



**BAZI SERT KENE (ACARI: IXODIDAE) TÜRLERİNİN
BAKTERİYOMLARININ
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Haktan ÇAĞLAYAN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Şaban TEKİN
2013[®]**

Her hakkı saklıdır.

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI SERT KENE (ACARI: IXODIDAE) TÜRLERİNİN
BAKTERİYOMLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ

Haktan ÇAĞLAYAN

TOKAT
2013

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Şaban TEKİN danışmanlığında, Haktan ÇAĞLAYAN tarafından hazırlanan bu çalışma 11/02/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Şaban TEKİN



Üye : Doç. Dr. İsa KARAMAN



Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet BURSALI



Yukarıdaki sonucu onaylarım



Doç. Dr. Naim ÇAĞMAN

Enstitü Müdürü

11.03/2013

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlâk kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının Gaziosmanpaşa Üniversitesi'nde veya başka bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Haktan ÇAĞLAYAN

Mart 2013

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI SERT KENE (ACARI: IXODIDAE) TÜRLERİNİN BAKTERİYOMLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Haktan ÇAĞLAYAN

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şaban TEKİN

Sert keneler, kanla beslenen zorunlu ektoparazitlerdir. Sert keneler, özellikle de hastalık etkeni mikroorganizmaların taşıyıcısı olduğundan hayvanlarda meydana gelen hastalıklar sonucu hayvan endüstrisini milyarlarca dolarlık zarara uğratmakta, insanlarda ölümlerle sonuçlanan enfeksiyonlara neden olmaktadır. Ülkemizde özellikle Kelkit Vadisi olarak bilinen bölgede 2002 yılından itibaren her yıl yaz aylarında artan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Hastalığı nedeniyle çok sayıda insan hayatını kaybetmektedir. Bu nedenle kenelerin ve kene kökenli hastalıkların kontrolü önem kazanmıştır. Kenelerin kontrolü için kimyasal ilaçlar başta olmak üzere değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri de keneler için patojen olan entomopatojen bakteri ve mantarlardır. Bu nedenle öncelikle kenelerde bulunan bakterilerin belirlenmesi (bakteriyom) gereklidir. Bu çalışmada Tokat bölgesindeki bazı sert kenelerin bakteriyel florasının (bakteriyomunun) belirlenerek, kenelerin kontrolünde kullanılabilecek entomopatojenik bakterilerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun için de bölgeden toplanan 17 *Haemaphysalis parva* ve 1 *Hyalomma marginatum* türü sert kenelerden standart bakteri kültürü yöntemleriyle 64 koloni izole edilmiş ve 16S-rDNA temelli PCR yöntemiyle bunlardan 20 muhtemel bakteri türü tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre test edilen kenelerin bakteriyomunda bulunan bakterilerden bazılarının kenelerin kontrolünde biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

2013, 48 sayfa

Anahtar kelimeler: Sert keneler, Simbiyont, Bakteriyom, Biyolojik kontrol, PCR

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

DETERMINATION OF BACTERIOM OF SOME HARD TICK (ACARI: IXODIDAE) SPECIES USING MOLECULAR METHODS

Haktan CAGLAYAN

Gaziosmanpasa University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Saban TEKIN

Hard ticks are mandatory blood feeding ectoparasites. They are responsible for the transmission of various pathogenic microorganisms to animals and humans. Therefore, tick-borne diseases cause billions of dollars of economical losses in livestock industry and infections in humans resulting in fatalities. Since 2002, there are many deadly Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) cases recorded in summer season in the Kelkit Valley region of Turkey. Therefore, ticks and tick-borne diseases needed to be controlled in the region. Different methods for the control of ticks, especially chemical drugs have been used in practice. One of the tick control method is to use symbiont or entomopathogenic bacteria and fungi. To determine the pathogenic bacteria that can be used for tick control, the bacteriom has to be determined. In the present study, bacteriom of two hard tick species collected from Tokat region is determined using standard bacteriological culture methods and PCR. We isolated 64 bacteria colonies and 20 bacteria species using 16S-rDNA based PCR in 17 *Haemaphysalis parva* and 1 *Hyalomma marginatum* hard ticks. We suggested that some bacteria species determined in ticks may be used for the biological control of hard ticks.

