılmıştır. Bakteri izolasyonu için nematodla 48 saatlik enfekteli *G.mellonella* larvalarının yüzeyi % 70'lik alkol ile 4 dakika steril edildikten sonra steril enjektör iğnesi yardımıyla larvaların bacak köklerine batırılarak hemolenf sıvısının dışarı çıkması sağlanmıştır. Dışarıya çıkan hemolenf sıvısı steril edilmiş bir öze yardımıyla alınarak daha önceden hazırlanmış olan (NBTA) Standart Nutrient Agar 37 g/l, Bromthymolblue 25 mg/l, Triphenly - Tetracolum Chloride Solution 4 ml ortamına aktarılmıştır (Akhurst 1982).



Bakteri kolonisinin 28 °C' de 48 saatlik inkübasyon sonucunda üremesiyle koloni morfolojisi, mikroskopik incelemeler ve katalaz testlerinin ardından sıvı besiyeri YS (Yeast Salt Medium) ortamı olan Yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g/l, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0,2 g/l aktarılmıştır. Bütün denemelerde kullanılan bakteriler YS ortamında çalkalamalı inkübatörde ve 28 °C' de üretilmiştir (Şekil 3.4).



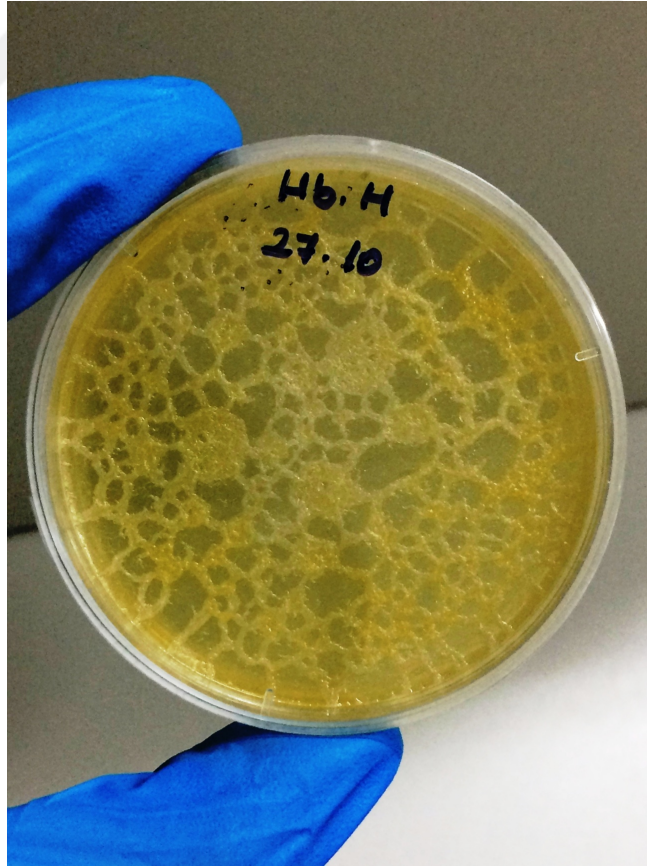
**Şekil 3.4.** Sıvı besiyeri YS (Yeast Salt) ortamında yetiştirilen *Photorhabdus* spp. bakterisinin çalkalayıcı inkübatör içerisindeki görüntüsü

Denemelerde kullanılan *H. bacteriophora* kültürü laboratuvar şartlarında içerisinde Bacto Nutrient Broth (16 g/l), Bacto Agar (12 g/l) ve mısırözü veya ayçiçek yağı (5 g/l) bulunan in vitro katı üretim ortamı Wouts agarda üretilmiştir (Şekil 3.5). Wouts agar belirtilen malzemelerle hazırlandıktan sonra 121 °C sıcaklıkta yaklaşık iki saat boyunca

otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan agar steril kabin içerisinde petrilere dökülmüştür. Petrilere döküldükten sonra agarın kuruması beklenmiştir.

Daha sonra kuruyan agara sıvı besiyeri ortamı olan YS' de önceden 28 °C çalkalamalı inkübatörde üretilmiş olan *Photorhabdus* spp. bakterisinden cam pipet yardımıyla alınıp beşer damla damlatılarak kuruması beklenmiş ve parafilmlelenerek bakterilerin katı agar ortamında üremeleri için inkübatöre konulmuştur. Petrilere damlatılmış olan bakteri kolonisinin iki gün içerisinde geliştiği gözlemlenmiştir.

Petrilerde gelişmiş olan bakteri kolonisine iki gün sonra inkübatörde sıvı besiyeri içerisinde üremiş olan *H. bacteriophora* damlatılmış ve katı agar ortamında entomopatojen nematodların gelişmeleri sağlanmıştır. *H. bacteriophora* IJ' leri petri kapaklarına çıkışları gözlemlendiğinde petri kapaklarındaki IJ' ler YS içerisinde üremiş olan bakteri ile yıkanarak tekrar üretilmek üzere başka bir agara damlatılmış ve üretimin sürekliliği bu şekilde sağlanmıştır.



**Şekil 3.5.** Wouts agarda üretilmiş olan Hb. H. ırkının görüntüsü



### 3.3. *H. bacteriophora*' nın In Vitro Katı Kültür Üretimi İçin Kullanılan Ortamların İçeriği

Entomopatojen nematod *H. bacteriophora*' nın in vitro katı üretimini arttırmaya yönelik olarak denemelerde glikoz, kanola yağı ve sodyum klorürün hazırlanan katı ortamlara etkisini karşılaştırmak amacıyla içeriği farklı dört ortam hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan katı ortamlar ve içerikleri aşağıdaki şekilde belirtilmiştir (Çizelge 3.2). Tüm denemelerde *H. bacteriophora*' nın hibrit Hb. H. ırkı kullanılmıştır.

**Çizelge 3.2.** In vitro katı üretim için dört farklı ortam hazırlanmış olup kullanılan maddeler ortamda Mevcut ise (+) işareti ile mevcut değilse (-) işareti ile yukarıdaki şekilde gösterilmiştir.

Katı Ortam İçerikleri	Hazırlanan Katı Ortamlar			
	Wouts	G. Wouts 1	G. Wouts 2	G. Wouts 3
Bacto Nutrient Broth (16 g/l)	+	-	-	-
Bacto Agar (12 g/l)	+	+	+	+
Ayçiçek Yağı (5 g/l)	+	-	-	-
Yeast Extract (15 g/l)	-	+	+	+
Glikoz (2 g/l)	-	+	+	+
NaCl (4 g/l)	-	+	+	-
KCl (0,35 g/l)	-	+	+	-
CaCl <sub>2</sub> (0,3 g/l)	-	+	+	-
Kanola Yağı (5 g/l)	-	+	-	+

### 3.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerileri

#### Wouts Agar

Bacto nutrient broth	16 g/l
Bacto agar	12 g/l
Corn oil or Sun flower	5 g/l

**Hazırlanışı:** Kimyasallar 50 ml distile suda çözülmüş ve 121 °C 1,5 sa otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra steril kabin içerisinde petrilere dökülmüştür.

#### G. Wouts 1

Bacto agar	12 g/l
Yeast extract	15 g/l
Glikoz	2 g/l
NaCl	4 g/l
KCl	0,35 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,3 g/l
Kanola yağı	5 g/l

**Hazırlanışı:** Kimyasallar 50 ml distile suda çözülmüş ve 121 °C 1,5 sa otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra steril kabin içerisinde petrilere dökülmüştür.

#### G. Wouts 2

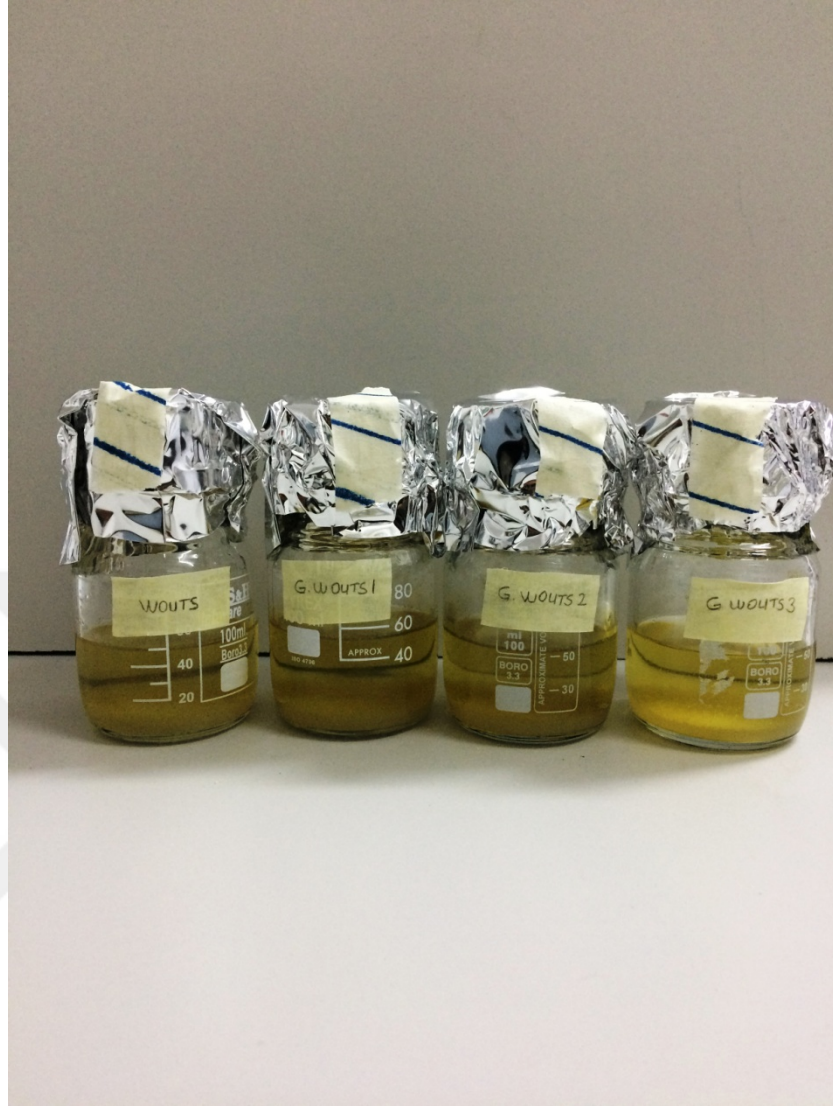
Bacto agar	12 g/l
Yeast extract	15 g/l
Glikoz	2 g/l
NaCl	4 g/l
KCl	0,35 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,3 g/l
Ayçiçek yağı	5 g/l

**Hazırlanışı:** Kimyasallar 50 ml distile suda çözülmüş ve 121 °C 1,5 sa otaklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra steril kabin içerisinde petrilere dökülmüştür.

