

**Böceklerle İlişkili *Micrococcus* sp. Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)'ya Karşı Virülansları**

Ali SEVİM

How to cite: Sevim, A. (2024). Böceklerle ilişkili *Micrococcus* sp. türlerinin moleküler karakterizasyonu ve *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)'ya karşı virülansları. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 9(1), 14-25. <https://doi.org/10.33484/sinopfbid.1344047>

Araştırma Makalesi**Sorumlu Yazar**Ali SEVİM
ali.sevim@ahievran.edu.tr**Yazara ait ORCID**

A.S: 0000-0003-2472-599X

Received: 15.08.2023**Accepted:** 22.01.2024**Öz**

Şimdiye kadar 100'den fazla bakteri türünün eklem bacaklılarda hastalık oluşturduğu bilinmektedir. Entomopatojenik bakteriler ucuz olmaları, kitle üretimindeki kolaylık, konak spesifikliğı, güvenlik ve çevrede kalıcılık gibi nedenlerden ötürü zararlı böceklerle mikrobiyal mücadelede uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Bu çalışmada çeşitli böcek örneklerinden (*Malacosoma* sp. (Lepidoptera: Lasiocampidae), *Ogcodocera* sp. (Diptera: Bombyliidae) ve *Orgyia* sp. (Lepidoptera: Erebidae)) izole edilen altı (6) adet bakteri suşu ilk etapta morfolojik olarak *Micrococcus* sp. olarak tanımlanmıştır. Daha sonra bu bakteri suşlarının 16S rRNA sekans analizi ile moleküler seviyede tanımlanmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu bakteri suşlarının *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvalarına karşı öldürücülük etkileri belirlenmiştir. Altı adet bakteri suşu da (MK-5, AS-2, AS-3, AS-4, BB-1 ve BB-5) *Micrococcus* sp. olarak cins düzeyinde tanımlanmıştır. *G. mellonella* larvalarına karşı patojenite testleri sonucunda ise sadece MK-5 suşu %70 ölüm oranına neden olmuş diğer suşlar önemli derecede ölüm oranına neden olmamıştır. Elde edilen sonuçların böceklerle ilişkili simbiyotik bakterilerin tanımlanmasında ve patojenik özelliklerinin belirlenmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Malacosoma* sp., *Ogcodocera* sp., *Orgyia* sp., *Micrococcus*, 16S rRNA, virülans**Molecular Characterization of *Micrococcus* sp. Associated with Insects and Their Virulence Against *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)**Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma
Bölümü, Kırşehir, Türkiye**Abstract**

So far, more than 100 species of bacteria are known to cause disease in arthropods. Entomopathogenic bacteria have been used for many years in the microbial control of insect pests due to reasons such as cheapness, ease of mass production, host specificity, safety, and persistence in the environment. In this study, six (6) bacterial strains isolated from various insect samples (*Malacosoma* sp. (Lepidoptera: Lasiocampidae), *Ogcodocera* sp. (Diptera: Bombyliidae) and *Orgyia* sp. (Lepidoptera: Erebidae)) were initially identified as *Micrococcus* sp. at morphological level. These bacterial strains were then identified by 16S rRNA sequence analysis at the molecular level. In addition, the mortality effects of these bacterial strains against *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae were determined. Six bacterial strains (MK-5, AS-2, AS-3, AS-4, BB-1, and BB-5) were identified at the genus level as *Micrococcus* sp. As