2013, 48 pages

Keywords : Hard ticks, Simbiont, Bacteriom, Biological Control, PCR

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmamda; tez konusu seçiminde bana fikir veren ve moleküler analiz tekniklerinin uygulanmasında yardımcı olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Şaban TEKİN'e, mikrobiyolojik çalışmalar için laboratuvarını kullanmama izin veren ve bakteri kültür tekniği hakkında teknik ve teorik desteğini esirgemeyen sayın Doç. Dr. İsa KARAMAN'a, PCR işleminde kullandığım bazı primerleri ve enzimi bana temin eden sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye, kenelerin tür tanımlamalarını yapan sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet BURSALI ve Uzm. Adem KESKİN'e, arazi çalışmalarında beni yalnız bırakmayan ve lojistik destek sağlayan babam Fehmi ÇAĞLAYAN ve kardeşim Yusuf Hakan ÇAĞLAYAN'a, kenelerin toplanmasında önemli bir paya sahip olan YUMAK ve SARI'ya, çalışmam sırasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2011/76 nolu projeyle desteklenmiştir.

Haktan ÇAĞLAYAN

Mart 2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
SİMGE ve KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Kenelerin Özellikleri	4
2.1.1. Kenelerin Sistematiikteki Yeri	4
2.1.2. Kenelerin Yaşam Döngüleri	5
2.1.3. Kenelerde Beslenme	5
2.1.4. Kene-konak ilişkisi	6
2.1.5. Kene-patojen ilişkisi	7
2.2. Kenelerin Neden Olduğu Hastalıklar	7
2.3. Mikrobiyom	9
2.3.1. 16S-rDNA Dizi Analizi	9
2.4. Simbiyotik Yaşam (Simbiyozis)	11
2.4.1. Artropodlarda Bulunan Önemli Simbiyoz Canlılar	12
2.4.2. Kenelerde Simbiyoz	17
2.5. Biyolojik Mücadele (Biyolojik Kontrol)	18
2.5.1. Kenelerde Yapılan Biyolojik Mücadele Çalışmaları	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1. Kenelerin Toplanması	20
3.2. Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması	21
3.2.1. Luria-Bertani (LB Broth) Hazırlanması	21
3.2.2. Luria-Bertani Agar (LB Agar)	21
3.2.3. 50X Tris Acetate EDTA (TAE) Tamponu	21
3.2.4. PBS (Fosfat Tamponu)	22
3.2.5. Primerlerin Hazırlanması	22
3.3. Yöntem	22
3.3.1. Kenelerin besiyeri içerisinde parçalanması	22
3.3.2. Kene homojenatlarının LB Broth ile dilüsyonunun yapılması	22
3.3.3. Kene homojenatlarının LB Agar üzerine ekiminin yapılması	23
3.3.4. LB Agar'da bakteri kolonilerinin varlığının gözlenmesi	23
3.3.5. DNA İzolasyonu	23
3.3.6. Kenelerde Bulunan Bakterilerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Belirlenmesi	25
3.3.7. Agaroz Jel Elektroforezi	26
3.3.8. DNA Dizi Analizi	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	28
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge	Açıklama
gr	Gram
m	Metre
%	Yüzde
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
µM	Mikromolar
mAH	Miliampere – Hour (Miliamper – Saat)
W	Watt
V	Volt
NaCl	Sodyumklorür
°C	Derece santigrat

Kısaltma	Açıklama
UV	Ultraviyole
dH₂O	Deiyonize Su
DNA	Deoksiribonükleik asit
RCF	Relative Centrifugation Force (Relatif Santrifügasyon Kuvveti)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlanmış Tuz çözeltisi)
K	Kuzey
D	Doğu

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kenelerin sistematığı	4
Şekil 2.2. Üç Konaklı Kenelerde Yaşam Döngüsü	6
Şekil 2.3. Sert Kenelerin Beslenme Periyodu	6
Şekil 2.4. Türkiye’de 2003-2008 yılları arası kene kökenli hastalıkların görüldüğü yerler	11
Şekil 2.5. <i>Wolbachia sp.</i>	13
Şekil 2.6. <i>Beauveria bassiana</i>	16
Şekil 2.7. <i>Lecanicillium lecanii</i>	17
Şekil 3.1. Kenelerin toplandığı yerler	20
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan yöntemler	25
Şekil 3.3. Kenelerden izole edilen DNA ile yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde koşturulması ve oluşan pozitif bantlar	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Kenelerin taşıdıkları patojenler, sebep oldukları hastalıklar ve coğrafi dağılımları	10
Çizelge 4.1. Bu çalışmada <i>H. parva</i> ve <i>H. marginatum</i> türü kenelerde tespit edilen bakteri türleri	30
Çizelge 4.2. Çalışmada tespit edilen bakteri türlerinin bilinen bazı özellikleri.....	31
Çizelge 4.3. Bu çalışmada tespit edilen bakterilerin önceki çalışmalarda bulunduğu kene türleri	33