### **G. Wouts 3**

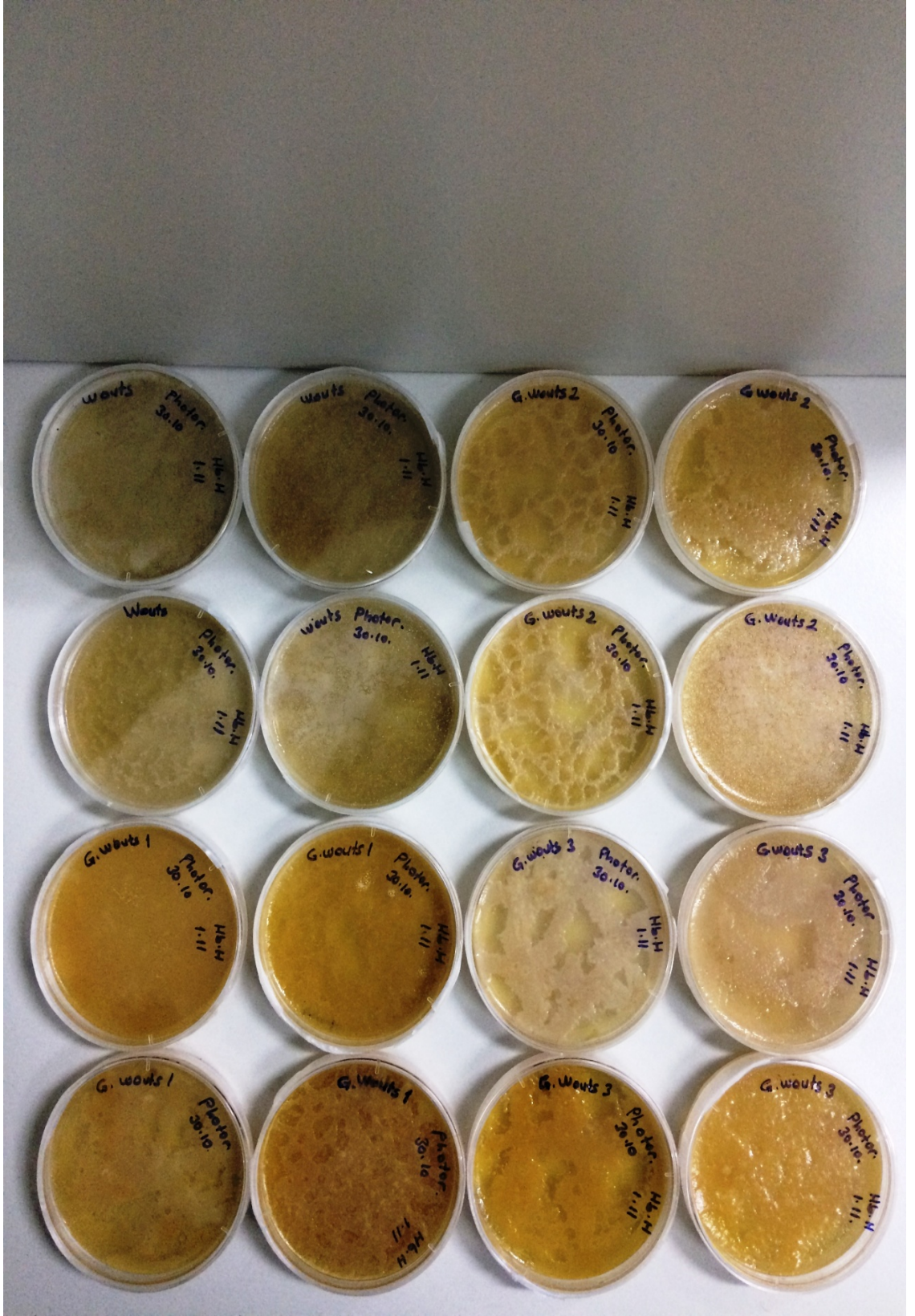
Bacto agar	12 g/l
Yeast extract	15 g/l
Glikoz	2 g/l
Kanola yağı	5 g/l

**Hazırlanışı:** Kimyasallar 50 ml distile suda çözülmüş ve 121 °C 1,5 sa otaklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra steril kabin içerisinde petrilere dökülmüştür.



**Şekil 3.6.** Dört farklı katı ortamın otoklavlanmadan önce 50 ml distile su içerisindeki görüntüsü

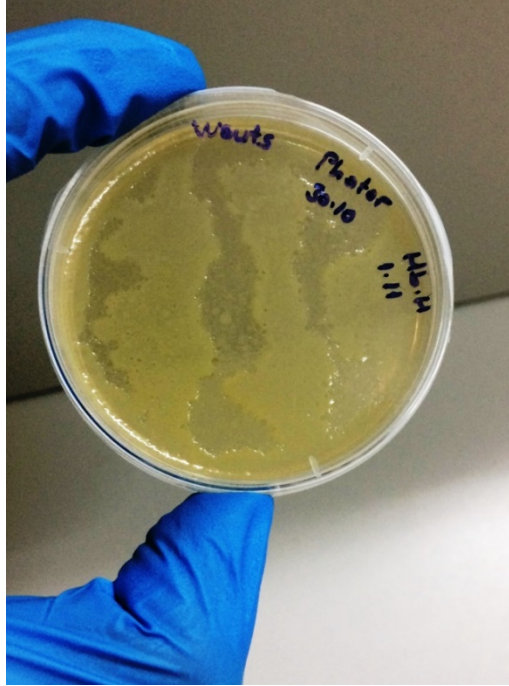
EPN'lerin in vitro üretimi, nematodların besleyici bir ortamda simbiyotlarının saf bir kültürüne dahil edilmesine dayanır (Akhurst 1980, Wouts 1981). Hem katı hem de sıvı in vitro üretimde büyüme ortamı nematod eklenmeden önce simbiyotik bakterilerle inokule edilir böylece ortamın kolonizasyonuna olanak sağlanır (Shapiro - İlan ve ark. 2012). Denemelerde her bir katı ortam için gerekli kimyasallar 50 ml distile suda hazırlanarak otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan ortamlar steril kabin içerisinde petrilere dökülmüştür. Her bir katı ortam için 4 adet petri hazırlanmıştır. Toplamda dört farklı katı ortam olduğu için 16 adet katı ortam içeren petri hazırlanmıştır (Şekil 3.7).



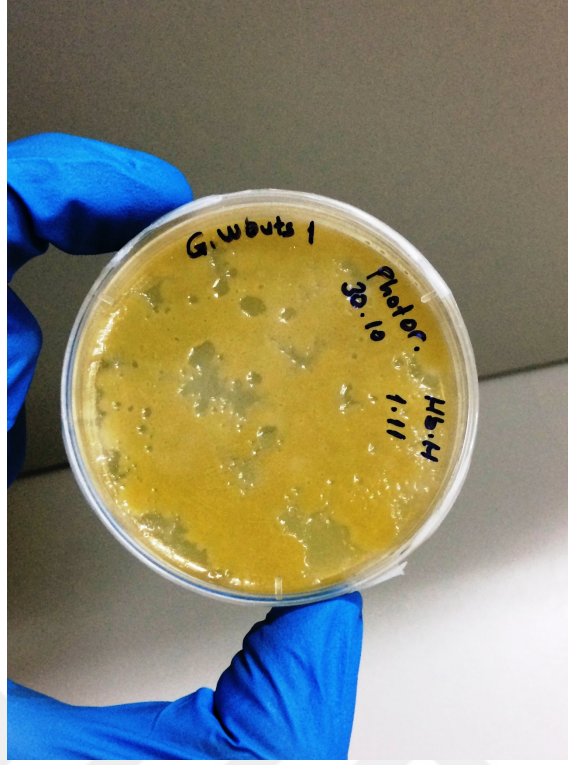
Şekil. 3.7. Her bir katı ortama ait 4 adet ve toplamda 16 adet petrinin görüntüsü