Giriş

Böcekler Dünya üzerinde yaşayan en büyük canlı grubunu oluşturmaktadırlar ve ekosistemde anahtar role sahiptirler. Diğer canlılar gibi böcekler de ekolojilerini ve evrimlerini derin şekilde etkileyen mikroorganizmalarla yakın ilişki içerisinde yaşarlar. Bakteriler, arkealar, funguslar, protozoalar ve virüsler gibi mikroorganizmalar böcek konakları ile kalıcı veya geçici olarak ilişki içerisinde oldukları [1]. Diğer ökaryotik sistemler gibi farklı böcek ve mikroplar arasındaki simbiyotik ilişkiler mutualistik, kommensalistik, saprofitik ve parazitik (veya patojenik) şeklinde olabilmektedir [2]. Böceklerde yaşayan simbiyotik mikroorganizmalar böceklerin biyolojisi ve fizyolojisindeki pek çok olayı etkilemektedir. Örneğin bu mikroorganizmalar besinlerin sindirilmesi, besin alınımı, üreme, bağışıklığı kuvvetlendirme ve bitki konağı savunma mekanizmasının üstesinden gelme gibi pek çok farklı görevlerde rol alabilmektedir [3, 4]. Böcek grupları içerisinde Lepidoptera takımına ait üyeler Dünya çapında en önemli tarım zararlılarını içermektedir ve bu grup en çeşitli ikinci böcek takımını oluşturmaktadır. Ancak Lepidoptera üyelerinin biyolojisinde temel rol oynayan bakteri türlerine dair net kanıtlar oldukça azdır [5]. Bu yüzden bu takımın üyelerine ait bakteri türlerinin tanımlanması ve rollerinin araştırılması ihtiyaç duyulan bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Böceklerle ilişkili olan bakterilerin birçoğu mutualistik olmasına rağmen sadece sınırlı sayıda bakteri böceklerde patojenik etkiye sahiptir [6]. Entomopatojenik bakteriler ve ürettikleri toksinler mikrobiyal insektisitler içerisinde ucuz, kitle üretim kolaylığı, konak spesifikliğı ve güvenlik gibi nedenlerden ötürü ticari olarak en başarılı olanlardır. Bu organizmalar sindirim sisteminden konağı girmekte, burada toksin üretmekte (veya diğer bazı patojenik faktörleri), bu toksinler orta bağırsak epitelini yıkmakta ve hemosele ulaşarak konak böceğı sepsis ile öldürmektedirler [7]. Entomopatojenik bakterilerin çoğunluğu Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae ve Micrococcaceae familyası içerisinde yer almaktadır. Bu familyalar arasında en fazla dikkati Bacillaceae familyası çekmiştir [8]. Bacillaceae familyası içerisinde ise en fazla çalışılan tür *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) olup toplam insektisit piyasasının yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır [9]. *Micrococcus* cinsi spor oluşturmayan, genellikle hareketsiz, Gram pozitif, düzensiz kümeler oluşturan veya tetradlar halinde bulunan küre şeklindeki hücrelerden oluşmaktadır. Cins içerisindeki pek çok tür karotenoid pigment üretmektedir. Cins içerisinde şimdiye kadar toplam dokuz tür tanımlanmıştır (*M. luteus*, *M. lylae*, *M. varians*, *M. roseus*, *M. aqilis*, *M. kristinae*, *M. nishino miyaensis*, *M. sedentarius* ve *M. halobius*) [10]. İnsanları da içeren sıcak kanlı hayvanların derisi genellikle gıdaları kontamine eden *Micrococcus* suşlarının ana rezervuarıdır. Genel

olarak *Micrococcus* cinsi patojenik olarak değerlendirilmez ama bazı türlerin fırsatçı patojen olarak bazı enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir [11, 12]. Bu çalışmada çeşitli böcek örneklerinden izole edilen *Micrococcus* sp. suşlarının 16S rRNA dizin analizi ile karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca elde edilen suşların *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) üzerindeki öldürücülük etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların *Micrococcus* türlerinin patojenik özelliklerinin (özellikle böcekler açısından) belirlenmesi açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

Materyal ve Metot

***Micrococcus* Suşları**

Çalışmada kullanılan *Micrococcus* sp. suşları Lepidoptera takımına ait çeşitli böcek örneklerinden (*Malacosoma* sp. (Lepidoptera: Lasiocampidae), *Ogcodocera* sp. (Diptera: Bombyliidae) ve *Orgyia* sp. (Lepidoptera: Erebiidae) izole edilmiştir. Larva örnekleri Kırşehir il sınırları içerisinde toplanmıştır. Larvalardan bakteri izolasyonu Demirci ve arkadaşlarının çalışmasında belirtilen yöntemle gerçekleştirilmiştir [13]. İzole edilen suşlar çizgi ekim ile saflaştırıldıktan sonra 3 ml nütrient broth besiyerinde 30°C’de gece boyu büyütülmüş ve -20°C’de %20’lik gliserol içerisinde daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmıştır. Suşlar sarı pigment üretimi, S-tipi koloni ve küre şeklindeki hücrelere göre seçilmiştir.

16S rRNA Dizin Analizi

Micrococcus sp. suşlarının moleküler karakterizasyonu için 16S rRNA dizin analizi kullanılmıştır. Bunun için stok kültürlerden nütrient agar besiyerine çizgi ekim yapılmış ve 30°C’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Buradan tek koloniler seçilerek genomik DNA izolasyonunda kullanılmıştır. Bakteriyel suşlardan genomik DNA izolasyonu Sambrook ve ark. [14] tarafından belirlenen standart prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. *Micrococcus* türleri gram pozitif bakteriler olduğundan standart prosedür uygulamasından önce lizozim enzimi ile hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır. İzole edilen DNA’lar 50 µL Tris-EDTA tamponu (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) içerisinde çözülmüş ve kullanılmaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir. Her bir bakteriyel suş için 16S rRNA gen bölgesini çoğaltmada ileri primer olarak 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ve geri primer olarak ise 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Macrogen) kullanılmıştır. PCR reaksiyonları 5 µL 10× *Taq* DNA polimeraz reaksiyon tamponu, 1,5 µL 10 mmol/L dNTP karışımı, 1,5 µL 10 pmol her bir primerden, 1 µL 5 U/µL *Taq* DNA polimeraz (Fermentas), 3 µL 5 mM MgCl₂, 2 µL (100 ng) genomik DNA ve 34.5 µL dH₂O olacak şekilde ayarlanmıştır. PCR koşulları ise 2 dk 94°C’de başlangıç denatürasyonundan sonra 35 döngü (45 s 94°C (denatürasyon), 60 s 55°C (bağlanma) ve 60 s 72°C (uzama) olacak şekilde ayarlanmıştır. Son uzama adımı ise 10 dk 72°C olacak şekilde ayarlanmıştır. PCR reaksiyonlarından sonra her bir PCR ürünü etidyum bromür içeren %1’lik agaroz jelde 90 V’da yürütülmüş ve doğru olarak tespit edilen bantlar saflaştırıldıktan sonra dizin analizi için

