

BAZI BÖCEK PATOJENİ BACILLUS İZOLATLARININ SEROLOJİK OLARAK TANIMLANMASI

Ayten ÖZTÜRK*,

Niğde Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Niğde, TÜRKİYE

M.Lütfü ÇAKMAKÇI

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, TÜRKİYE

ÖZET

Bu çalışmada, böcek patojeni olduğu belirlenmiş 39 *Bacillus* izolatının *Bacillus thuringiensis* (B.t.) türüne ait olanları serolojik olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla üç adet B.t. serotipinin (*B.t. thuringiensis*, *B.t. kurstaki*, *B.t. tenebrionis*) flagellar antijeni hazırlanmış ve hazırlanan antijenlerdeki protein miktarları B.t. *thuringiensis* için 3,4 mg/100 L, *B.t. kurstaki* için 0,18 mg/100 L ve *B.t. tenebrionis* için 0,32 mg/100 L olarak tespit edilmiştir. Hazırlanan antijenler tavşanlara dört günde bir olmak üzere toplam beş kez damar içine enjekte edilmiştir. Son enjeksiyon işleminden 6 gün sonra tavşanlardan tüm kan toplanmış ve serumlardaki son antikor titre düzeyleri belirlenmiştir. Antikor titre düzeyleri sırasıyla; *B.t. thuringiensis* için 1/8192, *B.t. kurstaki* için 1/2048, *B.t. tenebrionis* için 1/6400 olarak bulunmuştur. Hazırlanan antiserumlar 39 adet *Bacillus* izolatının tanımlanmasında kullanılmıştır. Bu 39 izolatdan 16 adedi pozitif reaksiyon vermiş ve *Bacillus thuringiensis* türüne ait olduğu belirlenmiş, ancak 23 adedi ise hiç reaksiyon vermemiştir.

Anahtar Kelimeler: Bacillus sp., Bacillus thuringiensis, serolojik tanımlama

DETERMINATION OF SOME ENTOMOPATHOGEN BACILLUS ISOLATES BY SEROLOGICAL IDENTIFICATION

ABSTRACT

In this study, previously determined 39 entomopathogens *Bacillus* isolates, which belong to *Bacillus thuringiensis* (B.t.) species, were identified by serological approach. Thus, three B.t. serotypes (*B.t. thuringiensis*, *B.t. kurstaki*, *B.t. tenebrionis*) were used in order to prepare the flagellar (H) antigens, and the protein contents of H antigens were found to be 3,4 mg/100 L, 0,18 mg/100 L and 0,32 mg/100 L respectively. The H antigens of *B.t. serotypes* were injected intravenously to rabbits once every four days interval and they were bled 6 days after the last injection. Each blood sample was tested to determine the final H agglutinin titer level. These levels were 1/8192 for *B.t. thuringiensis*; 1/2048 for *B.t. kurstaki* and 1/6400 for *B.t. tenebrionis* respectively. In the identification of these 39 *Bacillus isolates*, antisera were used. 16 of these isolates gave positive reaction and were found to belong to B.

Key Words: Bacillus sp., Bacillus thuringiensis, serological identification

1.GİRİŞ

Çeşitli zararlı böcek türlerine etkili çok sayıda bakteri saptanmış, ancak bunlardan beş tür kimyasal mücadeleye alternatif olarak uygun bulunmuştur. Bunlar *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus larvae*'dir. Bunlar endospor oluşturan gram pozitif, sporlanma aşamasında entomopatojen toksin üretme özelliğinde bakterilerdir. Birbirlerinden ayırmaları için sporlanma özellikleri (Sporangiyum ve spor morfolojisi) ve biyokimyasal aktivitelerine bakılmaktadır. Bu tip çalışmalar uzun zaman aldığı için *serolojik* tanımlama çalışmalarına yönelinmiştir (1-4).

Spor üreten insektisidal özellikteki beş tür bakteri içerisinde böceklere en etkili iki tür *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus*'dur. *Bacillus sphaericus* çeşitli sivrisinek ve karasinek türlerine etkili olmasına karşın, *Bacillus thuringiensis* (B.t.) pek çok böcek türüne karşı etkili bulunmuştur. *Bacillus thuringiensis* türü içerisinde farklı böcek türlerine etkili pek çok suş bulunmuştur. Bu suşların etkili oldukları böcek türlerinin farklı olması ve farklı toksin üretmeleri nedeniyle değişik gruplandırmalar yapılmış ve ticari preparatları hazırlanmıştır (5-9).

