

Hastalık Taşıyıcısı *Culex pipiens* (Diptera:Culicidae)' in Biyolojik Mücadelesinde Yerel *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Kullanılabilir Potansiyelinin Araştırılması

Uğur AZİZOĞLU¹

ÖZET: *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Batı Nil Virüs'ünün başlıca vektörüdür. Kimyasal pestisit kullanımının ve *C. pipiens* kaynaklı hastalıkların azaltılması için entomopatojen bakteri *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) ürünleri yıllardır etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, 14 farklı yerel *Bt* izolatının *C. pipiens* larvaları üzerindeki biyolojik mücadele potansiyeli araştırılmıştır. Dipteran spesifik *cry* gen taşıyan 14 farklı *Bt* izolatının spor-kristal protein karışımı (500 µg ml⁻¹) *C. pipiens*'in son dönem larvalarına uygulanmıştır. Uygulanan izolatlar arasında *Bt* SY50.4'ün spor-kristal protein karışımı % 80 larval ölümüne sebep olmuştur. *Bt* SY56.3 izolatı, *Bt* SY50.4 kadar etkili olmasa da kontrolden daha fazla ölüm oranına sebep olmuştur. Diğer izolatlar *C. pipiens* larvaları üzerinde önemli bir etki göstermemiştir. *Bt* SY50.4 izolatının *C. pipiens* üzerindeki etkinliği göz önüne alındığında biyolojik mücadele açısından gelecek vaat ettiği belirlenmiştir. Uygulama sonrası yaşayan larvaların pupalaşma ve erginleşme süreçleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, biyolojik mücadele, *Culex pipiens*, hayat döngüsü

Investigation of Potential Usability of Native *Bacillus thuringiensis* Isolates in Biological Control of Disease Vector, *Culex pipiens* (Diptera:Culicidae)

ABSTRACT: *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) is primary vector of West Nile virus. Products of entomopathogen bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) has effectively been used for decades for decreasing the chemical input into the environment and *C. pipiens* mediated diseases. In the current study, biocontrol potential of 14 different native *Bt* isolates was investigated on *C. pipiens* larvae. Last instar larvae of *C. pipiens* were subjected to spore-crystal protein mixture (500 µg ml⁻¹) of 14 different *Bt* isolates carrying dipteran active *cry* genes. Of all the tested isolates, the products of *Bt* SY50.4 caused 80% mortality on the larvae. Although *Bt* SY56.3 showed lower insecticidal effect than that of *Bt* SY50.4, the activity of this isolate was higher than control. The other tested isolates didn't show significant mortality on larvae of the *C. pipiens*. *Bt* SY50.4 was determined as promising an isolate based on the effectiveness on the *C. pipiens* larvae. Pupation and adult emergence periods of remaining larvae after treatment were not significantly different when compared with the control.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, biological control, *Culex pipiens*, life cycle

¹ Erciyes Üniversitesi, Tomarza Mustafa Akıncıoğlu MYO, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Kayseri, Türkiye
Sorumlu yazar/Corresponding Author: Uğur Azizoglu, azizogluugur@hotmail.com