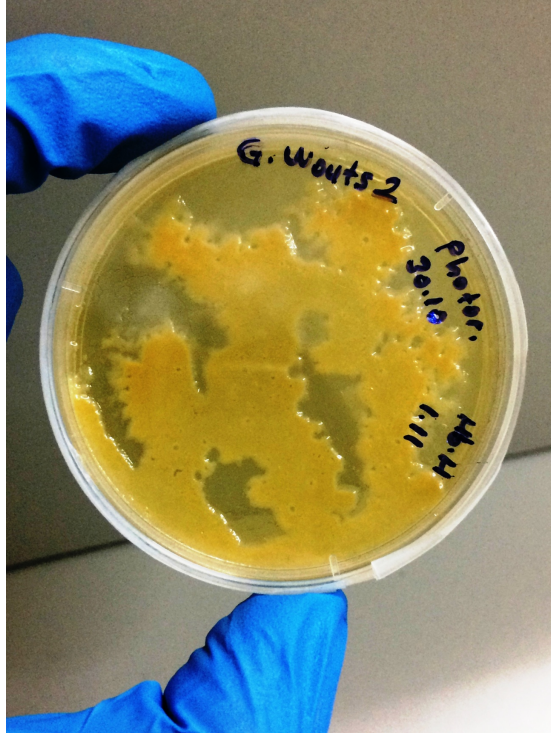
Denemelerde kullanılan dört farklı katı ortama ilk önce YS' da (Yeast Salt) üretilmiş olan *Photorhabdus* spp. bakterisinden beş damla damlatılmıştır. İki gün sonra gelişen bakteri kolonisine daha önce Wouts agarda üretilmiş olan entomopatojen nematod Hb. H. ırkından damlatılmıştır. Entomopatojen nematodun damlatılmasında kullanılan yöntem Wouts agardan kapağa çıkış yapan IJ'ler steril kabin içerisinde YS ile yıkanarak her bir petriye iki damla damlatılmıştır. İki damladaki nematod sayısı stereo mikroskopta sayılmış ve bir damladaki yaklaşık nematod sayısı not edilmiştir. Her bir petrinin üzerine bakteri ve nematod damlatılma tarihleri not edilmiştir. Böylece nematodlar simbiyont bakterileri ile aynı ortama aktarılmıştır (Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11). Petriler iki günde bir kontrol edilerek hermafroditlerin ve daha sonra kapağa çıkış yapan IJ'lerin sayımları yapılmıştır. Son olarak steril kabin içerisinde kapağa çıkış yapan IJ'ler yıkandıktan sonra tekrar kapağa çıkışların gözlendiği her bir ortama ait üç petrinin parafilmli olarak agar ve petri kapakları distile su ile yıkanmıştır. Yıkama sonucunda nematodlu suyun üzeri 15 ml'ye kadar distile su ile tamamlanmış ve sayım yapmak için her birinden dört defa 10 µl alınarak tekrar IJ sayımı yapılmıştır.



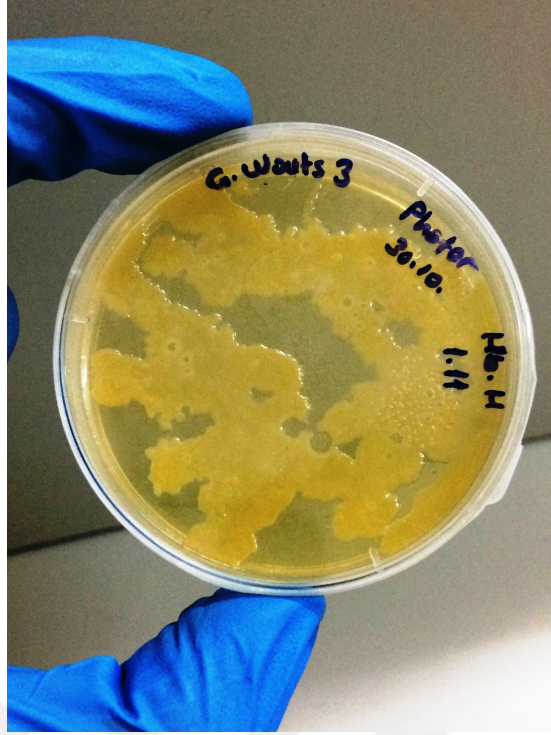
**Şekil 3.8.** Wouts ortamında gelişmiş olan simbiyont bakteri ve iki gün sonra bu ortama damlatılmış olan Hb.H. ırkının görüntüsü



Şekil 3.9. G. Wouts 1 ortamında gelişmiş olan simbiyont bakteri ve iki gün sonra bu ortama damlatılmış olan Hb.H. ırkının görüntüsü



Şekil 3.10. G. Wouts 2 ortamında gelişmiş olan simbiyont bakteri ve iki gün sonra bu ortama damlatılmış olan Hb.H. ırkının görüntüsü



**Şekil 3.11.** G. Wouts 3 ortamında gelişmiş olan simbiyont bakteri ve iki gün sonra bu ortama damlatılmış olan Hb.H. ırkının görüntüsü

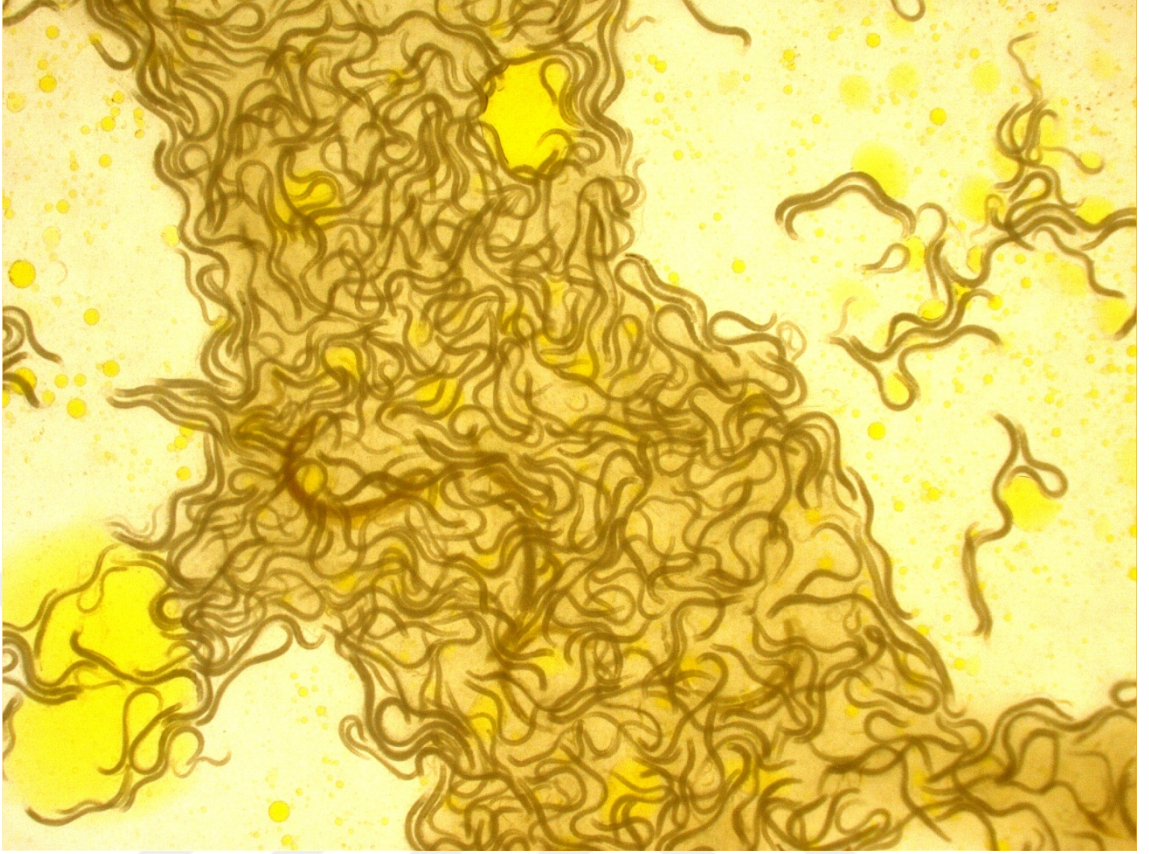
### **3.5. Çalışmada Kullanılan Besiyerlerinde Hermafrodit ve IJ Sayımı**

Denemelerde katı ortamları hazırlarken kullanılan glikoz, kanola yağı ve sodyum klorürün nematod üremesine etkisini belirlemek için hermafrodit ve IJ sayımları yapılmıştır.

#### **3.5.1. Hermafrodit Sayımı**

Denemelerde kullanılan 4 farklı katı ortama ait toplam 16 adet petriye ilk önce bakteri daha sonra nematod damlatılarak iki günde bir petriler stereo mikroskopta kontrol edilmiştir. Her bir ortam için hermafrodit sayımı stereo mikroskopta üç tekerrürlü olarak sayılmış ve not edilmiştir (Şekil 3.12).

