



## Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi

**Araştırma Makalesi (Research Article)**

Makale Doi: **10.17100/nevbiltek.1336873**

Geliş Tarihi:02/08/2023

Kabul Tarihi:05/12/2023



### ***Malacosoma* sp. (Lepidoptera: Lasiocampidae) ile İlişkili Kültüre Edilebilir Bağırsak Bakteri Toplulukları: İzolasyon ve 16S rRNA Dizileme Analizi ile Tanımlama**

Ali Sevim <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Kırşehir

ORCID ID: 0000-0003-2472-599X

#### **Öz**

Pek çok hayvan ve bitki vücutlarının içerisinde simbiyotik mikroorganizmalara sahiptir ve bu ortaklar arasında yakın etkileşimler meydana gelmektedir. Böcekler ise en büyük hayvan grubu oluşturmaktadırlar ve zorunlu mutualizm'den fakültatif parazitizm'e kadar değişen çeşitli endosimbiyotik ilişkileri içermektedirler. Böceklerdeki endosimbiyotik bakterilerin beslenme, üreme, savunma, iletişim, davranış ve gelişim gibi pek çok farklı rolleri bulunmaktadır. Bu çalışmada böceklerdeki simbiyotik bakterileri tanımlamak için model organizma olarak *Malacosoma* sp. (Lepidoptera: Lasiocampidae) seçilmiştir. Bu böceğin larvalarında yer alan bakteriler izole edilmiş ve 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanmıştır. Toplam altı adet bakteri izole edilmiş ve bunlar *Staphylococcus* sp. MM-1, *Micrococcus* sp. MM-2, *Rhodococcus* sp. MM-3, *Arthrobacter citreus* MM-4, *Bacillus* sp. MM-5 ve *Pseudomonas* sp. MM-6 olarak tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçların böcek-bakteri ilişkilerinin belirlenmesinde ve böceklerdeki endosimbiyotik bakterilerinin rollerinin aydınlatılmasında faydalı olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Malacosoma* sp.; Bakteri; Simbiyosis; 16S rRNA

### **Culturable gut bacterial communities associated with *Malacosoma* sp. (Lepidoptera: Lasiocampidae): Isolation and identification by 16S rRNA sequence analysis**

#### **Abstract**

Many animals and plants have symbiotic microorganisms within their bodies, and these partners exhibit close interactions. Insects constitute the largest group of animals and contain various endosymbiotic relationships ranging from obligatory mutualism to facultative parasitism. Endosymbiotic bacteria in insects have many different roles such as nutrition, reproduction, defense, communication, behavior, and development. In this study, *Malacosoma* sp. (Lepidoptera: Lasiocampidae) was selected as the model organism to identify culturable symbiotic bacteria in this insect. The bacteria contained in the larvae of this insect were isolated and identified by 16S rRNA sequence analysis. A total of six bacteria were isolated and identified as *Staphylococcus* sp. MM-1, *Micrococcus* sp. MM-2, *Rhodococcus* sp. MM-3, *Arthrobacter citreus* MM-4, *Bacillus* sp. MM-5 and *Pseudomonas* sp. MM-6. It is thought that the obtained results will be useful in determining the insect-bacteria relations and elucidating the roles of endosymbiotic bacteria in insects.

**Keywords:** *Malacosoma* sp.; Bacteria; Symbiosis; 16S rRNA

Sorumlu yazar e-mail: ali.sevim@ahievran.edu.tr

## 1. Giriş

Böcekler pek çok farklı mikroorganizma ile simbiyotik ilişki içerisinde bulunabilmektedir. Fungusları, bakterileri ve nematodlar gibi mikroorganizmaları içeren böceklerdeki bu simbiyontlar böceklerin bağırsağında, vücut boşluklarında veya hücrelerinde yer almaktadır. Böceklerle ilişkili simbiyontların beslenme, doğal düşmanlardan korunma, ileri gelişim, davranış, üreme ve iletişim gibi pek çok farklı rolleri bulunmaktadır. Böceklerdeki simbiyotik ilişkiler mutualistik, kommensal, parazitik veya rekabetçi olabilmektedir [1-2]. Örneğin afidelerde yer alan maya benzeri simbiyontlar zorunlu bazı amino asitlerin sentezinden ve konak böceğe vitamin desteğinin sağlanmasından sorumludur [3]. Böceklerde yer alan ve fakültatif simbiyontlardan olan *Pseudomonas* konak böceğin sindirilen pestisitlerden kurtulmasına yardımcı olmaktadır [4]. Ek olarak böceklerde yer alan hücre içinde yaşamaya uyum sağlamış endosimbiyont bakterisi *Wolbachia* enfekte konağın üremesini değiştirme yeteneğine sahiptir [5].