GİRİŞ

Sivrisinekler Sıtma, Sarıhumma, Dengue, Batı Nil'i, Filariasis gibi enfeksiyonlara sebep olan patojenlerin taşıyıcısıdır (Jensen and Mehlhorn, 2009; Mehlhorn, 2011; Caminade et al., 2012; Benelli et al., 2014). Ev sivrisineği, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) bu hastalık taşıyıcı vektörler arasında en iyi bilinen türdür. *C. pipiens* ilk kez Batı Nil'de ortaya çıkmış olan Batı Nil Virüs'ünün başlıca taşıyıcısı olup, bu virüs Antartika hariç dünyanın hemen hemen her yerine yayılmıştır. (Zeller and Schuffenecker, 2004; Reisen, 2013; Kioulos et al., 2014). *C. pipiens* mücadelesinde özellikle organofosfat temelli kimyasallar ve böcek büyüme inhibitörleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat bu kimyasalların çevre ve insan sağlığı üzerindeki yan etkisi ve zararlıların uzun vade de bu kimyasallara karşı direnç geliştirmesi gibi kaygıları da beraberinde getirmektedir (Sun et al., 2011; Azizoğlu ve ark., 2012; Azizoğlu, 2014; Benelli et al., 2014; Lees et al., 2014). Bu kaygılardan dolayı doğal ortamla daha uyumlu, insan ve çevre sağlığı açısından daha güvenli mücadele tekniklerinin geliştirilmesi her geçen gün daha da önem kazanmaktadır. Bu bakımdan kimyasal mücadeleye alternatif birçok yöntem geliştirilmekte ve bunların optimizasyonuna yönelik ciddi gayretler sarf edilmektedir (Azizoğlu ve ark., 2012). Alternatif mücadele yöntemlerinden biri olan mikrobiyal temelli biyoinsektisitler tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan ve üzerinde en çok araştırma yapılan mikrobiyal temelli biyoinsektisit *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)'dir (Danısmazoglu et al., 2012; Sevim et al., 2012; Eski et al., 2015). *Bt* gram pozitif, sporlanabilen ve birçok zararlı böcek takımı üzerinde patojenite gösteren bir toprak bakterisidir. *Bt*'in entomopatojenik aktivitesi, genomik DNA'sı ve plazmitleri üzerinde taşıdığı *cry*, *cyt* ve *vip* genlerinin sporlanma esnasında oluşturduğu Cry, Cyt ve Vip proteinlerinden kaynaklanmaktadır (Sanahuja et al., 2011).

İnsektisidal kristal proteinler (ICP) olarak da bilinen Cry proteinler birçok zararlı böcek takımı üzerinde etki göstermektedir. Bugüne kadar *Bt*'nin 700 *cry* geninin dizisi çıkarılmış ve aminoasit benzerliklerine göre 72

farklı Cry proteini (Cry1, Cry2,...Cry72) belirlenmiştir. (Shu et al., 2013). Her bir Cry protein grubu, % 40'dan daha az aminoasit benzerliğine sahiptir. Aynı protein grubu içinde yer alan ve büyük harflerle belirtilen gruplar (Cry1A, Cry1B vb.) en az % 70 aminoasit benzerliği göstermektedir. Küçük harfle belirtilen gruplar ise (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ab vb.) % 70'den fazla ancak % 95'den daha az amino asit benzerliği göstermektedir (Shu et al., 2013). Cry2, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry4B, Cry4C, Cry4D, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19, Cry21, Cry24, Cyt1 ve Cyt2 grubu proteinler Diptera takımı üzerinde etki göstermektedir (Salehi Jouzani et al., 2008). Üzerinde en çok çalışılan Cry protein grupları ise Cry2, Cry4 ve Cry11'dir. Bu çalışmada ülkemizin Doğu Akdeniz bölgesinden 2008 yılında izole edilmiş, *cry* gen profilleri ve Lepidoptera takımı üzerindeki etkinlikleri daha önceki çalışmalarla belirlenmiş ve *cry2A*, *cry4A* ve *cry11A/B* geni taşıyan 14 farklı yerel *Bacillus thuringiensis* izolatu kullanılmıştır. Bu izolatların önemli bir hastalık vektörü olan *Culex pipiens* 'in son dönem larvaları üzerindeki toksisitesi ve hayat döngüsü üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Stok İzolatların Aktifleştirilmesi

Lepidoptera takımı üzerindeki insektisidal aktivitesi önceki çalışmalarla (Yılmaz, 2010) belirlenmiş olan 14 farklı yerel *Bacillus thuringiensis* izolatının -80 °C'de saklanan stok kültürleri çoğaltma işlemi yapılmak üzere çözünmeye bırakılmıştır. Çözünme işlemi yapılırken ependorf tüplerde saklanan kültürler önce -20 °C'ye alınmış bir süre burada tutulduktan sonra 4 °C'de bekletilmiştir. Çözünme işlemi gerçekleştirildikten sonra stok kültürler oda sıcaklığına alınmıştır. Oda sıcaklığında bulunan stok kültürlerden yaklaşık 100 µl alınarak sıvı LB (10 g L⁻¹ triptone, 5 g L⁻¹ yeast extract, 5 g L⁻¹ NaCl) besi yerine ekilmiştir. Ekim işlemi yapılan besi yeri 30 °C'de 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besi yerinde bir gece çoğalan bakteri kültürlerinden 10 µl alınarak LB agar (10 g L⁻¹ triptone, 5 g L⁻¹ yeast extract, 5 g L⁻¹ NaCl, 20 g L⁻¹ agar) besi yerine ekilmiş ve bir gece 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Spor-kristal Proteinlerin Hazırlanması