Macrogen (Hollanda) firmasına gönderilmiştir. 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') ve 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC -3') primer çifti dizin analizi için kullanılmıştır [13]. Elde edilen sekanslar NCBI GenBank'ta yer alan BLAST soruşturmasına tabi tutulmuş ve bakteriyel suşların en yakın ilişkili oldukları türler/suşlar belirlenmiştir [15, 16]. Son olarak elde edilen sekanslar filogenetik ağaç oluşturmak için kullanılmıştır.

Patojenite Testleri

G. mellonella'ya karşı patojenite testleri için her bir bakteriyel izolat stok kültürlerden çıkartılmış ve nütrient agar (NA) besiyerine çizgi ekimleri yapılmıştır. Buradan alınan tek koloniler her bir bakteri için ayrı ayrı 3 ml nütrient broth (NB) besiyerine inoküle edilmiş ve 30°C'de çalkalamalı inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodunun sonunda bakteriyel hücre yoğunluğu PBS (fosfat tampon solüsyonu) kullanılarak 600_{nm}'de 1.8×10^9 cfu/ml olacak şekilde ayarlanmıştır [17]. Bioassay deneyleri için, sağlıklı *G. mellonella* larvaları (3 veya 4. evre) laboratuvar kültürlerinden elde edilmiş ve rastgele seçilerek yalnızca sağlıklı larvalar patojenite deneylerinde kullanılmıştır. 20 gr taze hazırlanmış yapay besin (180 gr bal, 180 gr gliserin, 50 gr bal mumu, 260 gr buğday unu, 80 gr kuru maya ve 50 gr buğday kepeği [18] yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan 1 ml bakteriyel solüsyonla inoküle edilmiştir. Kontrol grubu sadece steril PBS ile inoküle edilmiştir. İnoküle edilmiş yapay besinler ayrı olarak plastik kutular (10 × 10 × 5) içerisine yerleştirilmiştir. Kutuların kapağı hava alması için delinmiştir. Daha sonra 10 adet sağlıklı larva her bir tekrar ve bakteriyel izolat için kontamine besin içeren kuyulara yerleştirilmiş ve larvaların beslenmesi sağlanmıştır. Her bir tekrar için 10 larva kullanılmış ve bütün deneyler 3 kere tekrar edilmiştir. Son olarak plastik kutular 25°C'de inkübasyona bırakılmış ve 10. gün sonunda ölü larvalar sayılmıştır [19].