B.thuringiensis' in insektisidal aktiviteye sahip bazı toksinleri *Lepidoptera*, *Diptera*: *Nematocea*, *Coleoptera*: *Chrysomelidae* ve *Neuroptera* üyelerine karşı kullanılmaktadır. *B.thuringiensis*' in kullanım alanı bulmuş olan en önemli toksini, *Lepidopter* ve Dipter larvaları üzerinde insektisidal aktiviteye sahip olan, glikoprotein yapısında parasporal kristal bir protoksidir. Bu protoksin, larvaların sindirim sistemlerindeki, alkali pH'da meydana gelen enzimatik aktivite sonucunda aktif toksin formuna dönüşmekte ve insektisidal etkisini gösterebilmektedir (4, 9,11).

B.thuringiensis' in flagellar proteinlerinin antijenik özelliklerine dayanılarak yapılan serolojik sınıflandırmalar ilk kez De Barjac ve Bonnefoi (1962) tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda *B.thuringiensis* serotiplerine yenileri dahil edilmiş ve daha önce H antijenlerine göre yapılmış olan sınıflandırma yeniden düzenlenmiştir (2, 3, 12-15).

Bu çalışmada da, *Bacillus thuringiensis*'in bazı serotipleri kullanılarak flagellar antijenlerine göre *Bacillus thuringiensis* türüne ait suşlar belirlenmeye çalışılmıştır

2. MATERYAL VE METOT

Çalışmada antiserum üretimi için üç adet *B.thuringiensis* serotipi (B.t. thuringiensis, B.t. tenebrionis, B.t. kurstaki) kullanılmıştır. Bunlardan *B.t.thuringiensis* T01001, *B.t. kurstaki* T03A001 ve çapraz reaksiyonların varlığını ortaya çıkarmakta kullanılan 15 adet B.t. serotipi Pasteur Enstitüsü'nden temin edilmiştir. *B.t. tenebrionis* ise Novo firmasının ticari preparatından izole edilmiştir. Daha önceki araştırmada böcek patojeni *Bacillus* türleri olarak tanımlanmış 39 adet suş ise TARMİK 6 no'lu projeden temin edilmiştir (16). Pasteur Enstitüsü'nden temin edilen diğer 15 serotip sırasıyla; *B.t.darmstadiensis* T10001, *B.t.nigeriensis* T08B001, *B.t. canadensis* T05A001, *B.t. aizawai* T07001, *B.t. tolworthi* T09001, *B.t. finitimus* T02001, *B.t. kenyae* T04B001, *B.t. galleria* T05001, *B.t. sotto* T04001, *B.t. entomocidus* T06A001, *B.t. toumanoffi* T11011, *B.t. thompsoni* T12001, *B.t. subtoxicus* T06001, *B.t. kyushuensis* T11A001 ve *B.t. israelensis* T14001'dir.

2.1. Antijeninin Hazırlanması

Peritriş flagellalı *B. thuringiensis*, flagellar antijeninin hazırlanması için uygun bir bakteri olmakla birlikte, gelişmiş flagella sayısının artırılması gerekmektedir. Bunun için, Craigie'in yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (17). Bu yöntemde, bakteri serotipleri yumuşak agar içeren, 17 mm çapında, 15 cm uzunluğundaki cam tüp içerisine 5 mm çapında, 9 cm uzunluğunda ince cam tüp yerleştirilerek oluşturulmuş olan Craige tüplerine aktarılmış ve bakterilerdeki flagella miktarlarının artırılmasına çalışılmıştır (12). Kullanılan yumuşak agar besiyeri, 8,0 g nutrient broth (Oxoid), 1,5 g *bacteriological* agar (Oxoid), 1000 mL damıtık su içermektedir. Ayrıca flagella gelişme hızının saptanmasında indikatör olarak besiyerine, sterilizasyon öncesinde 1/50 (V/V) oranında sulandırılmış metilen mavisi ilave edilmiştir.