Böceklerdeki simbiyotik mikroorganizmaların yukarıda sayılan rollerine ilave olarak bu bakterilerin modifiye edilerek özellikle zararlı böceklerin mücadelesinde kullanıma potansiyelleri bulunmaktadır. Örnek olarak yüksek oranda insektisit direnci geliştirmiş zararlı böceklerin bağırsak sistemlerindeki pestisit detoksifikasyonundan sorumlu bakterilerin sayısal olarak azaltılması ile insektisitlere daha duyarlı böcek popülasyonlarının oluşturulması verilebilir[4]. Yine özellikle bakteri simbiyontlarının genetik mühendisliği yöntemleri ile modifiye edilmesi (böcekleri öldüren insektisidal proteinlerin üretilmesi gibi) ve tekrar konağa verilmesi ile zararlı böceklerin kontrol altına alınması mümkün olabilmektedir [6]. Örnek olarak Beard vd. [7] Chagas hastalığı vektörünün (*Rhodnius prolixus* Stal (1859) (Hemiptera: Reduviidae) simbiyotik bakterisini konak bağırsağında anti-tripanozomal bir etmen ifade edecek şekilde modifiye etmişlerdir. Böcek bağırsağında yaşayan simbiyotik bakterilerin kültüre alınması, *in vitro* çoğaltılması ve tekrar besin ile konak böceğe verilmesi ile konak böceğin ölümünün sağlandığı çalışmalar da bulunmaktadır [8-9]. Buradaki amaç simbiyotik bakterilerin böcek bağırsağında hızlı bir şekilde çoğalmasını sağlamaktır. Son olarak üremeden sorumlu bazı simbiyotik bakterilerin böceklerde sayısal olarak azaltılması veya yok edilmesi ile konak böceğin üreme yeteneğinin son derece sınırlandırılması mümkün olabilmektedir [10]. Bunların haricinde entomopatojenik bakteriler zararlı böceklerin mücadelesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve böcekler bu bakterilerin izolasyonu için iyi birer kaynak oluşturmaktadır [11-12].

Bu anlamda böceklerde yer alan simbiyotik bakterilerin izole edilmesi, tanımlanması ve özellikle konak böcekteki rollerinin belirlenmesi hem temel bilimler açısından hem de yeni böcek mücadele sistemlerinin geliştirilmesi bakımından son derece önemlidir. Bu amaç doğrultusunda gerçekleştirilecek ilk adım simbiyotik bakterilerin izole edilmesi ve tanımlanması olacaktır. Bu çalışmada *Malacosoma* sp. (Lepidoptera: Lasiocampidae) tarım ve ormancılık açısından önemli türleri içerdiği için model organizma olarak seçilmiştir. Bu böceğin larvalarında yer alan kültüre edilebilir simbiyotik bakteriler izole edilmiş ve 16S rDNA dizileme analizi ile tanımlamaları yapılmıştır. Laboratuvarımızda bu böceğin kültüre alınması için gerekli çalışmalar ise devam etmektedir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1 Larva örneklerinin toplanması

*Malacosoma* sp. larvaları 2020 yılının Mayıs ayında Kırşehir il sınırları içerisinde toplanmıştır. Toplanan larvalar bir miktar besin (konukçu yaprakları) ile kapağı delinmiş plastik kutular içerisinde konularak laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvarında iki gün beslendikten sonra sağlıklı 3-4. evre larvalar bakteri izolasyonunda kullanılmıştır.

### 2.2 Larvaların tür tayini

Toplanan larva örnekleri morfolojik olarak tanımlanmış ve ayrıca morfolojik tanımlamayı doğrulamak için sitokrom oksidaz (alt ünite I) (COI) gen bölgesinin kısmi dizin analizi (yaklaşık 620 bp) yapılmıştır [13]. Larva örneklerinden toplam DNA izolasyonu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germantown, USA) kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA örnekleri kullanana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Genomik DNA izolasyonundan sonra, COI genini yaklaşık 620 bp'lik kısmi LCO1490-5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATGG-3 ve HCO2198-5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' primerleri ile PCR yardımıyla çoğaltılmıştır [14]. PCR koşulları Sevim ve Sevim [15] çalışmasında belirtilen şartlara göre ayarlanmıştır. PCR işleminden sonra, elde edilen PCR ürünleri etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde marker ile yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir. Doğru tespit edilen bantlar MACROGEN (Hollanda) firmasında dizin analizine tabi tutulmuştur.