Veri Analizi

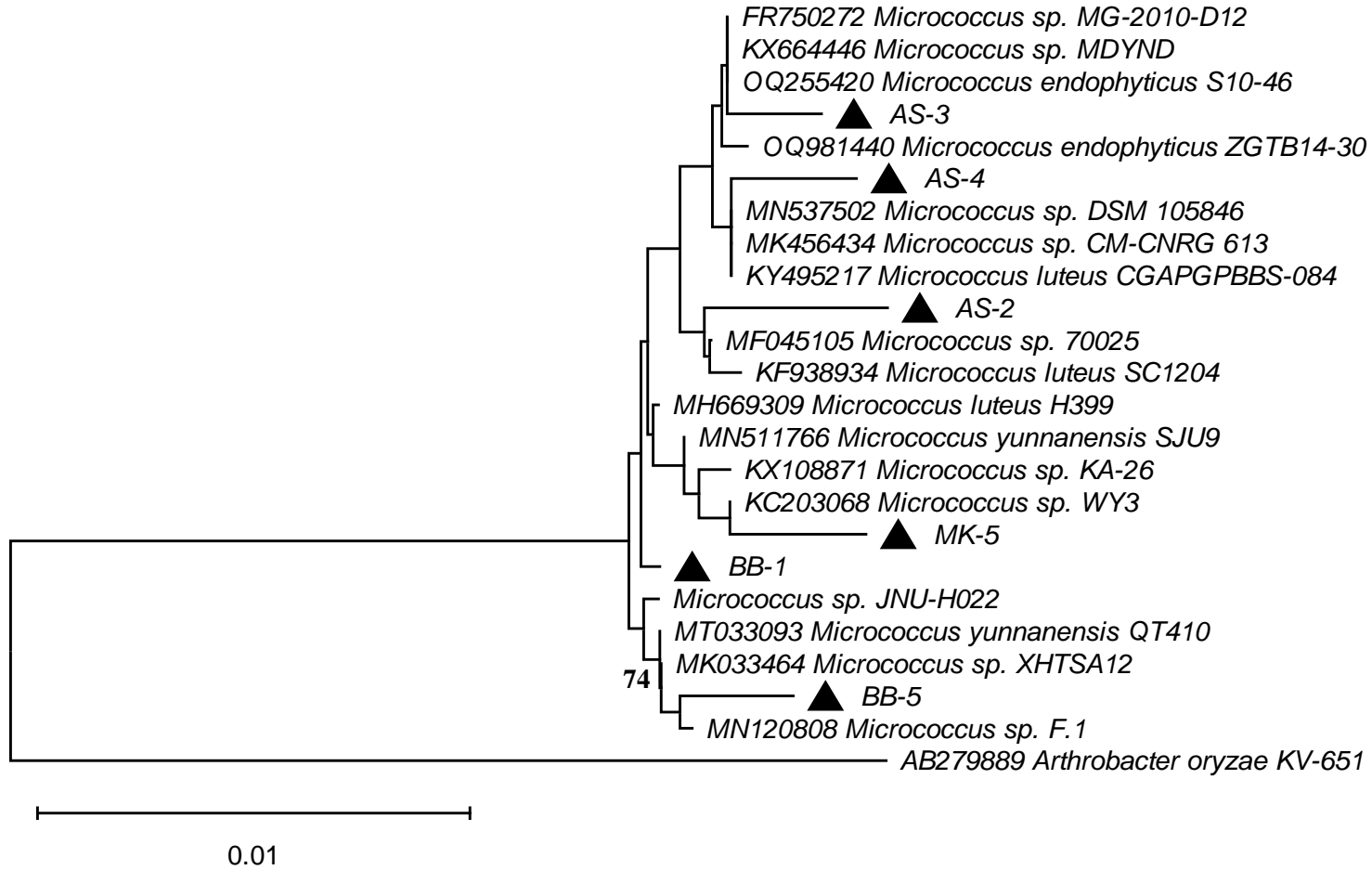
Bakteriyel suşların 16S rRNA genlerine ait sekanslar Bioedit 7.1.3.0 programı ile işlenmiştir [20]. Bakteriyel suşlara ait 16S rRNA sekansları ve GenBank'tan alınan en yakın ilişkili oldukları bakteri suşlarına ait 16S rRNA sekansları Bioedit programında yer alan ClustalW ile hizalanmıştır [20, 21]. Hizalama sonucunda bütün sekansların baş ve son bölgelerinden gerekli kesimler yapılmıştır. Bakteriyel izolatların birbirleri ile olan filogenetik ilişkisi Neighbor-Joining (NJ) metodu kullanarak p-distance analizi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ağacın iç dallarının güvenilirliği 1.000 tekrara dayalı bootstrap analizi ile gerçekleştirilmiştir. Analizler MEGA 11.0.13 programı ile gerçekleştirilmiştir [22]. Ölüm değerleri Abbott formülü kullanılarak anlamlandırılmıştır ve yüzde (%) ölüm değerleri hesaplanmıştır [23]. Ölüm değerleri açısından bakteriyel izolatları birbirleri ile karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Post hoc testi olarak Tukey testi kullanılmıştır. Bütün veriler Arcsin transformasyonuna tabi tutulmuş ve Levene istatistiği kullanılarak varyans homojenitesi açısından değerlendirilmiştir. Analizler Minitab 17.1.0 programı ile gerçekleştirilmiştir.

Bulgular

Yapılan çalışmada üç farklı böcek örneğinden toplam olarak 6 adet *Micrococcus* sp. suşu elde edilmiştir. *Micrococcus* suşları başlangıçta morfolojik olarak sarı pigment üretmeleri ve düz koloni (S-tipi) oluşturmaları ile seçilmiştir. Daha sonra hücresel düzeyde incelemeler yapılmış ve hepsinin tetradlar veya düzensiz kümeler oluşturan bakteriler oldukları tespit edilmiştir. Bakteriyel suşların moleküler karakterizasyonlarını yapmak için 16S rRNA gen bölgesinin dizin analizi yapılmış ve yüzde (%) benzerlikler ortaya konmuştur. *Micrococcus* izolatlarının 16S rRNA gen bölgesine göre BLAST (GenBank) yüzde (%) benzerlik sonuçları, 16S rRNA gen bölgesi için GenBank numaraları ve izole edildikleri böcek türü Tablo 1’de verilmektedir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonrasında bütün suşlar (MK-5, AS-2, AS-3, AS-4, BB-1 ve BB-5) *Micrococcus* sp. olarak tanımlanmıştır. Yapılan filogenetik analizler bunu desteklemektedir (Şekil 1).