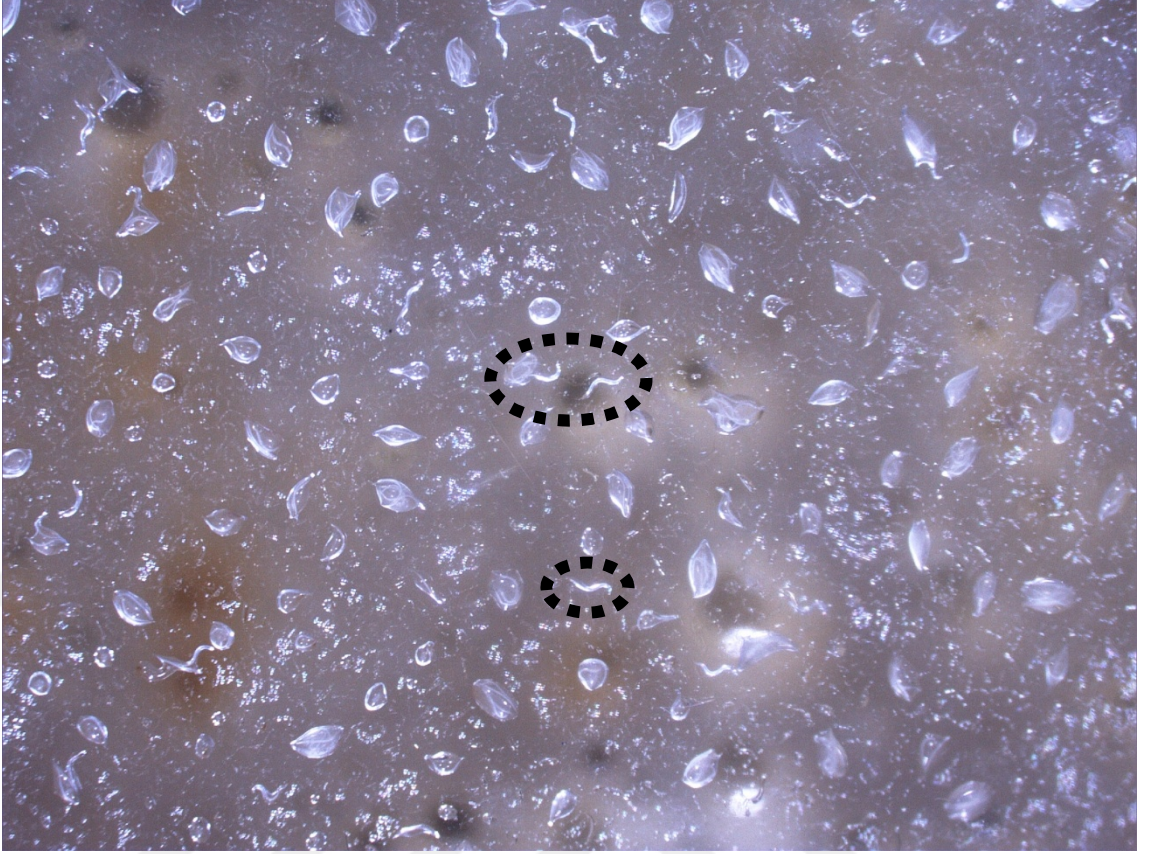




**Şekil 3.12** Petrilere üremiş olan hermafroditlerin görüntüsü

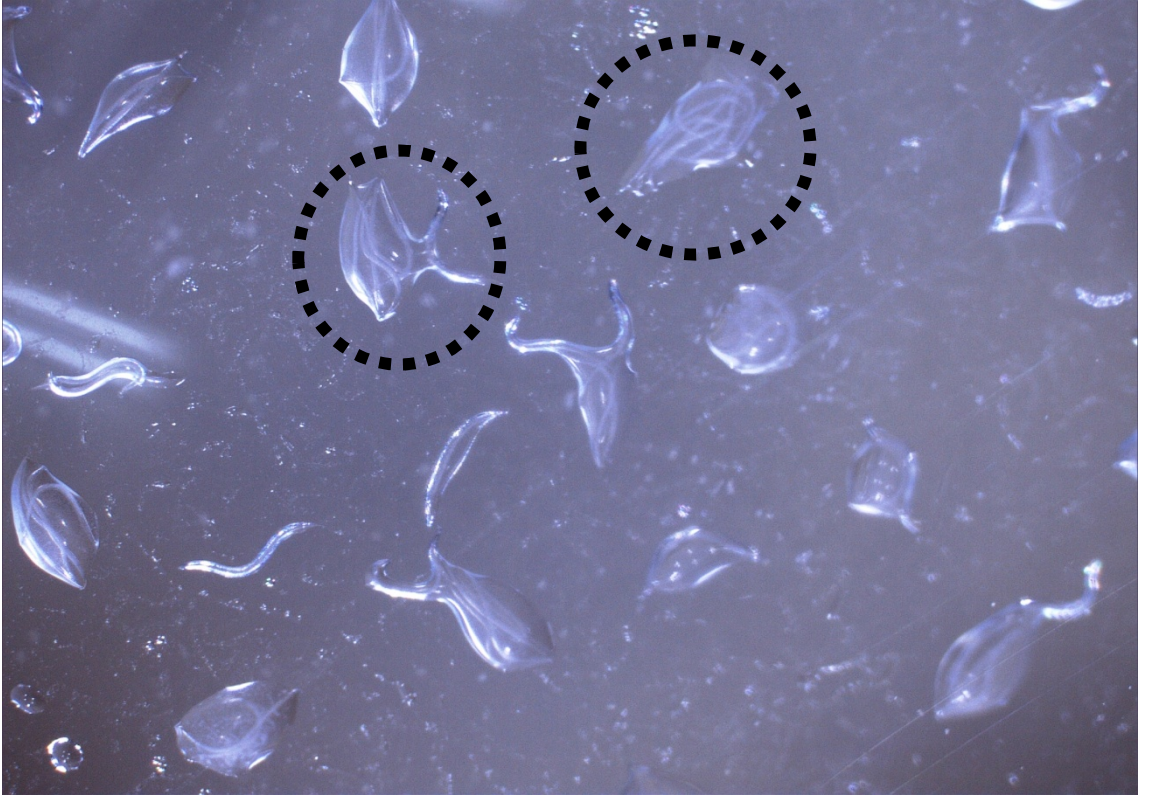
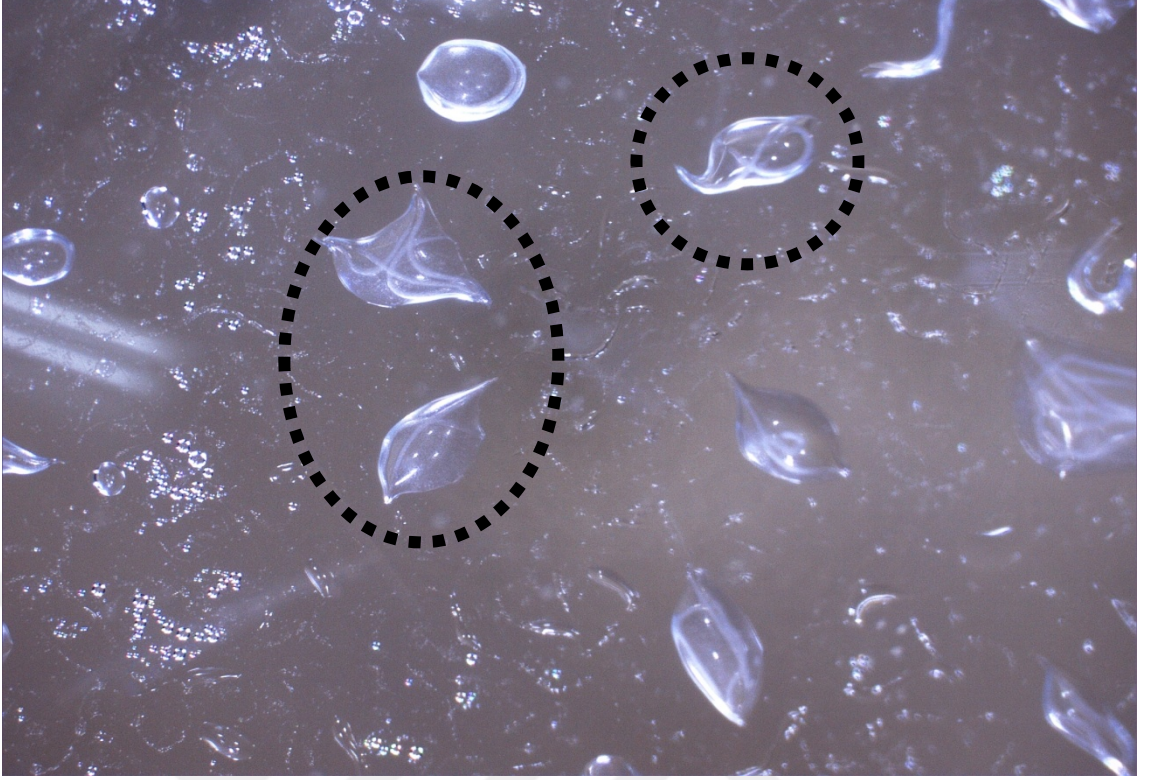
### 3.5.2. IJ Sayımı

Hermafrodit sayımları tamamlandıktan sonra petrileredeki IJ'lerin petri kapaklarına çıkış yaptıkları gözlemlenmiştir (Şekil 3.13, Şekil 3.14). Petri kapağına çıkış yaptığı tespit edilen her bir ortama ait IJ'ler steril kabin içerisinde YS ile yıkanarak ependörf tüplerin 1,5 ml' sine kadar doldurulmuştur. Daha sonra hangi ortamın kaçınıcı petrisinde IJ çıkışı olduğu ve yıkama yapıldığı ependörf üzerine not edilmiştir. Ependörf içerisinde her bir örnek için 10µl/1,5ml alınmış ve stereo mikroskop altında sayım yapılmıştır. Bu işlem üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş olup sayım sonuçları not edilmiştir. Steril kabin içerisinde kapağına çıkış yapan IJ'ler yıkandıktan sonra tekrar kapağına çıkışlarının gözlemlendiği her bir ortama ait üç petrinin parafilmeleri açılarak agar ve petri kapakları distile su ile yıkanmıştır. Yıkama sonucunda nematodlu suyun üzeri 15 ml' ye kadar distile su ile tamamlanmış ve sayım yapmak için her birinden dört defa 10 µl alınarak tekrar IJ sayımı yapılmıştır (Şekil 3.15, Şekil 3.16 ve Şekil 3.17).



**Şekil 3.13.** Petri kapağına çıkış yapan IJ'lerin görüntüsü





Şekil 3.14. Petri kapağındaki su damlacıkları içerisindeki IJ' lerin görüntüsü

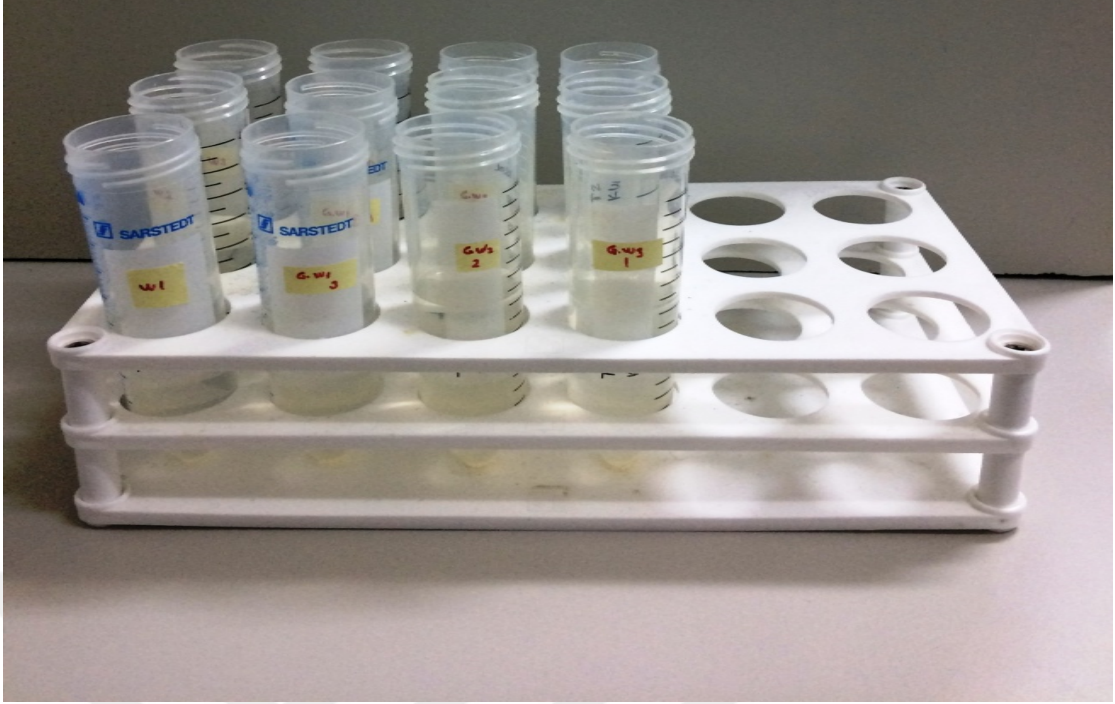




**Şekil 3.15.** Sayım yapmak için steril kabin içerisinde kapağa çıkış yapan IJ' ler yıkanarak 1,5 ml' lik eppendörf tüplere alınmıştır. Her bir örnek için eppendörf tüplerden dört kez 10 µl alınarak sayım yapılmıştır. Sayım kabının bir bölümünde bulunan IJ'lerin görüntüsü