Aktifleştirilen 14 izolat 100 ml'lik sıvı sporlandırma besi yeri olan T3 (3 g L⁻¹ triptone, 2 g L⁻¹ triptose, 1.5 g L⁻¹ yeast extract, 0.005 g L⁻¹ MnCl₂, 6 g L⁻¹ NaH₂PO₄, 7.1 g L⁻¹ Na₂HPO₄) besi yerine ekilmiştir. Sürekli çalkalamalı inkübatörde 200 rpm'de 30° C de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 15000 rpm'de 20 dk. santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet (spor-kristal protein) 20 ml steril distile suda iki kez yıkanmış ve 15000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir (Travers et al., 1987). Santrifüj edilerek çöktürülen spor-kristal protein karışımı -80°C' de dondurulduktan sonra özel tüplere yerleştirilerek vakum kapakları takılmış ve liyofilizatör cihazına (Labconco-Welch) yerleştirilmiştir. Pelletler -45 °C' de 3 saat boyunca vakumlanarak kurutulmuş ve toz fomülasyon haline getirilmiştir.

Culex pipiens Kültürü

C. pipiens larvaları Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK'ten temin edilerek Erciyes Üniversitesi Biyolojik Mücadele Laboratuvarında 27±1 °C, % 65±5 nispi nem ve 14:10 saatlik (gündüz: gece) fotoperiyotta kültüre alınmıştır (Azizoğlu U, 2014). Larva yetiştirme havuzuna alınan larvalar pul balık yemi ile beslenerek pupa evresine geçtikten sonra pupa havuzuna alınmış, 2-3 gün sonra ergin hale geçen *C. pipiens* ergin yetiştirme kafeslerine alınarak % 10'luk şekerli su ile beslenmiştir. Böylelikle kültürün devamlılığı sağlanmıştır.

Biyolojik Aktivite Denemesi

C. pipiens larvalarına 500 µg ml⁻¹ konsantrasyonda liyofilize edilmiş spor-kristal proteinler uygulanmıştır. Denemeler üç tekerrür halinde ve her bir tekerrürde 10 larva olacak şekilde yapılmıştır. 300 ml steril cam kavanozlar içerisine 25 ml steril musluk suyu olacak şekilde

yukarıda belirtilen dozda spor-kristal proteini karıştırılmıştır. Kontrol grubuna ise sadece steril musluk suyu konulmuştur. Uygulama yapılan larvalar günlük olarak pul balık yemi ile beslenmiş, 10 gün boyunca larva ölümleri kayıt kaydedilmiş ve ölen larvalar cam kavanozdan uzaklaştırılmıştır. Yaşayan larvaların pupalaşma ve erginleşme süreleri takip edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Denemelerden elde edilen veriler SPSS for Windows version 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanılarak varyans analizi (ANOVA)'ne tabi tutulmuştur.