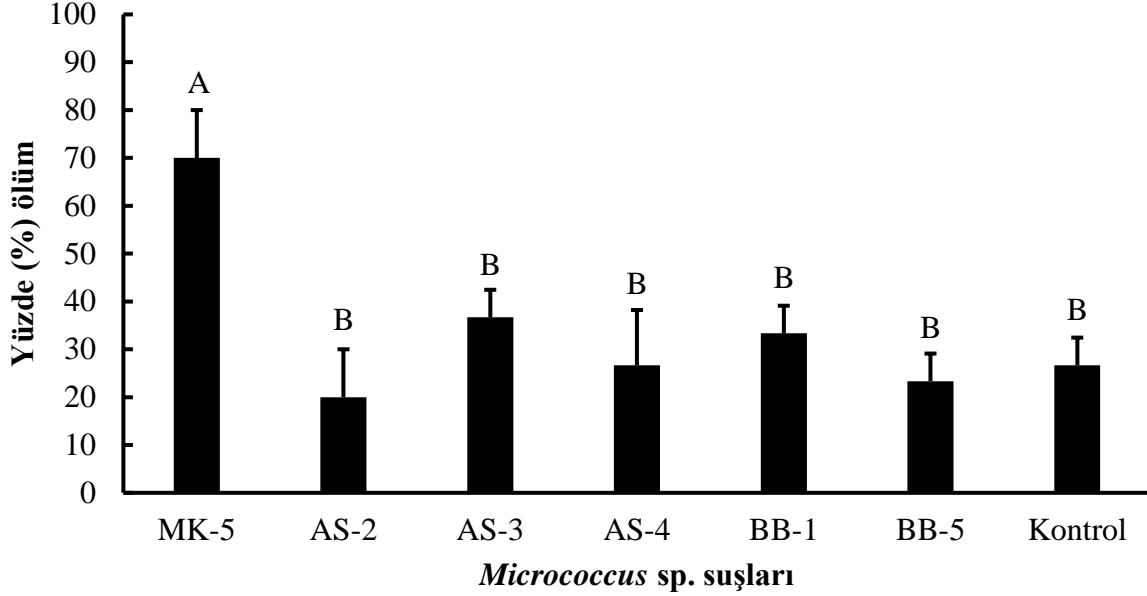
Tablo 1. *Micrococcus* izolatlarının 16S rRNA gen bölgesine göre BLAST (GenBank) yüzde (%) benzerlik sonuçları, 16S rRNA gen bölgesi için GenBank numaraları ve izole edildikleri böcek türü

İzolat	GenBank numarası	Bakteri türü	En yakın ilişkili olduğu bakteri türleri ve suşları	Örtüşen baz oranı (%)	Yüzde (%) benzerlik	İzole edilen böcek türü
MK-5	OR436472	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp. WY3	%99	%99.57	<i>Malacosoma</i> sp. (Lepidoptera: Lasiocampidae)
			<i>Micrococcus yunnanensis</i> SJU9	%99	%99.42	
			<i>Micrococcus</i> sp. KA-26	%99	%99.49	
AS-2	OR436473	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp. 70025	%98	%99.57	<i>Ogcodocera</i> sp. (Diptera: Bombyliidae)
			<i>Micrococcus endophyticus</i> ZGTB14-30	%99	%99.49	
			<i>Micrococcus luteus</i> SC1204	%99	%99.49	
AS-3	OR436474	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus endophyticus</i> S10-46	%99	%99.64	<i>Ogcodocera</i> sp. (Diptera: Bombyliidae)
			<i>Micrococcus</i> sp. MG-2010-D12	%99	%99.64	
			<i>Micrococcus</i> sp. MDYND	%99	%99.57	
AS-4	OR436475	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp. DSM 105846	%100	%99.58	<i>Ogcodocera</i> sp. (Diptera: Bombyliidae)
			<i>Micrococcus</i> sp. CM-CNRG 613	%100	%99.58	
			<i>Micrococcus luteus</i> CGAPGPBBS-084	%100	%99.58	
BB-1	OR436476	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Actinomycetia bacterium</i> 1032-12.1	%99	%99.93	<i>Orgyia</i> sp. (Lepidoptera: Erebiidae)
			<i>Micrococcus</i> sp. JNU-H022	%99	%99.93	
			<i>Micrococcus luteus</i> H399	%99	%99.93	
BB-5	OR436477	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp. F.1	%99	%99.49	<i>Orgyia</i> sp. (Lepidoptera: Erebiidae)
			<i>Micrococcus yunnanensis</i> QT410	%100	%99.42	
			<i>Micrococcus</i> sp. XHTSA12	%100	%99.42	