### 2.3. Bakteri izolasyonu

Bakteri izolasyonu toplanan larva örneklerinden (3-4. evre) yapılmıştır. Toplam olarak 10 adet sağlıklı larva kullanılmıştır. Larvalar ilk olarak %70'lik etanol ile 2-3 dk yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş ve ardından üç kere steril saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra larvalar 3 ml steril nutrient broth (Difco, NJ, USA) içeren deney tüplerine alınarak homojenizatör yardımıyla tamamen homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 2 katlı steril tülbent ile süzülükten sonra  $10^{-1}$ 'den  $10^{-8}$ 'e kadar seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Daha sonra her bir dilüsyondan 100 µl alınarak nutrient agar (NA) besiyerine yayma ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriyeler 30°C'de iki gün boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda farklı renk ve görünüme sahip olan koloniler seçilerek ayrı bir NA besiyerine çizgi ekimleri yapılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan koloniler -20°C'de %20'lik gliserol içerisinde daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir [16].

### 2.4. 16S rRNA dizin analizi

İzole edilen bakterileri moleküler düzeyde tanımlamak için 16S rDNA gen bölgesinin dizileme analizi yapılmıştır. Bu amaçla bakteriyel izolatlardan total genomik DNA izolasyonu "All prep bacterial DNA" (Qiagen, Germantown, USA) kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'lar kullanana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Bu izole edilen genomik DNA'lardan 16S rDNA gen bölgesi 27F (5'-AGAGTTTGA TCMTGGCTCAG-3' ve 1492L (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Macrogen) primerleri kullanılarak PCR yardımıyla çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonları Demirci ve ark. [16] çalışmasında kullanılan şartlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan PCR ürünleri etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde marker ile yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir. Doğru tespit edilen bantlar MACROGEN (Hollanda) firmasında dizin analizine tabi tutulmuştur. Dizinin analizinde 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') ve 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC -3') primerleri kullanılmıştır.

### 2.5. Veri analizi

DNA sekanslarının tamamı Bioedit programı ile kontrol edilmiş ve hizalanmıştır [17]. İşlenen DNA sekansları NCBI veri tabanında yer alan BLAST algoritması ile homoloji araştırmasına tabi tutulmuş ve hem larva örneklerinden hem de bakteri izolatlarından elde edilen DNA sekanslarına ait yüzde (%) benzerlikler ortaya çıkarılmıştır [18-19]. Larva örneklerinin tanımlanması için GenBank'ta yer alan *Malacosoma* türlerine ait COI gen bölgeleri indirilmiş ve filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. Bakteri örnekleri için ise yine kendilerine en yakın sekanslar GenBank'tan indirilmiş ve filogenetik açıdan inşa edilen ağaç üzerinden karşılaştırılmıştır.

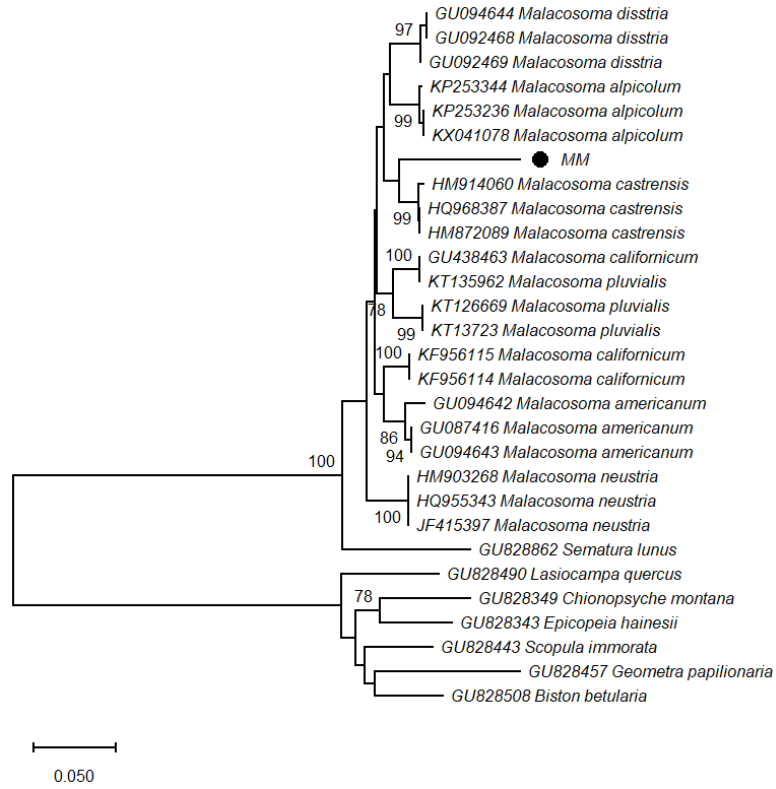
DNA sekanslarının çoklu hizalama işlemleri Bioedit içerisinde yer alan ClustalW programı ile gerçekleştirilmiştir [17, 20]. Filogenetik analizler ise Neighbor-Joining (NJ) metodu ile p-distance analizi kullanılarak MEGA 11.0.13 programı ile gerçekleştirilmiştir [21]. Elde edilen ağaçların iç dallarının güvenilirliği 1.000 tekrara dayalı bootstrap analizi ile istatistiksel olarak test edilmiştir.