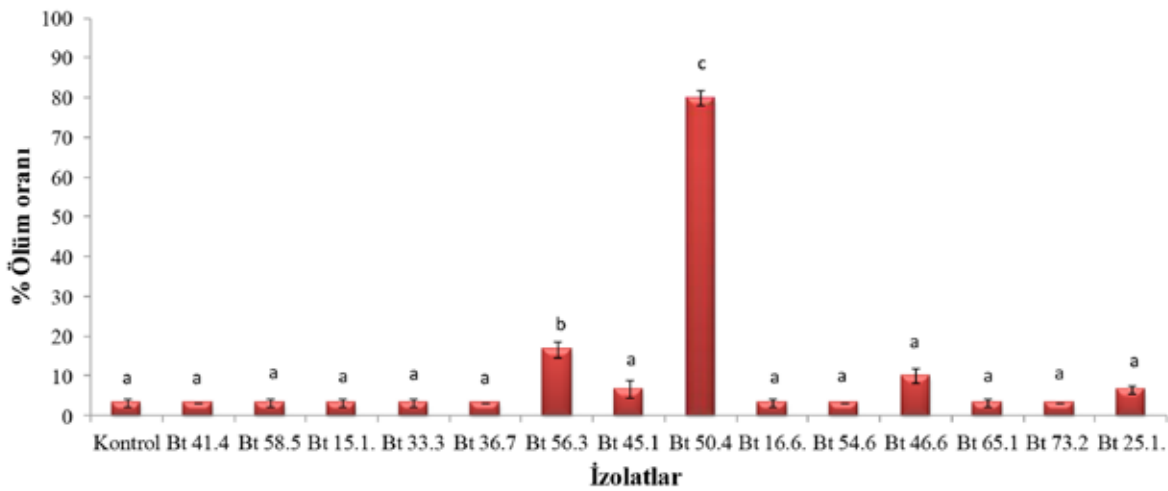
BULGULAR VE TARTIŞMA

Bacillus thuringiensis'in farklı suşları Diptera, Lepidoptera ve Coleoptera takımına ait zararlılara karşı sınırlı veya kapsamlı toksik etki göstermektedir (Sezen et al., 2007; Özkan Cakıcı et al., 2014). Bazı *Bt* suşlarının Nematod (Bone, 1989), Protozoa (Prieto-Samsonov, 1997) türleri ve Hymenoptera (Lacey and Goettel, 1995) takımındaki böceklere karşı da etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bazı suşları akar ve yassı solucan vb. canlılara karşı da etkili olmaktadır. Bu çalışmada entomopatojenik etkinliği test edilen yerel *Bt* izolatları, taşıdıkları genler ve bu genlerin oluşturdukları kristal (Cry) proteinler çizelge 1.'de gösterilmiştir. Bütün izolatların Diptera takımı üzerinde etkili *cry2A* genini taşıdığı belirlenmiştir. İzolatlar içerisinde *Bt* 16.6 *cry11A/B* genini, *Bt* 50.4 izolatı ise *cry4A* genini taşımaktadır. *cry4A* geni taşıyan *Bt* 50.4 izolatı % 80 oranında larval ölüme sebep olmuştur. *Bt* 56.3 izolatının ise % 20 ölüm oranında öldürücü etki gösterdiği belirlenmiştir (F= 4.917; df=14; P≤0.0001) (Şekil 1.). Diğer izolatların % ölüm oranları değerlendirildiğinde kontrolle aralarında istatistiksel açıdan önemli bir fark olmadığı görülmüştür.

Çizelge 1. *Bacillus thuringiensis* izolatlarının taşıdığı *cry* genleri ve bu genlerin ürettiği Cry proteinleri (Yılmaz, 2010)