Şekil 1. Çeşitli böcek örneklerinden izole edilen *Micrococcus* sp. suşlarının en yakın ilişkili oldukları bakteri türleri ile ilişkisini gösteren dendrogram. Filogenetik ağaç 16S rRNA gen bölgesinin kısmi sekansı (yaklaşık 1.500 bp) elde edilerek oluşturulmuştur. Ağaç Neighbor-Joining (N-J) analizi kullanarak p-distance metodu ile oluşturulmuştur. Bootstrap analizi 1000 yalancı tekrara dayalı olarak oluşturulmuş ve %70 ve yukarısında olanlar ağacın dallarında gösterilmiştir. Siyah üçgen *Micrococcus* sp. suşlarını göstermektedir. Ağacın dibinde yer alan ölçek ise genetik mesafeyi temsil etmektedir. *Arthrobacter oryzae* KV-651 dış grup olarak kullanılmıştır

Yapılan patojenite testleri sonucunda sadece bir suş (MK-5) hariç diğerlerinin hepsi kontrol grubu ile aynı ölüm değerine neden olmuştur ($F=12.9$, $df=6$, $p<0.05$). MK-5 suşu ise %70'lik değer ile kontrol grubu ve diğer suşlardan anlamlı derecede farklı ölüm oranına neden olmuştur ($F=12.9$, $df=6$, $p<0.05$) (Şekil 2). En yüksek ölüm değeri MK-5 suşundan elde edilmiştir.



Şekil 2. *Micrococcus sp.* izolatlarının 1.8×10^9 cfu/ml bakteriyel konsantrasyon kullanarak *G. mellonella* larvalarına karşı uygulamadan sonra 10. gün sonunda patojenite değerleri. Ölüm değerleri Abbott formülü kullanılarak anlaşılmıştır [22]. Barlar standart hatayı göstermektedir. Büyük harfler larva ölüm değerleri arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Tartışma ve Sonuç

Mikrobiyal pestisitler bakteri, fungus, virüs, protozoa ve alg gibi mikroorganizmalardan türetilen ve zararlıları kontrol etmek için kullanılan ürünlerdir. Mikroplar genellikle zararlıların büyümesini engellemek veya öldürmek için toksik metabolitleri kullanmaktadır [24]. Mikrobiyal pestisitler içerisinde bakteriyel insektisitler ise ticari olarak en fazla önem verilen grubu oluşturmaktadır [25]. Yaklaşık olarak 100 bakteri eklem bacaklılarda patojen olarak tanımlanmasına rağmen sadece birkaç tanesi ticari olarak üretilmektedir. Ticari olarak üretilen türler arasında en fazla önem gösterilen ve popülerlik kazanan türler ise *Bacillus thuringiensis* (Bt) ve *Serratia entomophila*'dır [26]. *Micrococcus* suşları toprak, tatlı ve deniz suyu, kum ve bitkisel vejetasyonlar gibi çok geniş bir karasal ve sucul ortamlarda bulunabilmektedir. Aynı zamanda bu bakteriler insan deri florasından yaygın olarak da izole edilmektedirler [11]. Bu cinse ait bakterilerin böceklerden izole edildiğine dair pek çok çalışma bulunmaktadır [13, 27-29]. Lipa ve Wiland [30] *M. luteus*'un *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarına karşı %8 mortaliteye neden olduğunu göstermişlerdir. Sezen ve Demirbağ [31] aynı bakterinin *Balanicus nucum* (Coleoptera: Curculionidae) larvaları üzerinde %30 ölüm değerine neden olduklarını göstermiştir. Yine Sezen ve Demirbağ [28] *M. luteus* As-4 bakterisinin *Agelastica alni* (Coleoptera: Chrysomelidae) larvaları üzerinde %40 öldürücü etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Demirci