### 2.6. GenBank erişim numaraları

Bakteriyel izolatların 16S rRNA gen bölgesi için GenBank erişim numaraları (OR366559-OR366564) alınmıştır (Tablo 1).

## 3. Bulgular

Larva örneklerine ait COI geninin kısmi sekansı BLAST analizine tabi tutulduğu zaman %93.09 oranında *Malacosoma castrensis* TLMF Lep 01977 örneği ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer *Malacosoma* türleri ile yapılan filogenetik analizler ise türü cins düzeyinde *Malacosoma* sp. olarak doğrulamıştır (Şekil 1).



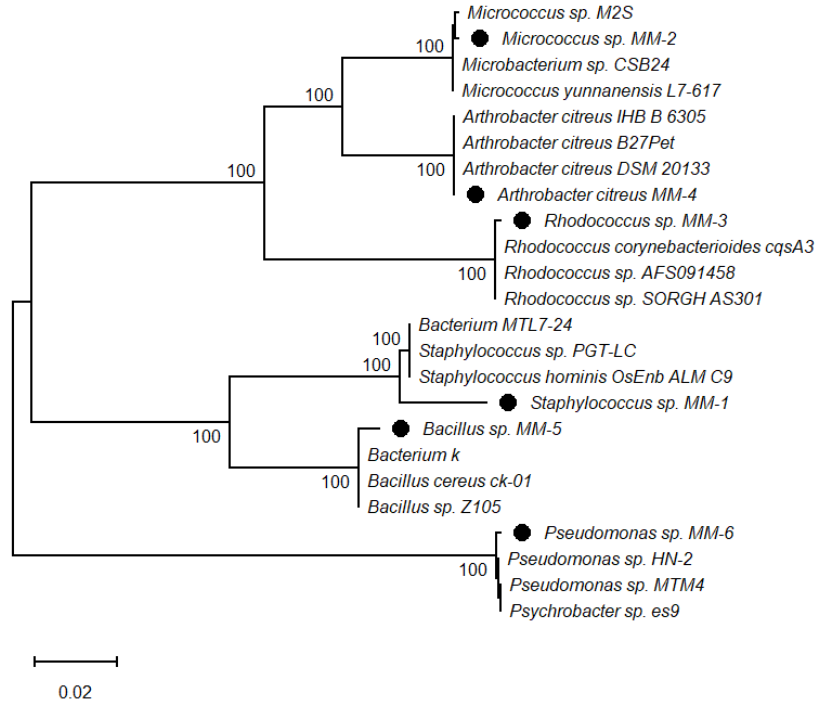
**Şekil 1.** Toplanan larva örneklerinin (MM) GenBank'tan elde edilen diğer *Malacosoma* türleri ile ilişkisini gösteren filogenetik ağaç. Filogenetik ağaç COI gen bölgesinin kısmi sekansı (yaklaşık 620 bp) elde edilerek oluşturulmuştur. Ağaç Neighbor-Joining (N-J) analizi kullanarak p-distance metodu ile yapılandırılmıştır. Bootstrap analizi 1.000 tekrara dayalı olarak oluşturulmuş ve %70 ve yukarısında olanlar ağaçta gösterilmiştir. Siyah daire bizim örneğimizi göstermektedir. Ağacın dibinde yer alan ölçek ise genetik mesafeyi temsil etmektedir.

Larva örneklerinden ise toplam olarak altı adet bakteri izole edilmiş olup bakteriyel izolatlar *Staphylococcus* sp. MM-1, *Micrococcus* sp. MM-2, *Rhodococcus* sp. MM-3, *Arthrobacter citreus* MM-4, *Bacillus* sp. MM-5 ve *Pseudomonas* sp. MM-6 olarak tanımlanmıştır. Bakteriyel izolatlara ait BLAST benzerlik oranları ve GenBank numaraları Tablo 1'de detaylı olarak verilmiştir. BLAST homoloji sonuçlarına göre tür tayinleri yapılan bakteriyel izolatların tanımlanması filogenetik analizlerle de doğrulanmıştır (Şekil 2).

**Tablo 1.** Bakteriyel izolatlara ait GenBank BLAST sonucuna göre yüzde (%) benzerlik oranları ve 16S rRNA gen bölgesine ait (yaklaşık 1.400 bp) GenBank erişim numaraları.