İzolatlar	Lepidoptera aktif <i>cry</i> genleri	Kristal protein şekli	Diptera aktif <i>cry</i> genleri	Kristal protein şekli
Bt 15.1	<i>cry1Ab/Ac</i> ,	Bp	<i>cry2A</i>	Cb
Bt 16.6	<i>cry1C</i> , <i>cry1Aa/Ad</i> , <i>cry5</i> ,	Bp, Bp, Rm	<i>cry11A/B</i>	Cb
Bt 25.1	<i>cry1Aa/Ad</i> , <i>cry1Ab/Ac</i> , <i>cry1C</i>	Bp, Bp, Bp, Bp	<i>cry2A</i>	Cb
Bt 33.3	<i>cry1Ab/Ac</i> , <i>cry1Aa/Ad</i>	Bp, Bp	<i>cry2A</i>	Cb
Bt 36.7	<i>cry1Aa/Ad</i> , <i>cry9C</i>	Bp, IS	<i>cry2A</i> ,	Cb
Bt 41.4	<i>cry1Ab/Ac</i> , <i>cry1B</i>	Bp, Bp	<i>cry2A</i>	Cb
Bt 45.1	<i>cry9C</i> ,	IS	<i>cry2A</i>	Cb
Bt 46.6	<i>cry1Ab/Ac</i> , <i>cry1Aa/Ad</i> , , <i>cry5</i>	Bp, Bp, Sp	<i>cry2A</i>	Cb
Bt 50.4	<i>cry1Ab/Ac</i>	Bp	<i>cry4A</i>	Cb
Bt 54.6	<i>cry1Aa/Ad</i>	Bp	<i>cry2A</i>	Cb
Bt 56.3	<i>cry1Aa/Ad</i> , <i>cry1C</i> , <i>cry3</i> , <i>cry7</i> , <i>cry8</i>	Bp, Bp, Sp, Sp, Sp	<i>cry2A</i>	Cb
Bt 58.5	<i>cry1Ab/Ac</i> , <i>cry1Aa/Ad</i>	Bp, Bp	<i>cry2A</i>	Cb
Bt 65.1	<i>cry1C</i> , <i>cry1Ab/Ac</i>	Bp, Bp	<i>cry2A</i>	Cb
Bt 73.2	<i>cry1Ac</i> , <i>cry1Aa/Ad</i> , <i>cry1B</i> , <i>cry5</i>	Bp, Bp, Bp, Rm	<i>cry2A</i>	Cb

Bp, Bipyramidal; Cb, cuboidal; IS, Irregular Shape; Rm, Rhomboidal; Sp, Spherical



Şekil 1. *Bacillus thuringiensis* izolatlarının spor-kristal proteinlerin ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) *C. pipiens* larvaları üzerindeki % ölüm oranları

Gobatto et al. (2010) yaptığı çalışma sonucu topraktan ve böceklerden izole ettiği 35 yerel *Bt* izolatının *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) üzerinde farklı seviyelerde patojenite gösterdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar 100 ml klorsuz su içerisinde $200 \mu\text{l } 3 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ *Bt* sporunu üçüncü dönem *C. quinquefasciatus* larvalarına uygulamışlardır. Toprakten izole ettikleri izolatlardan sadece bir tanesinin yüksek, (%100) diğer izolatla-

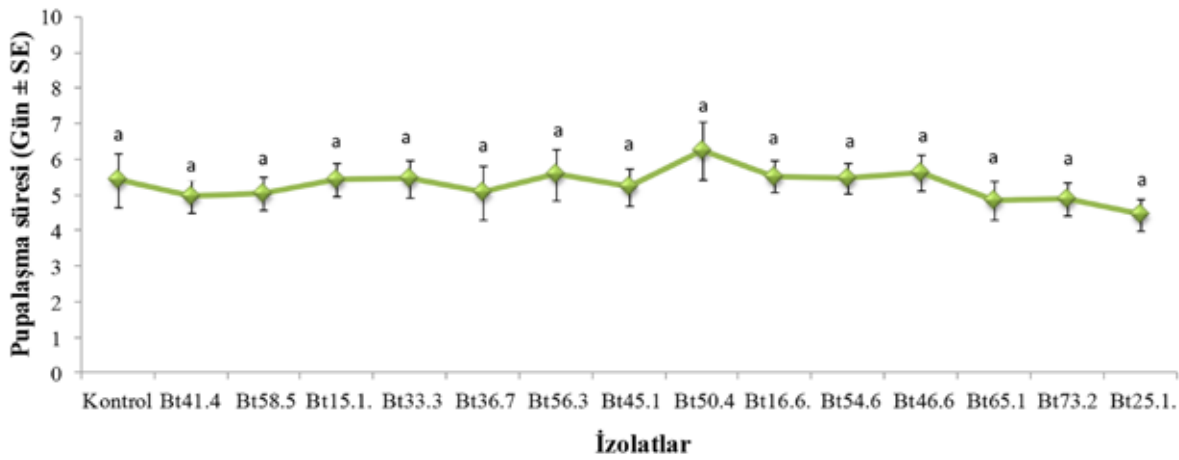
rın ise düşük seviyede (%30-2) patojenite gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da benzer bir şekilde izolatlardan bir tanesi (*Bt 50.4*) *C. pipiens* larvaları üzerinde yüksek öldürücü etki göstermişken diğer izolatlar ise düşük öldürücü etki göstermiştir.