**Şekil 3.16.** Petri kapağına çıkış yapan IJ'lerin falcon tüpe alınarak 15 ml'lik solüsyon elde edilmesi



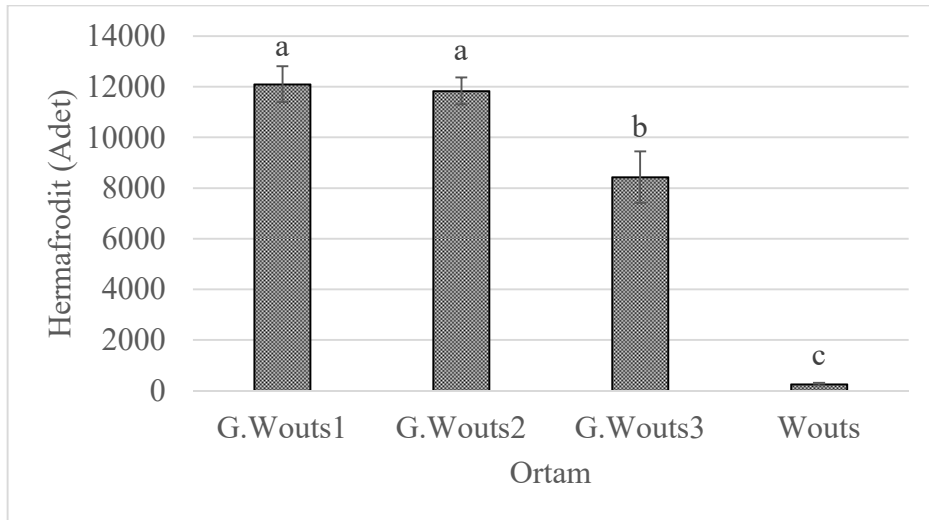
**Şekil 3.17.** Bütün deneme grupları petrilerinden elde edilen Hb. H. bireylerinin falcon tüplerde toplanması

### **3.6. İstatistiksel Analiz**

Entomopatojen nematod ırkı Hb.H.' nin in vitro katı üretimini arttırmaya yönelik olarak denemelerde kullanılan glikoz, kanola yağı ve sodyum klorürün üremeye etkisinin belirlenmesinde hermafrodit ve IJ sayımları yapılmıştır elde edilen sayımlarla katı ortamlar arasındaki farklılığı ortaya çıkarmak için ANOVA testi uygulanmıştır. ANOVA testi JMP® 7.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

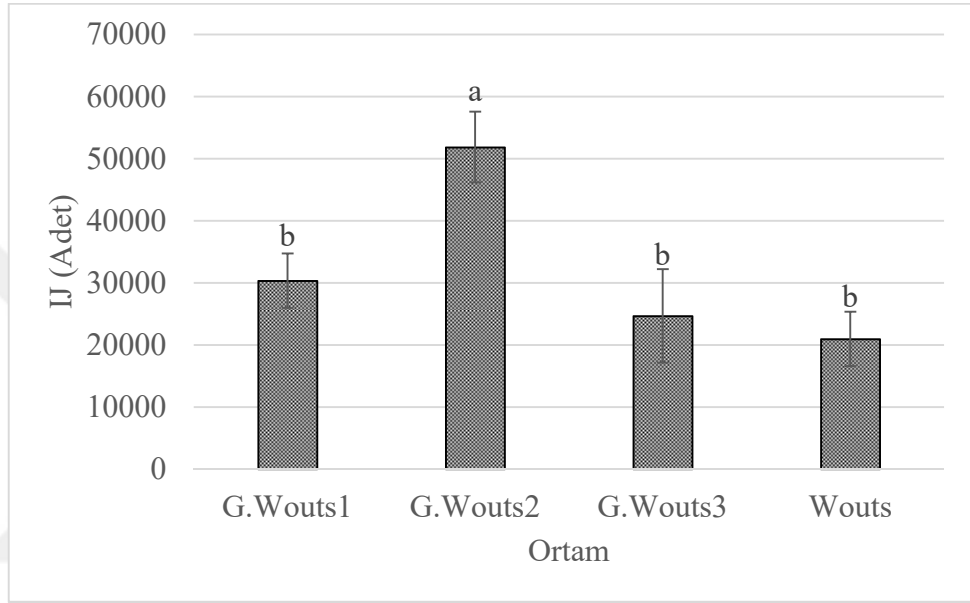
#### 4. BULGULAR

Yapılan denemelerde içeriğinde glikoz, kanola yağı ve sodyum klorür maddelerinin her üçünün bulunduğu G. Wouts 1 ortamı, içeriğinde glikoz ve sodyum klorür bulunan G. Wouts 2 ile glikoz ve kanola yağı bulunan G.Wouts 3 ortamları arasında üreme oranlarının birbirine yakın olduğu (Şekil: 4.1) içeriğinde glikoz, kanola yağı ve sodyum klorür maddelerinin her üçünün bulunmadığı ve kontrol grubu olan Wouts ortamıyla diğer ortamlar arasında istatistiksel açıdan farklar bulunmuştur (df: 3, 12; F: 66.55;  $P<0.001$ ). Yapılan denemelerde elde edilen sonuçlara göre G. Wouts 1 ortamı ile (Yeast extract 15 g/l + Bacto agar 12 g/l + Glikoz 2 g/l + NaCl 4 g/l + KCl 0.35 g/l + CaCl<sub>2</sub> 0.3 g/l + Kanola yağı 5g/l) G. Wouts 2 ortamında (Yeast extract 15 g/l + Bacto agar 12 g/l + Glikoz 2 g/l + NaCl 4 g/l + KCl 0.35 g/l + CaCl<sub>2</sub> 0.3 g/l + Ayçiçek yağı 5g/l) hermafrodit birey gelişiminin istatistiksel açıdan en iyi sonuçları verdiği ve bu iki ortam arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmediği tespit edilmiştir. G. Wouts 3 ortamının (Yeast extract 15 g/l + Bacto agar 12 g/l + Glikoz 2 g/l + Kanola yağı 5g/l) G. Wouts 1 ve G.Wouts 2 ortamlarıyla aralarında istatistiksel açıdan farklılık gözlenmiştir. Kontrol grubu olan Wouts agarın ise (Bacto Nutrient Broth 16 g/l + Bacto agar 12 g/l + Ayçiçek yağı 5 g/l) diğer ortamlarla arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmiştir (Şekil: 4.1).



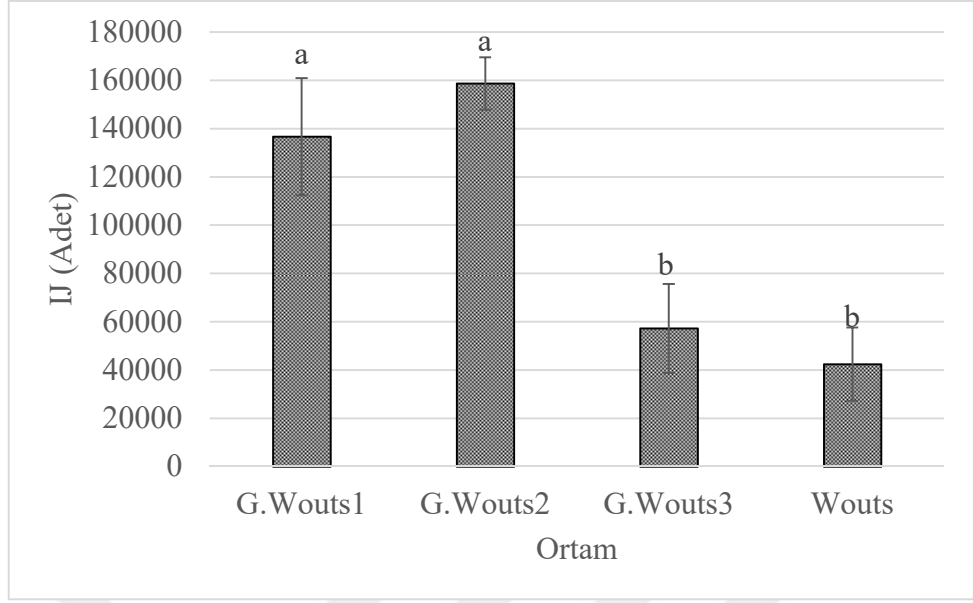
**Şekil 4.1.** Her bir ortam için iki günde bir toplamada üç kez yapılmış olan sayım sonucunda elde edilen ortalama hermafrodit sayısı (df: 3, 12; F: 66.55;  $P<0.001$ )

Her bir ortam için kapağa çıkış yapan IJ bireylerin sayımı sonucu elde edilen istatistiksel sonuçlara baktığımızda G. Wouts 1, G. Wouts 3 ve Wouts ortamının aynı istatistiksel grup içerisinde yer aldığı görülürken G. Wouts 2 ortamının diğer üç ortamdaki istatistiksel olarak farklılık gösterdiği ve verimin en yüksek olduğu ortam olarak tespit edilmiştir (df: 3, 8; F: 5.97; P= 0.009) (Şekil: 4.2).