İnokülasyon işleminde her bir bakteri serotipi için iki paralel olmak üzere 6 tane Craige tüpü kullanılmıştır. Nutrient broth'da geliştirilen bakteriler Craige tüplerine aktarılmıştır. Her inokülasyon Craige tüplerinin içinde yer alan ince cam tüp içerisine 100 l olarak gerçekleştirilmiştir. Craige tüplerine yapılan bu aktarma işlemi 15-20 gün boyunca tekrarlanmıştır. Tüpler 37°C'lik etüvde 18 saat süreyle inkübe edilmiştir (18).

Bakteri suşlarının saatteki ilerleme hızı mm olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu tüplere inoküle edilen bakteri miktarı yapılan kültürel sayımla saptanmış ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır. *Craige* tüplerine aktararak, maksimum gelişme hızına eriştirilen suşların kültürlerinden 1 ml alınıp 100 mL nutrient broth (Oxoid) içeren bir litrelik Roux şişelerine ilave edilmiş ve 30°C' da 18-24 saat süreyle inkübasyonda bırakılmıştır (15). Bu işlem 2 gün arka arkaya 2 kez tekrarlanmıştır. Roux şişelerinde geliştirilen kültürler 6000 rpm' de 20 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Besiyerinden ayrılan pelet 2 kez serum fizyolojik ile yıkanmış ve vejetatif hücreleri öldürmek için formaldehit ile muamele edilmiştir (12). Bunun için hazırlanan süspansiyona % 1,0 (V/V) oranında formaldehit ilave edilip, 1 saat süreyle 37°C' lik inkübatörde bırakılmıştır. Hazırlanan bu antijenler immünizasyon veya titrasyon uygulamalarında kullanılmak üzere -20°C'da saklanmıştır. Formaldehid ilave edilmeden önce, biüret yöntemiyle antijen olarak hazırlanan bakteri süspansiyonlarındaki protein miktarları da belirlenmiştir (19).

TARMİK 6 no'lu proje kapsamında izole edilen 39 adet *Bacillus* suşunun Flagellar (H) antijenleri de aynı şekilde hazırlanmıştır.

2.2. Antiserumun Hazırlanması

İmmünizasyon uygulamalarında her bir bakteri için birer tavşan olmak üzere üç adet üç aylık albino erkek tavşan kullanılmıştır. Enjeksiyonlar kulaktan damar içine yapılmıştır (Çizelge 1) (20). Hazırlanan ve protein içerikleri belirlenen antijenler verilmeden önce her bir tavşandan 0,5-1,0 mL kan alınıp serumdaki antikor titre düzeyi belirlenmiştir. Tavşanlardan alınan kan oda sıcaklığında 30 dakika -1,0 saat süreyle bekletilmiştir. Pıhtılaşan kan 4000 g'da 15-20 dakika süreyle santrifüj edilerek kanın serumundan ayrılması sağlanmıştır. Titrasyon işleminin hemen yapılmadığı durumlarda serumlar -20°C'da saklanmıştır. Kan serumundaki titre düzeyleri mikroaglutinasyon test tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Mikroaglutinasyon tekniği klasik aglutinasyon testinin titre plaklarına uygulanması şeklinde gerçekleştirilmektedir.

Çizelge 1. Enjeksiyon uygulamaları ve titrelerin belirlendiği günler

İşlem	Miktar	Günler
Titre tayini	-	0 gün
Birinci enjeksiyon	1 mL	0. gün
Titre tayini	-	4. gün
İkinci enjeksiyon	1,5 mL	4. gün
Titre tayini	-	8. gün
Üçüncü enjeksiyon	1,5 mL	8. gün
Titre tayini	-	12. gün
Dördüncü enjeksiyon	2 mL	12. gün
Titre tayini	-	16. gün
Beşinci enjeksiyon	2 mL	16. gün
Tavşanların disseksiyonu		22. gün
Titre tayini		22. gün