Foda et al. (2010) tarafından yapılan çalışmada da benzer bir sonuç ortaya çıkmış ve 68 *Bt* izolatından sadece bir izolatın *C. pipiens* larvalarına karşı

etkili olduğunu belirlenmiştir. Cry proteinlerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar daha çok Lepidopter takımına ait zararlılar üzerinde yoğunlaşmıştır (Bravo et al., 2007; Azizoglu et al., 2016). Ancak Diptera takımına ait zararlılar üzerinde etki gösteren yeni *Bt* izolatlarının keşfi ve etkinliği ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Dipterler üzerinde etki gösteren *Bt* izolatlarına diğer böcek takımları üzerinde etki gösteren izolatlarla göre daha az sıklıkta rastlanıldığından bu izolatlar değerli olarak kabul edilmektedir (Bravo

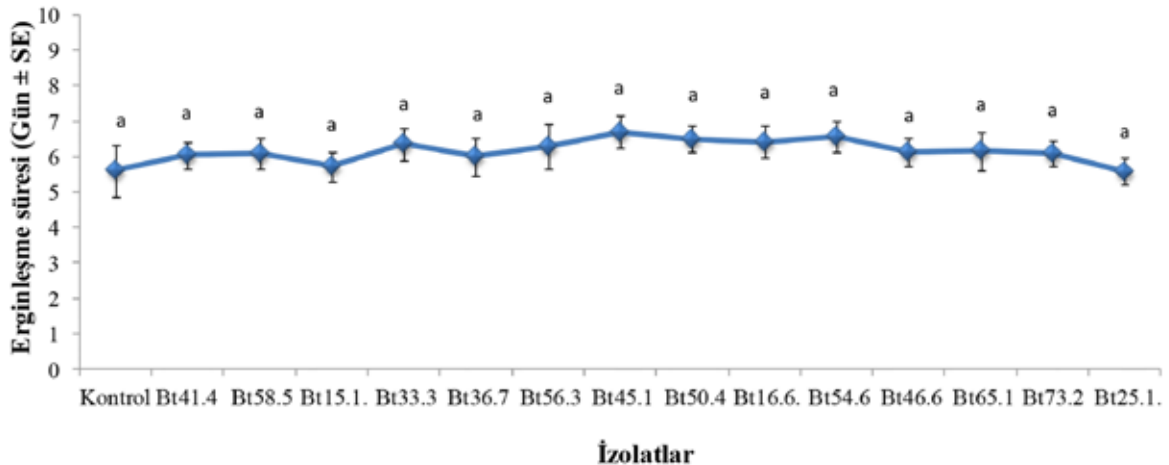
et al., 1998). Spor-kristal protein karışımları uygulandıktan sonra yaşayan larvaların pupalaşma süreleri incelendiğinde *Bt* 50.4 izolatının pupalaşma süresinin kontrole ve diğer izolatlarla göre daha uzun sürdüğü belirlenmiştir. *Bt* 50.4 izolatı uygulanan son dönem larvaların ortalama 6.2 günde pupaya geçtiği kontrol grubunun ise ortalama 5.4 günde pupaya geçtiği hesaplanmıştır (Şekil 2.). İzolatlar ve kontrol grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark belirlenmemiştir. ($F= 0.224$; $df=14$; $P=0.998$).



Şekil 2. *Bacillus thuringiensis* izolatlarının spor-kristal proteinlerinin ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) *C. pipiens*'in pupalaşma süresi üzerindeki etkisi

Benzer bir sonuç Aïssaoui et al. (2014) tarafından yapılan çalışma sonucunda da belirlenmiş ve *Bt* formülasyonu Vectobac G'nin *C. pipiens*son dönem larvalarının pupalaşma süresini etkilediğini ancak bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını görmüştür. Aynı araştırmacılar pupadan ergine

geçme (erginleşme) süresi üzerinde de anlamlı bir etkinin olmadığını ancak ergine geçen bireylerin ömür uzunluğunda önemli oranda azalma olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da erginleşme süresi üzerinde önemli bir etki görülmemiştir ($F= 0.493$; $df=14$; $P=0.919$) (Şekil 3.)