ve ark. [13] *M. luteus* Pv8 bakterisinin *Plagioderia versicolora* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae)'nın larvaları üzerinde %50 ve erginleri üzerinde ise %40 ölüme neden olduklarını göstermiştir. Buna karşılık böceklerden izole edilen ve konakları üzerinde patojenik etki göstermeyen *M. luteus* veya *Micrococcus* sp. suşları da bulunmaktadır [27, 32]. Bizim çalışmamızda ise MK-5 suşu (%70 ölüm oranı ile) hariç diğer suşlar insektisidal aktivite göstermemiştir. Bütün bu bilgiler *Micrococcus* türlerinin böceklerle yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Fakat böcek patojeni olduklarına dair kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Muhtemelen böceklerle simbiyotik ilişki içerisinde yaşayan bu bakterilerin konaklarındaki rollerinin araştırılmasına yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca patojenik özelliklerinin ispatlanması ve doğrulanması için daha detaylı (patolojik ve detaylı bioassay deneyleri gibi) çalışmalara ihtiyaç vardır. Bakteriyel taksonomi mikroorganizmaların tanımlanmasını, isimlendirilmesini ve sınıflandırılmasını içermektedir. Modern bakteriyel taksonomide genel olarak filogenetik ilişkilerin kullanılması kabul görmüştür. Bakteriler arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemede en yaygın kullanılan metot 16S rRNA gen bölgesine ait sekansların karşılaştırılması analizidir [33]. Oysaki 16S rRNA genine ait sekans analizinde yüzde (%) benzerliğin kullanılması doğru tür tanımlaması açısından pek çok sınırlamalara sahiptir. Bundan dolayı günümüzde DNA-DNA hibridizasyonu, genomun % G+C içeriği, pulsed-field jel elektroforezi, çoklu lokus sekans analizi ya da son zamanlarda tüm genom sekansı gibi teknikler doğru tür tanımlaması için tercih edilmektedir [34, 35]. Bunların yanında yeni nesil dizileme ile büyük destek kazanan mikrobiyal genomik taksonomi, hesaplama araçlarıyla birleştirilmiş genomik bilgi elde etmek için hızlı ve uygun maliyetli yaklaşımlar sağlar, böylece yeni taksonomik yaklaşımların güvenilirliğini arttırmaktadır [34]. Bizim çalışmamızda *Micrococcus* suşları 16S rRNA dizin analizi ile cins düzeyinde tanımlanabilmiştir. Bu suşların (özellikle MK-5'in) bakteriyel taksonomide kullanılan polifazik yaklaşım ile ve özellikle yukarıda sayılan ileri moleküler teknikler ile tür düzeyinde tanımlanmaları gerekmektedir. Sonuç olarak farklı böcek örneklerinden izole edilen *Micrococcus* sp. suşları 16S rRNA dizin analizi ile cins düzeyinde tanımlanmıştır. *G. mellonella* larvalarına karşı patojenik özellikleri belirlenmiş ve en yüksek insektisidal aktivite *Micrococcus* sp. MK-5 (%70) suşundan elde edilmiştir. İleride yapılacak çalışmalar ile bu suşların tür düzeyinde tanımlanması ve MK-5 suşu için detaylı virülans testlerinin yapılması gerekmektedir.

Teşekkür -

Fon/Finansman bilgileri -

Etik Kurul Onayı ve İzinler Çalışma etik kurul izni veya herhangi bir özel izin gerektirmemektedir.

Çıkar çatışmaları/Çatışan çıkarlar-

Yazarların Katkısı- Yazar makalenin son halini okumuş ve onaylamıştır.

Kaynaklar

- [1] Gurung, K., Wertheim, B., & Salles, J. (2019). The microbiome of pest insects: It is not just bacteria. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167, 156-170. <https://doi.org/10.1111/eea.12768>
- [2] Boucias, D. G., & Pendland, J. C. (1998). Insect-Pathogen Relationships. In D. G. Boucias, J. C. Pendland, (Eds), *Principles of Insect Pathology*, (pp. 1-30). Springer.
- [3] Zhao, M., Lin, X., & Guo, X. (2022). The role of insect symbiotic bacteria in metabolizing phytochemicals and agrochemicals. *Insects*, 13(7), 583. <https://doi.org/10.3390/insects13070583>
- [4] Salcedo-Porras, N., Umaña-Díaz, C., de Oliveira Barbosa Bitencourt, R., & Lowenberger, C. (2020). The role of bacterial symbionts in triatomines: An evolutionary perspective. *Microorganisms*, 8(9), 1438. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091438>
- [5] Paniagua Voirol, L. R., Frago, E., Kaltenpoth, M., Hilker, M., & Fatouros, N. E. (2018). Bacterial symbionts in Lepidoptera: Their diversity, transmission, and impact on the host. *Frontiers in Microbiology*, 9, 556. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00556>
- [6] Ruiu, L. (2015) Insect pathogenic bacteria in integrated pest management. *Insects*, 6(2), 352-367. <https://doi.org/10.3390/insects6020352>
- [7] Glare, T. R., Jurat-Fuentes, J. L., & O'Callaghan, M. (2017). Basic and Applied Research: Entomopathogenic Bacteria. In L. A. Lacey, (Ed), *Microbial Control of Insect and Mite Pests*. (pp. 47-67), Academic Press.
- [8] Kalha, C. S., Singh, P. P., Kang, S. S., Hunjan, M. S., Gupta V., & Sharma R. (2014). Entomopathogenic Viruses and Bacteria for Insect-Pest Control. In Abrol D. P., (Ed), *Integrated Pest Management*, (pp. 225-244). Academic Press.
- [9] Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 423-431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>
- [10] Kocur, M., Kloos, W. E., & Schleifer, K. H. (2006). The Genus *Micrococcus*. In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., & Schleifer, K. H., Stackebrandt, E., (Eds), *The Prokaryotes*, (pp. 961-971). Springer.
- [11] Nunez, M. (2014). *Micrococcus*. In Batt C. A., Tortorello M. L., (Eds), *Encyclopedia of Food Microbiology*, (pp. 627-633). Academic Press.
- [12] Zhu, M., Zhu, Q., Yang, Z., & Liang, Z. (2021). Clinical characteristics of patients with *Micrococcus luteus* bloodstream infection in a Chinese tertiary-care hospital. *Polish Journal of Microbiology*, 70(3), 321-326. <https://doi.org/10.33073/pjm-2021-030>
- [13] Demirci, M., Sevim, E., Demir, İ., & Sevim, A. (2013). Culturable bacterial microbiota of *Plagioderia versicolora* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae) and virulence of the isolated strains. *Folia Microbiologica*, 58(3), 201-210. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0199-1>
- [14] Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 19.
- [15] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