**Şekil 4.2.** Her bir ortam için iki günde bir toplamada üç kez steril kabin içerisinde kapağa çıkış yapan IJ'lerin sayımı sonucu elde edilen ortalama IJ sayısı (df: 3, 8; F: 5.97; P= 0.009)

Son olarak petrilerdeki agar ve petri kapaklarının distile su ile yıkanması sonucu G. Wouts 1 ve G. Wouts 2 ortamının aynı istatistiksel grup içinde yer aldığı ve verimin en yüksek olduğu ortamlar olduğu tespit edilmiştir. G. Wouts 3 ve Wouts ortamının ise G. Wouts 1 ve G.Wouts 2 ortamından istatistiksel olarak farklılık gösterdiği ve bu ortamlardan farklı olarak ikisinin aynı grup içerisinde olduğu gözlenmiştir (df: 3, 8; F: 10.37; P= 0.003) (Şekil: 4.3).



**Şekil 4.3.** Her bir ortam için kapağa çıkış gözlenen üç adet petri kapağı ve agarlarının yıkanması sonucu elde edilen ortalama IJ sayısı (df: 3, 8; F: 10.37; P= 0.003)



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez kapsamında yapılan denemelerde içeriğinde glikoz, kanola yağı ve sodyum klorür bulunan ortamlar arasında üreme oranları birbirine yakın olmasına rağmen içeriğinde glikoz, kanola yağı ve sodyum klorür bulunmayan ve kontrol grubu olan Wouts ortamıyla diğer ortamlar arasında istatistiksel açıdan farklar bulunmuştur. Yapılan denemelerde elde edilen sonuçlara göre G.Wouts 1 ortamı ile G. Wouts 2 ortamında hermafrodit birey gelişiminin istatistiksel açıdan en iyi sonuçları verdiği ve bu iki ortam arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmediği tespit edilmiştir. G.Wouts 3'ün bu ortamlarla aralarında istatistiksel açıdan farklılık gözlenmiştir. Kontrol grubu olan Wouts agarın ise diğer ortamlarla arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmiştir. Her bir ortam için kapağa çıkış yapan IJ bireylerin sayımı sonucu elde edilen istatistiksel sonuçlara baktığımızda G. Wouts 1, G. Wouts 3 ve Wouts ortamının aynı istatistiksel grup içerisinde yer aldığı görülürken G. Wouts 2 ortamının diğer üç ortamdan istatistiksel olarak farklılık gösterdiği ve verimin en yüksek olduğu ortam olarak tespit edilmiştir. Son olarak petrilerdeki agar ve petri kapaklarının distile su ile yıkanması sonucu G. Wouts 1 ve G. Wouts 2 ortamının aynı istatistiksel grup içinde yer aldığı ve verimin en yüksek olduğu ortamlar olduğu tespit edilmiştir. G. Wouts 3 ve Wouts ortamının ise G. Wouts 1 ve G. Wouts 2 ortamından istatistiksel olarak farklılık gösterdiği ancak aynı grup içerisinde olduğu gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre; *H. bacteriophora* ırkı Hb. H.' nin G. Wouts 2 ortamı üzerinde kitle üretimi ticari kullanım için daha fazla IJ ürettiği için tavsiye edilebilir. Ancak, sonuçlara göre en iyi iki ortam G. Wouts 1 ortamıyla G. Wouts 2 ortam içeriği ve maliyet bakımından karşılaştırdığımızda; G.Wouts 1 ortamında G. Wouts 2 ortamından kullanılan yağdan (ayçiçek yağı) farklı olarak daha az maliyetli yağ olan kanola yağı kullanılmıştır (ayçiçek yağının 1 litresi: 6,95 TL iken kanola yağının 1 litresi: 6,60 TL). İstatistiksel olarak IJ gelişiminde de G. Wouts 1' in G. Wouts 2' den çok da farklı olmaması ve daha maliyetli olması G. Wouts 2 yerine alternatif olarak G. Wouts 1' in daha kullanılabilir olabileceğini göstermiştir.

Yoo ve ark. (2000), *H. bacteriophora* ve simbiyont bakterisi *Photorhabdus luminescens* çeşitli lipid kaynakları içeren ortamlarda kültürlenmişlerdir. Domuz, kanola, aspir, zeytin, susam ve hindistan cevizi yağları bakteri ve nematod üretiminde en uygun lipid kaynağını belirlemek için test edilmiştir. Bir doymamış veya tümü doymamış yağ asitleri (örn: kanola, zeytin ve aspir) açısından zengin olan lipid kaynakları, doymuş yağ asitleri bakımından (yani domuz yağı ve hindistan cevizi yağı) zengin lipidlerden çok daha fazla nematod ürettiği belirtilmiştir. Domuz yağı ve hindistan cevizi yağı doymamış yağ asitleri bakımından zengin lipidlerden daha düşük nematod verimine neden olmuşlardır. Susam yağının ise tüm diğer lipidlerden daha az bakteri ve nematod ürettiği ve lipid içermeyen kontrolden farklı olmadığı belirtilmiştir. Kısacası doymamış olan lipid kaynaklarının tekli doymamış yağ asitleri bakımından daha zengin olduğu ve bunların en iyi nematod gelişimini sağladığı belirtilmiştir. Tekli doymamış yağ asitlerinden (> % 60) bol miktarda bulunan kanola yağı ve kanola zeytinyağı bileşiminin en iyi nematod gelişimini sağladığı belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan iki doymamış yağ olan ayçiçeği ve kanola yağının nematod üretiminde en yüksek verimle benzer sonuçlar verdiği görülmüştür.

Gil ve ark. (2002), entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora*'nın in vitro sıvı kültürde verimini arttırmak için glikoz, fruktoz, maltoz ve sükroz içeren alternatif karbon kaynaklarını test etmişlerdir. Kanola yağı tek karbon kaynağı olarak uygulandığında  $2,38 \times 10^5$  en yüksek verimle karbonhidratlara kıyasla nematod kültürü için en iyi karbon kaynağı olduğu belirtilmiştir. Karbonhidratlar arasında glikozun en yüksek verimi sağladığı, fruktoz ve sükrozun ise en düşük nematod verimine neden olduğu belirtilmiştir. Bakteriyel hücre yoğunluğu da önemli ölçüde iyileşmiş ve ml'de 6,3 mg' dan 8,3 mg olmuştur. İlginç bir şekilde karbon kaynağı içermeyen deney % 61,1 ile iyileşme gösterdiği belirtilmiştir. Bu sonuçlar glikozun bakteriler için üstün bir karbon kaynağı olduğunu kanola yağının ise nematodlar için uygun bir karbon kaynağı olduğunu göstermiştir. Bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiş olup içeriğinde kanola yağı bulunan (G. Wouts 1 ve G. Wouts 3) katı ortamlar ile istatistiksel açıdan en iyi verim elde edilen ortam (G. Wouts 2) arasında çok farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte içeriğinde glikoz bulunan (G.Wouts 1, G. Wouts 2 ve

G. Wouts 3) ortamlardan daha fazla verim elde edilmişken içeriğinde glikoz bulunmayan kontrol grubundan (Wouts) daha az verim elde edilmiştir.

Somwong ve Petcharat (2012), bu çalışmada entomopatojen nematod *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Rhabditida: Steinernematidae) ve simbiyotik bakterisi *Xenorhabdus nematophila* üretiminde dört farklı kültür ortamı (üç suni ortam bir in vivo ortam) denemişlerdir. In vivo üretimde *Spodoptera litura*'nın son dönem larvaları kullanılmıştır. Köpek maması ve ipekböceği pupası ile tamamlanmış besiyerilerde toz haline getirilmiş balık ortamına göre lipid içeriğinin daha fazla olmasına bağlı olarak daha fazla nematod çoğalması görüldüğü belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında her bir katı ortam (Wouts, G. Wouts 1, G. Wouts 2 ve G. Wouts 3) için aynı miktarda lipid kullanılmış olup (5 g/l) lipid oranına göre değil lipid kaynağına göre değerlendirme yapılmıştır.

Indriyanti ve Muharromah (2016), yapmış oldukları araştırma, maya, köpek maması, soya fasulyesi tozu, tavuk karaciğeri ve yumurta sarısı içeren karışık ortam kullanılarak EPN üretimi hakkında bilgi vermeyi amaçlamıştır. Bu çalışmada yedi çeşit ortam bileşimi test edilmiştir. Sonuç olarak EPN'lerin tüm ortamlarda gelişebileceği ancak içerisinde yumurta sarısı bulunan ortamların diğer ortamlara kıyasla daha iyi nematod gelişimi gösterdiği dile getirilmiştir. Özellikle EPN'nin en yüksek miktarı 28164 IJ/ml ile yumurta sarısı ve soya fasulyesi tozu içeren ortamdan elde edildiği belirtilmiştir. Benzer sonuçlar bu tez çalışmasında oluşturulan katı ortamlarda da EPN'lerin gelişebileceğini göstermiştir. Ancak içeriğinde yeast extract (maya özü) bulunmayan kontrol grubu (Wouts) ortamında diğer ortamlardan (G. Wouts1, G.Wouts 2 ve G.Wouts 3) daha düşük IJ verim elde edilmiştir.