22. günde tavşanların tüm kanı toplanmış ve serumları ayrılıp, steril bir tüpe alınmıştır. Bu şekilde hazırlanan antiserumların özgülüğünü arttırmak amacıyla antiserumlardan somatik antikorların uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla, antiserumları hazırlanan üç bakteri serotipi nutrient agar (Oxoid) besiyerinde 37°C'da 18 saat süreyle geliştirilmiş ve besiyerinden toplandıktan sonra, 2 saat

boyunca 100°C'da kaynatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan somatik antijenler 1/3 oranında serumlara ilave edilmiş ve bir saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 4000 g'de santrifüj edilerek somatik antijen-antikor kompleksinin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

2.3. Antiserumlarda Titre Düzeylerinin Belirlenmesi

Elde edilen antiserumlarda antikor titre düzeyleri mikroaglutinasyon yöntemiyle tespit edilmiştir. Mikroaglutinasyon kaplarının (titerplate) 2.-12. sütunlar antiserum sulandırılmaları için, alt yatay iki sütun ise antijen kontrolleri olarak kullanılmıştır. Antiserum sulandırılmaları 2. kuyucuktan başlayarak soldan sağa doğru 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/4096, 1/8192 olacak şekilde yapılmıştır. Bu şekilde hazırlanan mikroaglutinasyon kapları 50°C-52°C'lik su banyosunda 1,5-2,0 saat bekletilmiştir.

TÜBİTAK Tarımsal Mikrobiyoloji Ünitesi (TARMİK) 6 no'lu projeden temin edilen 39 adet *Bacillus* izolatu hazırlanan antiserumlarla tanımlanmaya çalışılmıştır.

3. BULGULAR

B.t.thuringiensis' den hazırlanan antijendeki protein miktarı diğerlerinden daha fazla bulunmuştur. Bu durum immünizasyonda ulaşılan titre düzeyleri açısından da farklılık göstermiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. B.t. serotiplerinden hazırlanan antijenlerdeki protein miktarları ve elde edilen antiserumlarda ulaşılan titre düzeyleri

Serotip	Antijendeki protein miktarı (mg/100 µL)	Antiserumlarındaki son titre düzeyleri
<i>B.t.thuringiensis</i>	3,4	1/8192
<i>B.t.kurstaki</i>	0,18	1/2048
<i>B.t.tenebrionis</i>	0,32	1/6400

Elde edilen üç antiserumla 39 adet bakteri izolatının identifikasyonları gerçekleştirilmiş olup, aynı zamanda Pasteur Enstitüsü'nden temin edilmiş serotiplerin bu antiserumlarla çapraz reaksiyon verip verilmediğine bakılmıştır (Çizelge 3).

Çizelge 3. Hazırlanan antiserumlarla çapraz reaksiyon veren *Bacillus thuringiensis* (B.t) serotipleri

<i>B.t.thuringiensis</i> Antiserumuyla Çapraz Reaksiyon Veren B.t. Serotipleri	
<i>B.t.kurstaki</i>	z
<i>B.t.thompsoni</i>	+
<i>B.t.kurstaki</i> Antiserumuyla Çapraz Reaksiyon Veren B.t. Serotipleri	
<i>B.t.thuringiensis</i>	+
<i>B.t.galleria</i>	+
<i>B.t.tenebrionis</i> Antiserumuyla Çapraz Reaksiyon Veren B.t. Serotipleri	
<i>B.t.sotto</i>	+
<i>B.t.kyushuensis</i>	+
<i>B.t.aizawai</i>	+
<i>B.t.galleria</i>	+

Yukarıda belirtilen reaksiyon sonuçları göz önüne alınarak TARMİK 6 no'lu proje kapsamında izolasyonları yapılmış olan *Bacillus* izolatlarının *Bacillus thuringiensis* türüne ait olanları belirlenmeye çalışılmıştır (Çizelge 4).