- [16] Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Clark, K., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 40 (Database issue), D48-D53. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- [17] Moar, W. J., Pusztai-Carey, M., & Mack, T. P. (1995). Toxicity of purified proteins and the HD-1 strain from *Bacillus thuringiensis* against lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 88, 606-609. <https://doi.org/10.1093/jee/88.3.606>
- [18] Meyling, N. N. (2007). Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Laboratory manual, DARCOF III: Research in Organic Food and Farming (FØJO III).
- [19] Sevim, E., Çocar, M., Sezgin, F. M., & Sevim, A. (2018). Aerobic gut bacterial flora of *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) and their virulence to the host. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28, 30. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0036-1>
- [20] Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41, 95-98.
- [21] Thomson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson T. J. (1994). Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- [22] Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- [23] Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.
- [24] Ayilara, M. S., Adeleke, B. S., Akinola, S. A., Fayose, C. A., Adeyemi, U. T., Gbadegesin, L. A., Omole, R. K., Johnson, R. M., Uthman, Q. O., & Babalola, O. O. (2023). Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1040901. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1040901>
- [25] Jouzani, G. S., Valijanjan, E., & Sharafi, R. (2017). *Bacillus thuringiensis*: A successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2691-2711. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8175-y>
- [26] Chattopadhyay, P., Banerjee, G., & Mukherjee, S. (2017). Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. *3 Biotech*, 7(1), 60. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0717-6>
- [27] Çelebi, Ö., Sevim, E., & Sevim, A. (2014). Investigation of the internal bacterial flora of *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae) and pathogenicity of the flora members. *Biologia*, 69, 1365-1375. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0445-x>
- [28] Sezen, K., & Demirbag, Z. (2006). Insecticidal effects of some biological agents on *Agelastica alni* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biologia*, 61, 687-692. <https://doi.org/10.2478/s11756-006-0141-6>
- [29] Indiragandhi, P., Yoon, C., Yang, J. O., Cho, S., Sa, T. M., & Kim, G. H. (2010). Microbial communities in the developmental stages of B and Q biotypes of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of The Korean Society for Applied. Biological Chemistry*, 53, 605–617. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2010.093>

- [30] Lipa, J. J., & Wiland, E. (1972). Bacteria isolated from cutworms and their infectivity to *Agrotis* sp. *Acta Microbiologica Polonica*, 4, 127-140.
- [31] Sezen, K., & Demirbag, Z. (1999). Isolation and insecticidal activity of some bacteria from the hazelnut beetle (*Balaninus nucum* L.). *Applied Entomology and Zoology*, 34, 85-89.
- [32] Yaman, M., Nalcacioglu, R., & Demirbag, Z. (2002). Studies on bacterial flora in the population of the fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury. (Lep., Arctiidae). *Journal of Applied Entomology*, 126, 470–474. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2002.00681.x>
- [33] Vaneechoutte, M., & Heyndrickx, M. (2001). Application and Analysis of ARDRA Patterns in Bacterial Identification, Taxonomy and Phylogeny. In Dijkshoorn, L., Towner, K. J., Struelens, M., (Eds), *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data*, (pp. 211-247). Elsevier Science B.V.
- [34] Raina, V., Nayak, T., Ray, L., Kumari, K., & Suar, M. (2019). A Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. In. Das, S., Dash, H. R., (Eds), *Microbial Diversity in the Genomic Era*, (pp. 137-152). Academic Press
- [35] Hugenholtz, P., Chuvochina, M., Oren, A., Parks, D. H., & Soo, R. M. (2021). Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequence data. *The ISME Journal*, 15, 1879-1892. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00941-x>