İzolat	GenBank numarası	Bakteri türü	En yakın ilişkili olduğu bakteri türleri	Çakışan baz oranları (%)	Yüzde (%) benzerlik
MM-1	OR366559	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus hominis</i> strain		
			OsEnb_ALM_C9	%99	%97,60
			Bacterium strain MTL7-24	%99	%97,60
			<i>Staphylococcus</i> sp. strain PGT-LC	%99	%97,60
MM-2	OR366560	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp. M2S	%99	%99,86
			<i>Microbacterium</i> sp. CSB24	%99	%99,86
			<i>Micrococcus yunnanensis</i> L7-617	%99	%99,86
MM-3	OR366561	<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> cqsA3	%100	%99,57
			<i>Rhodococcus</i> sp. AFS091458	%100	%99,57
			<i>Rhodococcus</i> sp.	%100	%99,57
			SORGH_AS301		

MM-4	OR366562	<i>Arthrobacter citreus</i>	<i>Arthrobacter citreus</i> IHB B 6305	%100	%99,93
			<i>Arthrobacter citreus</i> B27Pet	%100	%99,93
			<i>Arthrobacter citreus</i> DSM 20133	%100	%99,93
MM-5	OR366563	<i>Bacillus</i> sp.	Bacterium k	%100	%99,36
			<i>Bacillus cereus</i> ck-01	%100	%99,36
			<i>Bacillus</i> sp. Z105	%100	%99,36
MM-6	OR366564	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. MTM4	%98	%99,57
			<i>Psychrobacter</i> sp. es9	%98	%99,57
			<i>Pseudomonas</i> sp. HN-2	%98	%99,57



**Şekil 2.** *Malacosoma* sp.'den izole edilen bakteriyel izolatların (MM1-MM6) GenBank'tan elde edilen en yakın ilişkili bakteri türleri ile filogenetik ilişkisini gösteren ağaç. Filogenetik ağaç 16S rRNA gen bölgesinin sekans edilmesi ile oluşturulmuştur. Ağaç Neighbor-Joining (N-J) analizi kullanarak p-distance metodu ile yapılandırılmıştır. Bootstrap analizi 1.000 tekrara dayalı olarak oluşturulmuş ve %70 ve yukarısı olanlar ağaçta gösterilmiştir. Siyah daireler bu çalışmada izole edilen bakteriyel izolatları göstermektedir. Ağacın dibinde yer alan ölçek ise genetik mesafeyi temsil etmektedir.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Böcekler pek çok karasal habitata uyum sağlamış ve yaşayan en başarılı hayvanlar olup bilinen hayvan türlerinin %90'undan fazlasını oluşturmaktadır. Pek çok böceğin yaşam stili ise mikroorganizmalarla ilişkilerine dayalı olarak kurulmuştur [22]. Böceklerde yer alan simbiyotik mikroorganizmaların beslenme, konak savunmasının üstesinden gelme, doğal düşmanlardan korunma, büyüme, üreme ve iletişim gibi pek çok farklı rolü olup bun rollerin aydınlatılması hayvan-bakteri ilişkilerinin belirlenmesi açısından büyük önem arz etmektedir [1]. Bu anlamda böcekler hayvan-bakteri ilişkilerinin temelini araştırmada hem ucuz hem de deneysel olarak takip edilebilir model sistemleri oluşturmaktadır. Bu çalışmada *Malacosoma* sp. model organizma olarak seçilmiş ve bu böceğin larvalarındaki kültüre edilebilir bakteriler araştırılmıştır.

Çalışmamızda toplam olarak altı adet bakteri izole edilmiş ve bunlardan birisini *Staphylococcus* sp. MM-1 oluşturmaktadır. *Staphylococcus* türleri Gram-pozitif, hareketsiz ve kok şeklindeki hücrelerden oluşmaktadır. Bu bakteriler istisnalar olmakla birlikte genelde fakültatif anaerobdurlar. Genellikle katalaz pozitif oldukları bilinmektedir [23]. Bu cinsine ait bazı türler geniş bir habitat dağılımına sahip olup insan ve sıcak kanlı hayvanların mukoz membranlarına ve derilerine kolonize olabilmektedir [24]. Bu bakterilerin böceklerden izole edildiğini gösteren bazı çalışmalarda bulunmaktadır [16, 25]. Bu bakterilerin böceklerden izole edilse bile böceklerdeki rolleri hakkında pek fazla bir şey bilinmemektedir. Bu anlamda *Staphylococcus* türlerinin böceklerdeki rollerini belirlemeye yönelik araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda izole edilen diğer bir bakteri *Micrococcus* sp. MM-2'dir. *Micrococcus* generisi genellikle hareketsiz, spor oluşturmeyen ve Gram-pozitif bakterilerden oluşmaktadır. Bu generinin üyeleri katalaz pozitif olup pek çok tür karotenoid pigment üretmektedir [26]. *Micrococcus* türleri toprak, tatlı ve deniz suyu, kum ve bitki örtüsü gibi pek çok karasal ve sucul ekosistemlerde bulunabilmektedir [27]. Bu türün çeşitli böceklerden izole edildiğine ve hatta bazı böceklerde enfeksiyon oluşturduğuna dair çalışmalarda bulunmaktadır [28-29]. Oysaki böceklerden izole edilen bu bakterilerin patojenik olma dışında diğer bazı simbiyotik özelliklerinin araştırılması gerekmektedir.