Çizelge 4. *Bacillus* izolatlarının hazırlanan antiserumlarla verdikleri reaksiyon sonuçları

<i>Bacillus</i> izolatları	<i>B.t. thuringiensis</i> antiserumu	<i>B.t. tenebrionis</i> antiserumu	<i>B.t. kurstaki</i> antiserumu
2	+	-	-
49	+	-	-
81	+	-	+
81*	+	-	-
84	-	-	+
89	-	-	-
102	-	-	Z
108	-	-	-
135	-	-	-
166	+	-	-
216	-	Z	-
252	+	-	-
266	+	-	-
278	-	-	-
285	-	Z	Z
306	-	-	-
308	-	-	-
318	-	-	-
319	-	-	-
324	-	-	-
342	-	-	-
344	-	-	-
349	-	-	-
352	-	-	-
353	-	-	-
363	-	+	-
366	-	-	-
367	-	-	-
368	-	+	-
396	-	-	+
404	-	-	-
420	-	-	+
435	+	-	-
461	-	-	-
463	-	-	-
474	-	-	-
484	-	-	-
487	-	-	-
511	-	-	-

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Hazırlanan antiserumlarla Pasteur Enstitüsü'nden temin edilen 15 adet *B.thuringiensis* serotipi arasında çapraz reaksiyonun mevcut olup olmadığına bakılmıştır. Çizelge 2' de görüldüğü gibi *B.t. thuringiensis* ve *B.t. kurstaki* arasında çapraz reaksiyonun varlığı ortaya çıkarılmıştır. *B.t. galleria*

hem *B.t. kurstaki* antiserumu ile hem de *B.t. tenebrionis* antiserumu ile çapraz reaksiyon vermiştir. Çapraz reaksiyonlar, iki veya daha fazla bakteri arasında ortak H antijenlerinin varlığını düşündürmektedir. *B.t. tenebrionis* antiserumu ile çapraz reaksiyon veren *B.t. sotto*, *B.t. kyushuensis*, *B.t. aizawai* için de aynı durum söz konusudur.

Çalışmada sferik sporlarıyla tipik olan *Bacillus sphaericus*'a ait olduğu belirlenen 89, 461, 463, 474, 484, 487, 511, no'lu suşların hazırlanan antiserumlardan hiçbirisiyle reaksiyon vermemesi ve antiserumlardaki somatik O antijenlerinin uzaklaştırılması türler arası çapraz reaksiyon şansını yok etmiştir.

108, 135, 278, 306, 308, 318, 319, 324, 342, 344, 349, 352, 353, 366, 367 ve 404 no'lu izolatlar hiçbir antiserumla reaksiyon vermemiştir. *B.t. thuringiensis* antiserumuyla reaksiyon veren 2, 49, 81, 81*, 166, 252, 266 ve 435 no'lu izolatların biyokimyasal tiplendirmede sınıflandırılmamalarına karşın serolojik açıdan *B.t. thuringiensis* olarak belirlenmesi mümkün olmuştur. *B.t. tenebrionis* antiserumuyla reaksiyon veren 216, 285, 363 ve 368 no'lu izolatların serotipleri çapraz reaksiyon vermeleri nedeniyle tam olarak belirlenmemiştir. *B.t. tenebrionis* olabileceği gibi serotip H 5a 5b (*B.t. galleria*), H 6 (*B.t. entomocidus*), H 9 (*B.t. tolworthi*), H 11a 11c (*B.t. kyushuensis*) ve H 14 (*B.t. israelensis*) serotiplerine ait olabileceği görülmektedir. Diğer taraftan 84, 102, 396 ve 420 no'lu izolatlar *B.t. kurstaki* antiserumu ile reaksiyona vermiştir. Ancak bu antiserum *B.t. thuringiensis* ve *B.t. galleria* ile çapraz reaksiyona girmiştir.