Ramakuwela ve ark. (2016), yapmış olduğu bu çalışmada *Steinernema innovation*'nin in vitro seri üretimi için farklı inokulum tipleri altı adet katı yüzey ortamı hazırlanarak değerlendirilmiştir. Ayrıca maliyet analizi yapılarak tahmini satış fiyatı hesaplanmıştır. Daha sonra bu hesaplama piyasadaki ticari EPN ürünlerinin maliyeti ile karşılaştırılmıştır. IJ'lerin en yüksek verimi (781,678±221 IJ/5 g ortam) içeriğinde *Musca domestica* larva püresi ve kanola yağı bulunan ortamdan elde edilmiştir. En

yüksek konsantrasyonda yeast extract ve en düşük konsantrasyonda soya unu bulunan ortam ise inokulum konsantrasyonundan bağımsız olarak üç deneyde de düşük bir nematod verimine neden olmuştur. Ayrıca ortama bir maya proteini kaynağı olarak Marmite® eklendiğinde üretimin düştüğü belirtilmiştir. Marmite®'nin yüksek tuz içeriği (100 g başına 11) verim üzerinde olumsuz bir etkiye neden olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak katı kültür sistemi ile üretilen *S. innovationi* için tahmini perakende fiyatı (50 milyon IJ başına R243.27 olup) E ~ Nema, BASF şirketi, Koppert, Biobest ve Natural Insect Control tarafından satılan diğer *Steinernema* tür ürünlerinden daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da benzer olarak en yüksek IJ verimi içeriğinde ayçiçeği yağı bulunan ortam G.Wouts 2 ortamından sonra içeriğinde 5 g/l kanola yağının bulunduğu ortam G. Wouts 1 ortamı olmuştur. En düşük verimin en yüksek konsantrasyonda yeast extract (maya özü) ve en düşük konsantrasyonda soya unu içeren ortam olması bu tez çalışmasıyla farklılık göstermiştir. Ortama Marmite®'nin (100 g başına 1 l) eklenmesi bu tez çalışmasındaki tuz içeriğiyle kıyaslandığında (4 g/l NaCl, 0,35 g KCl ve 0,3 g CaCl<sub>2</sub>) oldukça fazla tuz içerdiği görülmüştür.

Seenivasan (2017), Hindistan'ın Tamil Nadu bölgesindeki farklı pamuk tarlalarından toprak örnekleri alarak daha önce Coimbatore' de bulunan TNAU Nematoloji Departmanında izole edilen iki EPN ırkı KKMH1 (*H. bacteriophora*) ve APKS2 (*S. carpocapsae*)'nin in vitro kitle üretimi için on üç farklı bitki ve hayvan proteinli ortam test etmiştir. Bu çalışmanın sonuçları *H. bacteriophora* ırkı KKMH1' in modifiye Wouts ortamı veya nutrient agar ortamı 1 üzerinde *S. carpocapsae* ırkı APKS2' nin de modifiye edilmiş köpek bisküvisi ortamı veya nutrient agar ortamı 1 üzerinde kitlesel üretiminin yapılabileceğini tavsiye etmiştir ve bu ırkların pamuktaki böcek zararlıları *H. armigera*, *E. vitella* ve *S. litura*'ya karşı potansiyel biyo pestisit olarak teşvik edileceği konusunda umut verici bir çalışma olduğu belirtilmiştir. Buradaki çalışmadan farklı olarak yapılmış olan bu tez çalışmasında *H. bacteriophora* ırkı Hb. H' nin en düşük verimi Wouts ortamından elde edilmiştir oysa burada *H. bacteriophora* ırkı KKMH1 için en yüksek verimlerden biri modifiye edilmiş Wouts ortamına sığır ekstraktının eklenmesiyle elde edilmiştir.

Çiftçiler uygun ve düşük maliyetli teknoloji ile yetiştirilen EPN cinsine ihtiyaç duymaktadırlar. Yetiştirme teknolojisi bileşenlerinden biri EPN'lerin yetiştirildiği ortamıdır. Bu nedenle erişilebilir ve uygun fiyatlı bir talebi karşılamak için ortam formülü değişikliği gerekmektedir. Bu tez çalışmasında ortam formülünde bir değişikliğe gidilerek *Heterorhabditis bacteriophora* ve simbiyont bakterisi *Photorhabdus* spp. in vitro katı üretimini arttırmaya ve maliyeti azaltmaya yönelik olarak glikoz, kanola yağı ve sodyum klorür içeren dört farklı in vitro katı üretim ortamı denenmiştir. İçeriğinde her üçünün bulunduğu ortam olan G. Wouts 1 en yüksek verime sahip G.Wouts 2 (G.wouts 1' den farklı olarak ayçiçeği yağı içermektedir) ortamıyla kıyaslandığında verim açısından çok da farklı sonuçlar vermemiştir maliyet açısından baktığımızda ise G.Wouts 1 ortamı daha düşük maliyetli olması nedeniyle G.Wouts 2 ortamına göre daha çok tercih edilebilir. Bunun yanı sıra içeriğinde glikoz, kanola yağı ve sodyum klorür içermeyen kontrol grubunda ise en düşük IJ verimi elde edilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen üretim sistemi petri tabakaları kullanılarak nispeten ucuz bir üretim ortamı ve basit katı kültür büyütme koşulları kullanılarak büyük ölçekli sıvı fermentasyon ekipmanına yatırım yapmaya gerek kalmadan EPN ürünlerini üretmek için rekabetçi bir teknoloji sunmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Abu Hatab, M., Gaugler, R. 1997.** Growth mediated variations in fatty acids of *Xenorhabdus* sp. *J Appl Microbiol*, 82: 351-358.
- Abu Hatab, M., Gaugler, R. 1999.** Lipids of in vivo and in vitro cultured *Heterorhabditis bacteriophora*. *Biol Control*, 15: 113-118.
- Abu Hatab, M., Gaugler, R. 2001.** Diet composition and lipids of *in vitro*-produced *Heterorhabditis bacteriophora*. *Biological Control*, 20: 1-7.
- Abu Hatab, M., Gaugler, R., Ehlers, R. 1998.** Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids. *Journal of Parasitology*, 84: 215-221.
- Adams, B.J., Fodor, A., Koppenhöfer, H.S., Stackebrandt, E., Stock, S.P., Klein, M. G. 2006.** Reprint of Biodiversity and systematics of nematodebacterium entomopathogens, *Biol. Control* 37: 32-49.
- Adams, B.J., Nguyen, K. B. 2002.** Taxonomy and systematic: Entomopathogenic Nematology, Ed.: Gaugler, R., CABI Publishing, Wallingford, UK, pp: 1-33.
- Akhurst, R.J. 1980.** Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*, 121: 303-309.
- Barrett, J., Wright, D. 1999.** Intermediary metabolism: The physiology and biochemistry of free living and plant parasitic nematodes, Ed.: Perry, RN., Wright, DJ., CABI Publishing, New York, pp: 331-353.
- Bedding, R.A. 1981.** Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica*, 27: 109-114.
- Bedding, R.A. 1984.** Large scale production, storage, and transport of the insect-parasitic nematode *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Annals of Applied Biology*, 104:117-120.
- Bode H.B. 2009.** Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13: 224-230.
- Boemare, N. 2002.** Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*: Entomopathogenic Nematology, Ed.: Gaugler, R., CABI Publishing, Wallingford, UK, pp: 35-56.
- Buecher, E.J., Popiel, I. 1989.** Liquid culture of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont. *Journal of Nematology*, 21: 500-504.

**Chavarría-Hernández, N., de la Torre, M. 2001.** Population growth kinetics of the nematode, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnology Letters*, 23: 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., Ortega-Morales, E., Vargas-Torres, A., Chavarría-Hernández, J., Rodríguez-Hernández, A. 2010.** Submerged monoxenic culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, in a mechanically agitated bioreactor: Evolution of the hydrodynamic and mass transfer conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15: 580–589.

**Clarke, D.J., Eberl, L. 2006.** Interactions between bacteria and nematodes: Intestinal microorganisms of soil invertebrates, *Soil biology*, Ed.: König H., Varma A., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 6: 55-64.

**Cottrell, T.E., Shapiro-Ilan, D.I., Horton, D.L., Mizell, R.F. 2011.** III Laboratory virulence and orchard efficacy of entomopathogenic nematodes toward the lesser peachtree borer (Lepidoptera: Sesiidae). *Environmental Entomology*. 104: 47–53.

**Djunaedy, A. 2009.** Studi Karakteristik Ekologi Nematoda Entomopatogen Heterorhabditis Isolat Lokal Madura. *Embryo*, 6(1): 1-12.

**Dunphy, G.B., Webster, J.M. 1989.** The monoxenic culture of *Neoplectana carpocapsae* DD136 and *Heterorhabditis heliothidis*. *Revue de Nématologie*, 12: 113–123.

**Ehlers, R.-U., Lunau, S., Krasomil-Osterfeld, K., Osterfeld, K.H. 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.K., Easwaramoorthy, S.K., Burnell, A. 2000.** Mass production potential of the bacto-helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica*-*Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol Science and Technology*, 10: 607–616.

**Floyd, L. I. III., Singh, S., Holmes, L.D. 2012.** Mass Production of the Beneficial Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and Its Bacterial Symbiont *Photorhabdus luminescens*. *Indian J Microbiol* 52(3): 316–324.

**Fodor, E., Szallas, E., Kiss, Z., Fodor, A., Horvath, L. I., Chitwood, D.J., Farkas, T. 1997.** Composition and biophysical properties of lipids in *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens*, symbiotic bacteria associated with entomopathogenic nematodes. *Appl Environ Microbiol*, 63: 2826-2831.

**Forst, S., Clarke, D., 2002.** Bacteria–nematodes symbiosis: Entomopathogenic Nematology, Ed.: Gaugler, R., CABI Publishing, Wallingford, UK, pp: 57–77.

**Friedman, M.J. 1990.** Commercial production and development: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, Ed.: Gaugler, R., Kaya, H. K., CRC Press, Boca Raton, FL., pp: 153–172.

**Gaugler, R., Georgis, R. 1991.** Culture method and efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Biological Control*, 1: 269–274.

**Gaugler, R., Han, R. 2002.** Production technology: Entomopathogenic Nematology, Ed.: Gaugler, R., CABI, Wallingford, UK, pp: 289–310.