*Rhodococcus* generisinin üyeleri endospor oluşturmeyen, hareketsiz, katalaz pozitif, zorunlu aerobik ve gram pozitif bakterilerden oluşmaktadır. Bu bakteri çevresel kökenli çeşitli kaynaklardan (kaya, zemin suyu, toprak, deniz sedimenti, böcekler, hayvan ve bitkilerden) izole edilebilir ve seçici olmayan besiyerlerin de iyi üreme gösterirler [30]. Bu generisi ait bazı üyelerin böceklerden izole edildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır [31-32]. Özellikle *R. rhodnii* Chagas hastalığının vektörü olan *Rhodnius prolixus* Stal (Heteroptera: Reduviidae) ile simbiyotik olarak yaşamakta ve bu bakteri ile bu vektörün kontrol altına alınması çalışmaları devam etmektedir [33-34]. Bu kapsamda bu çalışmada izole edilen *Rhodococcus* sp. MM-3 izolatının daha detaylı olarak tür düzeyinde tanımlanması ve bu böcekteki rolünün belirlenmesi böcek-bakteri ilişkilerinin belirlenmesi açısından faydalı olacaktır.

*Arthrobacter* çubuk-kok üreme siklusu ile karakterize edilen zorunlu aerob bakterilerden oluşan bir cinsdir. Bu grubun üyeleri çoğunlukla topraktan, bitki yüzeylerinden ve atıksu sedimentlerinden izole edilmektedir [35]. Bu grubun bazı üyelerinin ise tarımda etkili rollerinin olduğu bilinmektedir [36]. Bu generinin içerisinde yer alan *A. citreus* ise daha çok fenol ve kaprolaktam gibi bileşikler parçalama özellikleri ile bilinmektedir [37-38]. Bu bakterinin böceklerden izole edildiğine dair çalışmalar bulunsun da olası rolleri tam olarak aydınlatılmamıştır [39]. Çalışmamızda izole edilen *A. citreus* MM-4'ün böceklerdeki (özellikle *Malacosoma* sp.) rollerinin belirlenmesi tarımsal açıdan zararlı böceklerin mücadelesine katkı sağlayacaktır.

*Bacillus* generisi üyeleri büyük, aerobik, Gram-pozitif ve spor oluşturan çubuk şeklindeki bakterilerdir. *Bacillus* türleri doğada (hava, su ve toprak gibi ortamlarda) yaygın olarak bulunmaktadır [40]. Pek çok farklı *Bacillus* türü ölü böceklerden izole edilmiştir ve bazı türler (*B. thuringiensis*, *B. larvae* ve *B. popilliae* gibi) iyi birer böcek patojeni olarak tanınmaktadır [41]. Özellikle bu grup içerisinde yer alan *B. thuringiensis* (Bt) tarım ve ormancılıkta pek çok zararlı böceğe karşı başarılı mikrobiyal insektisitler olarak kullanılmaktadır [42]. Bizim çalışmamızda da bir adet *Bacillus* sp. MM-5 izole edilmiş olup bu bakterinin daha detaylı tür tanımlanmasının yapılması ve böceklere karşı patojenite testlerinin gerçekleştirilmesi faydalı olacaktır.

*Pseudomonas* en iyi çalışılmış bakteri grubundan bir tanesi olup bu generisi Gram-negatif bakteriler arasında en yüksek tür sayısına sahiptir. Bu generinin üyeleri doğada geniş dağılımlı olup pek çok farklı ekolojik rolleri ve biyoteknolojik uygulamaları vardır. Bunun haricinde bazı türler insanlar, hayvanlar, bitkiler ve böcekler için patojeniktir [43]. Bazı *Pseudomonas* türleri böcekler ile çeşitli etkileşimlere sahip olup bunlar patojenik veya endosimbiyont olabilmektedir [44]. Bu çalışmada bir tane *Pseudomonas* sp. MM-6 izole edilmiş olup bu bakterinin detaylı moleküler teknikler ile tür düzeyinde tanımlanması ve böcekteki rollerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak *Malacosoma* sp. larvalarından altı adet bakteriyel tür (suş) izole edilmiş ve bunlar 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanmıştır. İzole edilen bakteriler literatür verileri ile karşılaştırılarak tartışılmıştır. İleriki çalışmalarda izole edilen bakterilerin daha detaylı moleküler teknikler ile tür düzeyinde tanımlanması gerekmektedir. Ayrıca, bu bakterilerin deneysel çalışmalar ile böceklerdeki rollerinin belirlenmesi gerekmektedir.