Sonuç olarak *Bacillus thuringiensis* serotiplerinden hazırlanan flagellar antijenlere karşı hazırlanan antiserumlar *Bacillus* izolatlarından bu türe ait olanların teşhisinde başarıyla kullanılmış, ancak serotip düzeyinde belirlenmeleri serotipler arası çapraz reaksiyonlardan dolayı mümkün olmamıştır. Bunun monoklonal antikor tekniği ile mümkün olabileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi sırasında maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Gönül Çetinkaya Dönmez'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. De Barjac, H., "Insect pathogens in the genus *Bacillus*" *Academic Press*, no: 241-50 (1981).
2. Lysenko, O. "Non-sporeforming bacteria pathogenic to insects: incidence and mechanisms" *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 673-95 (1985).
3. De Barjac, H. and Frachon, E. "Classification of *Bacillus thuringiensis* strains" *Entomophaga*, 35(2): 233-240 (1990).
4. Çetinkaya, G. ve Çakmakçı, M.L. "Toprak ve ölü larvalardan izole edilen *Bacillus thuringiensis* izolatlarının patojenitesinin araştırılması" *Tr. J. Agriculture and Forestry*, 20: 63-65 (1996).
5. Fast, P.G., "The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: microbial control of pests and plant diseases" H.D. Burges (ed.), *Academic Press*, 223-248, London (1981).
6. Bağcı, H. ve Kence, A., "Değişik karasinek soylarına *Bacillus thuringiensis*'in farklı etkisi" *Doğa Bilim Dergisi*, A2: 139-46 (1985).
7. Lacey, L.A. and Undeen, A.H. "Microbial control of blackflies and mosquitoes" *Ann. Rev. Entomol.*, 31: 265-296 (1986).
8. Porter, A.G., Davidson, E.W. and Liu, J. "Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes", *Microbiol. Rev.*, 57(14): 838-61 (1993).
9. Hilbeck, A., Moar, W.J., Putsztai-Carey, M., et al. "Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysperla*" *Environ. Entomol.* 27(5): 1255-1263 (1998).
10. Çakmakçı, L., Boşgelmez, A., Gürkan, B., vd., "*Bacillus thuringiensis*' in üretim olanakları ve tarımda önemli zararlılara neden olan bazı Lepidopter türlerine karşı etkinliklerinin saptanması üzerine araştırmalar" *Doğa Türk Tarım Ormanlık Dergisi*, 11(1): 94-104 (1987).
11. Cideria, D., Cappai, A., Vallasi, A. et al., "A novel strain of *Bacillus thuringiensis* (NCMB 40152) active against coleopteran insects," *FEMS Microbiol. Ls.*, 81(2): 129-134 (1991).

12. De Barjac, H. And Bonnefoi, "A.Essai de classification biochimique et serologicque de 24 souches de *Bacillus du type Bacillus thuringiensis*", *Entomophaga*, 7: 5-31 (1962).
13. Ohba, M., Aizawa, K. "Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan" *J. Inverteb. Pathol.*, 32: 303-309 (1978).
14. Ohba, M., Aizawa, K. "*Bacillus thuringiensis* subsp. japonensis (flagellar serotype 23): A new subspecies of *B. thuringiensis* with a novel flagellar antigen" *J. Inverteb. Pathol.*, 48: 129-130 (1986).
15. Ohba, M., Aizawa, K. "New flagellar (H) antigenic subfactors in *Bacillus thuringiensis* H serotype 3 with description of two new subspecies, *B. thuringiensis* subsp. sumiyoshiensis (H serotype 3a: 3b) and *B. thuringiensis* subsp. fukuokaensis (H serotype 3a: 3d: 3e)" *J. Inverteb. Pathol.*, 54: 208-212 (1989).
16. Çakmakçı, L., Boşgelmez, A., Gürkan, B. vd., "Çeşitli kaynaklardan *Bacillus thuringiensis* serotip H14, *B.sphaericus*, *B.thuringiensis* izolasyonu ve bunların karasinek ve sivrisinek larvalarına karşı etkinliklerinin saptanması üzerinde araştırmalar" *Tübitak TARMİK*, (6) (1988).
17. Craige, J. "Studies on the serological reactions of *Bacillus typhosus*", *J. Immun.* 21(6): 417-511, (1931).
18. Ohba, M. and Aizawa, K., "Distribution of the four flagellar (H) antigenic subserotypes of *Bacillus thuringiensis* H serotype 3 in Japan" *J. Appl. Bacteriol.*, 67: 505-509 (1989).
19. Robyt, J.F., White, B.J., "Biochemical techniques theory and practice". Belmont, California, *Brooks/Cole Publishing Company*, 407 (1987).
20. Ohba, M. Yu, Y.M. and Aizawa, K., "Occurrence of non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* flagellar serotype 14 in the soil of Japan", *System. Appl. Microbiol.*, 11: 85-89 (1988).

Geliş Tarihi:24.04.2001

Kabul Tarihi:07.01.2003