Şekil 3. *Bacillus thuringiensis* izolatlarının spor-kristal proteinlerinin ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$) *C. pipiens*'in erginleşme süresi üzerindeki etkisi

SONUÇ

Hastalık taşıyıcısı ve tarım zararlısı böceklerle mücadelede yeni mikrobiyal mücadele etmenlerinin keşfi ve var olan entomopatojen biyo-insektisitlerin kullanımlarının yaygınlaştırılması büyük önem arz etmektedir. *Bt* ürünleri biyolojik mücadelede amacıyla yaygın olarak kullanılmasına rağmen gelişmiş ülkelerle karşılaştırıldığında ülkemizdeki kullanımı sınırlıdır. Ancak son zamanlarda ülkemizde de birçok araştırmacı *Bt* ürünlerine yönelik kapsamlı çalışmalar yürütmektedir. Bu çalışmadan elde edilen ön veriler ışığında hastalık taşıyıcısı *C. pipiens* kontrolünde umut vaat eden bir izolatın (*Bt* 50.4) belirlenmiş olması oldukça önemlidir. Ancak bu izolatla ilgili moleküler ve biyokimyasal çalışmaların yapılması, patojenitesinin artırılması, diğer Diptera takımı zararlıları üzerindeki etkinliğinin araştırılması, toksin (Cry protein) konsantrasyonlarının optimizasyonu gibi daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak, ülkemize ait yerel ve etkili izolatların keşfi, etkinliklerinin belirlenmesi ve bu izolatlardan çevre dostu biyo-insektisitlerin geliştirilmesi ülkemiz açısından önem arz etmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullanılan izolatların temini için Doç Dr. Semih YILMAZ'a ve Prof Dr. Abdurrahman AYVAZ'a teşekkür ederim. *Culex pipiens* kültürünün yetiştirilmesindeki yardımlarından dolayı Zehra ATCIYURT'a ve Enfal ÇÖMLEKÇİ'ye teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Azizoglu U, Ayvaz A, Yılmaz S, Temizgul, R, 2016. The synergic and antagonistic activity of Cry1Ab and Cry2Aa proteins against lepidopteran pests. *Journal of Applied Entomology*, 140: 223–227.
- Azizoğlu U, Bulut S, Yılmaz S, 2012. Organik tarımda biyolojik mücadele; Entomopatojen biyo-insektisitler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 28: 375–381.
- Azizoğlu U, 2014. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 suşuna ait *cry1* ve *cry2* genlerinin klonlanması, ifadesi ve böcek öldürücü etkilerinin belirlenmesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji, Doktora Tezi*, 157s.
- Benelli G, Bedini S, Flamini G, Cosci F, Cioni PL, Amira S, Benchikh F, Laouer H, Giuseppe GD, Conti B, 2014. Mediterranean essential oils as effective weapons against the West Nile vector *Culex pipiens* and the Echinostoma intermediate host *Physella acuta*: what happens around? An acute toxicity survey on non-target mayflies. *Parasitology Research*, 114: 1011–1021.
- Bone LW, 1989. Activity of Commercial *Bacillus thuringiensis* preparations against *Trichostrogylus colubriformis* and *Nippostrongylus brasiliensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53: 276–277.

- Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos JF, Peña G, Nuñez-Valdez ME, Soberón M, Quintero R, 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 49651–4972.
- Bravo,A, Gill, SS, Soberon M, 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423–435.
- Caminade C, Medlock JM, Ducheyne E,McIntyre KM, Leach S, Baylis M, Morse A, 2012. Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios. *Journal of The Royal Society Interface*, 9: 2708–2717.
- Danısmazoglu M, Demir İ, Sevim A, Demirbağ Z, Nalçacıoğlu R, 2012. An Investigation on the bacterial flora of *Agriotes lineatus* (Coleoptera: Elateridae) and pathogenicity of the flora members. *Crop Protection*, 40: 1–7.
- Eski A, Özkan Çakici F, Güllü M, Muratoğlu H, Demirbağ Z, Demir İ, 2015. Identification and pathogenicity of bacteria from Mediterranean Corn Borer, *Sesamia nonagrioides* Lefèbvre, (Lepidoptera: Noctuidae). *Turkish Journal of Biology*, 39: 31–48.
- Foda MS, El-Beih Fawkia M, Moharam Maysa E, El-Gamal Nora NA, 2010. Physiological formation of mosquitocidal toxin by a novel *Bacillus thuringiensis* isolate under solid state fermentation. *Life Science Journal*, 7: 144–152.
- Gobatto V, Giani SG, Camassola M, Dillon AJP, Specht A, Barros NM, 2010. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Journal of Biology*, 70: 1039–1046.
- Jensen M, Mehlhorn H, 2009. Seventy-five years of Resochin® in the fight against malaria. *Parasitology Research*, 105: 609–627.
- Kioulos I, Kampouraki A, Morou E, Skavdisc G, Vontas J, 2014. Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector *Culex pipiens* from Greece. *Pest Management Science*, 70: 623–627.
- Lacey LA, Goettel MS, 1995. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 1st century. *Entomophaga*, 40: 3–27.
- Lees RS, Knols B, Bellini R, Benedict MQ, Bheecarry A, Bossin HC et al., 2014. Review: Improving our knowledge of male mosquito biology in relation to genetic control programmes. *Acta Tropica*, 132: 2–11.
- Mehlhorn H, 2011. Parasites and their World records in their fight for survival. In: Mehlhorn H (ed) *Progress in parasitology, Parasitology Research Monographs*, 2: 41–68.
- Özkan Çakici F, Sevim A, Demirbağ Z, Demir İ, 2014. Investigating internal bacteria of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and some *Bacillus* strains as biocontrol agents. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38: 99–110.
- Prieto-Samsonov DL, 1997. *Bacillus thuringiensis* from biodiversity to biotechnology, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: 202–219.
- Reisen WK, 2013. Ecology of West Nile virus in North America. *Viruses*, 5: 2079–2105.

- Salehi Jouzani GR, Pourjan Abad A, Seifinejad A, Marzban R, Kariman K, Maleki B, 2008. Distribution and diversity of dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 83–94.
- Sevim A, Eryüzlü E, Demirbağ Z, Demir İ, 2012. A novel *cry2Ab* gene from the indigenous isolate *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 133–140.
- Sezen K, Demir İ, Demirbağ Z, 2007. Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from Common Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera : Scarabaeidae). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 35: 79–85.
- Sanahuja G, Raviraj B, Twyman RM, Capell T, Christou P, 2011. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9: 283–300.
- Shu C, Zhang J, Chen G, Liang G, He K, Crickmore N, Huang D, Zhang J, Song F, 2013. Use of a pooled clone method to isolate a novel *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxin with activity against *Ostrinia furnacalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114: 31–33.
- Sun H, Sun L, He J, Shen B, Yu J, Chen C, Yang M, Sun Y, Zhang D, Ma L, Zhu C, 2011. Cloning and characterization of ribosomal protein S29, a deltamethrin resistance associated gene from *Culex pipiens pallens*. *Parasitology Research* 109: 1689–1697.
- Travers RS, Martin PAW, Reichelderfer CF, 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1263–1266.
- Visitsattapongse S, Sakdee S, Leetacheewa S, Angsuthanasombat C, 2014. Single-reversal charge in the B10-B11 receptor-binding loop of *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa and Cry4Ba toxins reflects their different toxicity against *Culex* spp. Larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 450: 948–952.
- Yılmaz S, 2010. Çeşitli Habitatlardan İzole Edilen *Bacillus thuringiensis* suşlarının moleküler karakterizasyonu ve bazı zararlı böceklerle karşı mücadelede kullanımı. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 159 s.
- Zeller HG, Schuffenecker I, 2004. West Nile Virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean Basin in contrast to its spread in the Americas. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23: 147–156.