**Gaugler, R., Kaya, H. K. 1990.** Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press. Inc. Boca Raton, FL.

**Georgis, R., Dunlop, D. B., Grewal, P. S. 1995.** Formulation of entomopathogenic nematodes: Pest Control Agents: Formulation and Delivery, Ed.: Hall, F. R., Barry, J. W., DC: American Chemical Society, Washington, pp: 197–205.

**Gil, G.H., Choo, H.Y., Gaugler, R. 2002.** Enhancement of entomopathogenic nematode production in in-vitro liquid culture of *Heterorhabditis bacteriophora* by fed-batch culture with glucose supplementation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58: 751–755.

**Glaser, R.W. 1931.** The cultivation of a nematode parasite of an insect. *Science*, 73: 614-615.

**Griffin, C.T., Boemare, N. E., Lewis, E. E. 2005.** Biology and Behaviour: Nematodes as Biocontrol Agents, Ed.: Grewal, P. S., Ehlers, R-U., Shapiro-Ian, D. I., CABI International, Wallingford, UK., pp: 47-64.

**Han, R., Cao, L., Liu, X. 1992.** Relationship between medium composition, inoculum size, temperature and culture time in the yields of *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes. *Fundamental and Applied Nematology*, 15: 223–229.

**Han, R., Cao, L., Liu, X. 1993.** Effects of inoculum size, temperature, and time on *in vitro* production of *Steinernema carpocapsae* Agriotos. *Nematologica*, 39: 366–375.

**Han, R., Li, L., Pang, X. 1997.** Modeling of the culture parameters for production of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in solid culture. *Natural Enemies of Insects*, 19: 75–83.

**Han, R., Pang, X., Li, L. 1995.** Optimization of the medium components for the solid culture of entomopathogenic *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes. *Natural Enemies of Insects*, 17: 153–164.

**Hara, A.H., Lindegren, J.E., Kaya, H.K. 1981.** Monoxenic mass production of the entomogenous nematode *Neoplectana carpocapsae* Weiser on dog food/agar medium. USDA Advances in Agriculture W-16, 8 pp.



- Hazır, S., Kaya, H.K., Stock, S.P., Keskin, N. 2003.** Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turk Journal Biol.*, 27: 181-202.
- 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: 507–515.
- Indriyanti, D.R., Muharromah, N. L. 2016.** Mass Cultivation of Entomopathogenic Nematode in Artificial Media. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 8(1): 113-120.
- Jeffke, T., Jende, D., Matje, C., Ehlers, R-U., Berthe-Corti, L. 2000.** Growth of *Photorhabdus luminescens* in batch and glucose fed-batch culture. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 326–330.
- Johnigk, S-A., 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: 651–658.
- Kary, N.E., Chahardoh, S., Mohammadi, D., Dillon, A.B. 2017.** Effect of temperature, time and glycerol concentration on the dehydration and rehydration process of *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* in alginate granule formulation. *Nematology*, 19: 225-235.
- Kaya, H.K., Gaugler, R. 1993.** Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38: 181-206.
- Koppenhöfer, A.M. 2000.** Nematodes: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Ed.: Lacey, L. A., Kaya, H. K., Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp: 283-301
- Koppenhöfer, A.M. 2007.** Nematodes: Field manual of techniques in invertebrate pathology, Ed.: Lacey, L. A., Kaya, H. K., Springer, Germany, pp: 249-264.
- Lacey, L. A., Georgis, R. 2012.** Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology*, 44(2): 218–225.
- Lee, M-M., Sicard, M., Skeie, M., Stock S. P. 2009.** *Steinernema boemarei* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern France. *Syst. Parasitol*, 72: 127–141.
- Leite, L.G., Shapiro-Ilan, D.I., Hazır, S., Jackson, M.A. 2017.** Effect of inoculum age and physical parameters on in vitro culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *Journal of Helminthology*, 91: 686–695.

**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: 385–399.

**Malik, A.F. 2010.** Biological Control. Tahap perbanyakan NPS *Steinernema* spp. Staf LUPH Balai Proteksi Tanaman Perkebunan Pontianak. [Http://akhmadfaisalmalik.blogspot.co.id/2010/12/tahap-perbanyakan-nps-steinernema-spp.html](http://akhmadfaisalmalik.blogspot.co.id/2010/12/tahap-perbanyakan-nps-steinernema-spp.html). diakses 1 Maret 2014.

**Mráček, Z., Nguyen, K.B., Tailliez, P., Boemare, N., Chen, S. 2006.** *Steinernema sichuanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan. *Journal of Invertebrate Pathology*, east Tibetan Mts., China., 93: 157–169.

**Neves, J.M., Teixeira, J.A., Simoes, N., Mota, M. 2001.** Effect of airflow rate on yield of *Steinernema carpocapsae* Az 20 in liquid culture in an external-loop airlift bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 72: 369–373.

**Rahim, A. 2010.** Pengaruh Jumlah Ulat *Tenebrio molitor* sebagai Media Perbanyakan Terhadap Kerapatan Infektif Juvenil (IJ) Agens Hayati Nematoda Entomopatogen. *Media Sains*, 2(1).

**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.

**Seenivasan, N. 2017.** Evaluation of Different Solid Media for Mass Production of Native Entomopathogenic Nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* Isolated from Cotton Fields. *International Journal of Research Studies in Zoology (IJRSZ)*, 2(3): 45-50.

**Shapiro, D. I., McCoy, C.W. 2000.** Effect of culture method and formulation on the virulence of *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae) to *Diaprepes abbreviatus* (Curculionidae). *Journal of Nematology*, 32: 281–288.

**Shapiro-Ilan, D.I., Gaugler, R., Tedders, W.L., Brown, I., Lewis E.E. 2002a.** Optimization of inoculation for in vivo production of entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 34: 343–350.

**Shapiro-Ilan, D.I., Han, R., Qiu, X. 2014.** Invertebrates and Entomopathogens: Mass Production Of Beneficial Organisms, Ed: Morales-Ramos, J.A., Guadalupe Rojas, M., Shapiro-Ilan, D.I., Academic Press, pp: 321-355.

**Shapiro-Ilan, D.I., Han, R., Dolinski, C. 2012.** Entomopathogenic Nematode Production and Application Technology. *J. Nematol*, 44(2): 206–217.

**Sharma, P.M., 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(9): 855-870.

**Somwong, P., Petcharat, J. 2012.** Culture of The Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae* (Weiser) on Artificial Media. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, 7(4): 229-232.

**Stock, S.P., Griffin, C.T., Chaerani, R. 2004.** Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. *Nematology*, 6: 401-412.

**Stock, S.P., Hunt D. J. 2005.** Morphology and systematic of nematodes used in biocontrol: Nematodes as Biocontrol Agents, Ed.: Grewal, P. S., Ehlers, R-U., Shapiro-Ian, D. I., CABI Publishing, Wallingford, UK, pp: 3-43.

**Stock, S.P., Rivera-Orduño, B., Flores-Lara, Y. 2009.** *Heterorhabditis sonorensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a natural pathogen of the seasonal cicada *Diceroprocta ornea* (Walker) (Homoptera: Cicadidae) in the Sonoran desert. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100: 175–184.

**Stoll, N.R. 1952.** Axenic cultivation of the parasitic nematode, *Neoplectana glaseri* in a fluid medium containing raw liver extract. *Journal of Parasitology*, 39: 422-444.

**Strauch, O., Niemann, I., Niemann, A., Schmidt, A.J., Peters, A., Ehlers, R-U. 2000.** Storage and formulation of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *H. bacteriophora*. *Biocontrol*, 45: 483–500.

**Surrey, M.R., Davies, R.J. 1996.** Pilot scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis*. *Fundamentals and Applied Nematology*, 17: 575–582.

**Tess, J.M., Devang, U., Sivanadane, M., Bullard, D.R., Frederick, J., Holmes, L. 2016.** Mass Production Of The Beneficial Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* on Solid Media Using Solid State Fermentation Technology. *International Journal of Agriculture Sciences*, 55(8): 3030-3032.

**Uhan, T.S. 2008.** Bioefikasi Beberapa Isolat Nematoda Entomopatogenik *Steinernema* spp. terhadap *Spodoptera litura* Fabricius pada Tanaman Cabai di Rumah Kaca. *J. Hort.*, 18(2): 175-184.

**Uribe-Lorio, L., Mora, M., Stock, S.P. 2007.** *Steinernema costaricense* n. sp. and *S. puntauvense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), two new entomopathogenic nematodes from Costa Rica. *Syst Parasitol*, 68: 167–182.

**Woodrind, J.L., Kaya, H.K. 1988.** *Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques*. Fayetteville, AR: Field House Books.

**Wouts, W.M. 1981.** Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematode: Heterorhabditidae) on artificial media. *Journal of Nematology*. 13: 467–469.

**Yoo, S.K., Brown, I., Gaugler, R., 2000.** Liquid Media Development for *Heterorhabditis bacteriophora*: Lipid Source and Concentration. *Appl Microbiol Biotechnol*, 54(6): 759-763.

**Yoo, S.K., Brown I., Gaugler, R. 2000.** Liquid media development for Heterorhabditis bacteriophora : lipid source and concentration. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 759 -763.

**Young, J.M., Dunnill, P., Pearce, J.D. 2002.** Separation characteristics of liquid nematode cultures and the design of recovery operations. *Biotechnology Progress*, 18: 29–35.

**Zhang, C., Liu, J., Xu, M., Sun, J., Yang, S., An, X., Gao, G., Lin M., Lai R., He, Z., Wub Y., Zhang K. 2008.** *Heterorhabditoides chongmingensis* gen. nov., sp. nov. (Rhabditida: Rhabditidae) a novel member of the entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 153–168.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülsüm ÇELİK

Doğum Yeri ve Tarihi : AĞRI / TÜRKİYE, 16.10.1991

Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Hasan Ali Yücel Lisesi / Bursa (2005-2009)

Lisans : Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği Programı (2010-2014)

Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı (2015-2018)

İletişim (e-posta) : gulsum1610@gmail.com