## 5. Teşekkür ve Katkı Beyanı

A.S.: Çalışmanın tasarlanması, laboratuvar çalışmaları, veri analizi ve makale yazımı.

## 6. Kaynaklar

- [1]. Klepzig K. D., Adams A. S., Handelsman J., Raffa K.F., "Symbioses: A key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans" *Environmental Entomology*, 38 (1), 67-77, 2009.
- [2]. Hosokawa T., Fukatsu, T., "Relevance of microbial symbiosis to insect behavior" *Current Opinion in Insect Science*, 39, 91-100, 2020.
- [3]. Zhao M., Lin X., Guo X., "The role of insect symbiotic bacteria in metabolizing phytochemicals and agrochemicals" *Insects*, 13(7), 583, 2022.
- [4]. Rupawate P.S., Roylawar P., Khandagale K., Gawande S., Ade A.B., Jaiswal D.K., Borgave S., "Role of gut symbionts of insect pests: A novel target for insect-pest control" *Frontiers Microbiology*, 14, 1146390, 2023.
- [5]. Correa C.C., Ballard J.W.O., "Wolbachia associations with insects: Winning or losing against a master manipulator" *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3, 153, 2016.

- [6]. Beard C.B., Durvasula R.V., Richards F.F., "Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission" *Emerging Infectious Diseases*, 4, 581-591, 1998.
- [7]. Beard C.B., Mason P.W., Aksoy S., Tesh R.B., Richards F.F., "Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*" *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46, 195-200, 1992.
- [8]. Harada H., Ishikawa H. "Experimental pathogenicity of *Erwinia aphidicola* to pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*" *Journal of General and Applied Microbiology*, 43, 363-367, 1997.
- [9]. Ishikawa H., "Insect symbiosis: An introduction" Edited by Bourtzis K., Miller T.A., Insect symbiosis, *CRC Press*, New York, 1-22, 2003.
- [10]. Zhong J., Jasinskas A., Barbour A.G., "Antibiotic treatment of the tick vector *Amblyomma americanum* reduced reproductive fitness" *PLoS One*, 2, e405, 2007.
- [11]. Gangwar P., Trivedi M., Tiwari R.K., "Entomopathogenic bacteria. Edited by Omkar., Microbial approaches for insect pest management., *Springer*, Singapore, 59-79, 2021
- [12]. Sevim A., Sevim E., "Lasiocampa trifolii (Denis & Schiffermüller, 1775)'nin dahili bakteriyel çeşitliliği: Yeni bir olası *Okibacterium* sp" *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi* , 10 (1) , 44-55 .
- [13]. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R., "DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates" *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3 (5), 294-299, 1994.
- [14]. Sambrook J.F.E., Maniatis T., "Molecular cloning" *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, USA, 1989.
- [15]. Sevim E., Çocar M., Sezgin F.M., Sevim A., "Aerobic gut bacterial flora of *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) and their virulence to the host" *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28, 30, 2018.
- [16]. Demirci M., Sevim E., Demir İ., Sevim A., "Culturable bacterial microbiota of *Plagioderia versicolora* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae) and virulence of the isolated strains" *Folia Microbiologica*, 58(3), 201-210, 2013.
- [17]. Hall T.A., "BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT" *Nucleic Acids Symposium*, 41, 95-98, 1999.
- [18]. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. "Basic local alignment search tool" *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410, 1990.
- [19]. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Clark K., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W., "GenBank" *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue): D48-D53, 2012.
- [20]. Thomson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., "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, 1994.
- [21]. Tamura K., Stecher G., Kumar S., "MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11" *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027, 2021.
- [22]. Douglas A.E., "The molecular basis of bacterial-insect symbiosis" *Journal of Molecular Biology*, 426(23), 3830-7, 2014.
- [23]. Gherardi G., Di Bonaventura G., Savini V., "Staphylococcal Taxonomy" Edited by Savini V., Pet-To-Man Travelling *Staphylococci*, *Academic Press*, 1-10, 2018.
- [24]. Antelmann H., "Oxidative Stress Responses and Redox Signalling Mechanisms in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*" Edited by Tang Y.W., Sussman M., Liu D., Poxton I., Schwartzman J., *Molecular Medical Microbiology*, *Academic Press*, 249-274, 2015.
- [25]. Danişmazoğlu M., Demir İ., Sevim A., Demirbağ Z., Nalçacıoğlu R., "An investigation on the bacterial flora of *Agriotes lineatus* (Coleoptera: Elateridae) and pathogenicity of the flora members" *Crop Protection*, 40, 1-7, 2012.
- [26]. Kocur M., Kloos W.E., Schleifer K.H., "The Genus *Micrococcus*" Edited by Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E., *The Prokaryotes*, *Springer*, New York, 2006.
- [27]. Nunez M., "Micrococcus" Edited by Batt C.A., Tortorello M.L., *Encyclopedia of Food Microbiology*, *Academic Press*, 627-633, 2014.
- [28]. Wang Q., Yin M., Yuan C., Liu X., Jiang H., Wang M., Zou Z., Hu Z., "The *Micrococcus luteus* infection activates a novel melanization pathway of cSP10, cSP4, and cSP8 in *Helicoverpa armigera*" *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 147, 103775, 2022.
- [29]. Sevim, A., Sevim, E., "Culturable bacterial communities related to different larval stages of *Sanys irrosea* (Guenee, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae)" *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*, 8(4), 641-650, 2022.

- [30]. Majidzadeh M., Fatahi-Bafghi M., “Current taxonomy of *Rhodococcus* species and their role in infections” *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, 37(11), 2045-2062, 2018.
- [31]. Rodríguez, J., Pavía, P., Montilla, M., Puerta C.J., “Identifying triatomine symbiont *Rhodococcus rhodnii* as intestinal bacteria from *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera: Reduviidae) laboratory insects” *International Journal of Tropical Insect Science*, 31, 34-37, 2011.
- [32]. Biswas S., Paul D., “Isolation and characterization of *Rhodococcus qingshengii*, a cellulolytic bacterium from *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Crambidae) gut” *Environmental and Experimental Biology*, 19(4), 203-208, 2022.
- [33]. Batista K.K.S., Vieira C.S., Figueiredo M.B., Costa-Latgé S.G., Azambuja P., Genta F.A., Castro D.P., “Influence of *Serratia marcescens* and *Rhodococcus rhodnii* on the humoral immunity of *Rhodnius prolixus*” *International Journal of Molecular Science*, 9(20), 10901, 2021.
- [34]. Dotson E.M., Plikaytis B., Shinnick T.M., Durvasula R.V., Beard C.B., “Transformation of *Rhodococcus rhodnii*, a symbiont of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*, with integrative elements of the L1 mycobacteriophage” *Infection, Genetics and Evolution*, 3, 103-109, 2003.
- [35]. Gobbetti M., Rizzello C.G., “*Arthrobacter*” Edited by Batt C.A., Tortorello M.L., Encyclopedia of Food Microbiology, *Academic Press*, 69-76, 2014.
- [36]. Roy P., Kumar A., “*Arthrobacter*” Edited by Amaesan N., Kumar M.S., Annapurna K., Kumar K., Sankaranarayanan A., Beneficial Microbes in Agro-Ecology, *Academic Press*, 3-11, 2020.
- [37]. Baxi N.N., Patel S., Hansoti D., “An *Arthrobacter citreus* strain suitable for degrading  $\epsilon$ -caprolactam in polyamide waste and accumulation of glutamic acid” *AMB Express*, 9, 161, 2019.
- [38]. Karigar C., Mahesh A., Nagenahalli M., Yun D.J., “Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus*.” *Biodegradation*, 17, 47-55, 2006.
- [39]. Çelik T., Sevim A., “Bacterial pathogens from *Diprion pini* L. (Hymenoptera: Diprionidae) and their biocontrol potential. *Biologia* 77, 3001-3013, 2022.
- [40]. Carter G.R., “*Bacillus*” Edited by Carter G.R., Cole J.R., Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology, *Academic Press*, 221-228, 1990.
- [41]. Stahly D.P., Andrews R.E., Yousten A.A., “The Genus *Bacillus*-Insect Pathogens” Edited by Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E., The Prokaryotes, *Springer*, New York, 2006.
- [42]. Jouzani G.S., Valijanian E., Sharafi R., “*Bacillus thuringiensis*: A successful insecticide with new environmental features and tidings” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 2691-2711, 2017.
- [43]. Lalucat J., Gomila M., Mulet M., Zaruma A., García-Valdés E., “Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of *Stutzerimonas* gen. Nov” *Systematic and Applied Microbiology*, 45(1), 126289, 2022.
- [44]. Teoh M.C., Furusawa G., Veera Singham G., “Multifaceted interactions between the pseudomonads and insects: Mechanisms and prospects” *Archives of Microbiology*, 203, 1891-1915, 2021.