1. GİRİŞ

Keneler, bakteri, protozoa ve virüsleri taşıyan, zorunlu olarak kanla beslenen ektoparazitlerdir (Rijpkema ve ark., 1996; Punda-Polić ve ark., 2002; Duh ve ark., 2006, 2010; Hornok ve Farkas, 2009; Hubálek, 2010). Sağlık açısından sivrisineklerden sonra eklembacaklıların en tehlikeli grubudur. Dünya üzerinde tespit edilmiş olan yaklaşık 900 kene türü bulunmaktadır. Bu kenelerin % 20 kadarı insan ve hayvanlarda patojen olan mikroorganizmaların vektörüdür (Milutinović ve Radulović, 2002; Clay ve Fuqua, 2010).

Ülkemiz keneleriyle ilgili araştırmalar 1900’lü yıllarda başlamıştır. Bu çalışmalar daha çok Türkiye’de bulunan kenelerin sistematığını ortaya çıkarmak amacıyla yapılan çalışmalardır. Bu nedenle Türkiye’deki birçok omurgalı konakta bulunan keneler ve bu kenelerde bulunan kene kökenli patojenler hakkında çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Tonbak ve ark., 2006; Aktaş ve ark., 2009, 2011; Bursalı ve ark., 2010, 2011, 2012). Son yıllarda Türkiye’de ve dünyada bazı insan enfeksiyon hastalıklarının epidemilerinde kenelerin başlıca rol oynaması, keneleri daha güncel hale getirmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, ülkemizde çok sayıda kene türünün bulunduğu ve dolayısıyla çoğu kene türünün Türkiye’nin coğrafik yapısı ve mevsimsel şartlarına uyum sağlayabildiklerini göstermiştir (Kurtınar, 1954; Mimoğlu, 1959; Hoffmann ve ark.1991; İça ve ark. 2007; Clay ve Fuqua, 2010; Bursalı ve ark., 2010, 2011, 2012). Son yapılan çalışmalarda ülkemizde sert ve yumuşak kene ailesine ait 46 kene türünün bulunduğu bildirilmiştir (Bursalı ve ark., 2012).

Keneler, taşıdıkları enfeksiyonlar nedeniyle hayvancılıkta, tropik ve subtropik alanlarda, özellikle de sığır yetiştiriciliğinde milyarlarca dolar zarara sebep olmaktadır. Amerika’da sığırlardaki kene ve kene kökenli hastalıklar nedeniyle yılda 13.9-18.7 milyar dolar harcanmaktadır (De Castro, 1997). Babesiosis etkeni *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*’ın Brezilya’da sığır endüstrisine verdiği zarar yaklaşık 2 milyar dolar olmuştur (Grisi, 2002). Keneler ve taşıdıkları patojenler, hayvanların deri kalitesine, süt ve et üretimine direkt olarak zarar vermektedir. Ayrıca paralize, toksemi ve anemiye sebep olmakta, böylece hayvancılık endüstrisine büyük darbe vurmaktadır.

Keneler kan emmelerinin yanısıra mekanik ve biyolojik vektör olarak birçok hastalığın (Brucellosis, Veba, Salmonellosis, Listeriosis, Luping-ill, Lyme, tropikal Theileriosis, Babesiosis, Anaplasmosis, Kırım-Kongo kanamalı ateşi, Q humması, koyun-keçi Riketsiyozları, Tularemi vs.) insanlara bulaşmasında rol oynamaktadırlar. Bu hastalıklardan Anaplasmozis, Babesiozis, Lyme Hastalığı (*Borrelia burgdorferi* nedenli), Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı ve East Coast fever (ECF) (*Theileria parva* nedenli), kenelerle bulaşan en önemli hastalıklardan bazılarıdır (Mallon ve ark., 2012).

Avrupa’da kene kökenli hastalıklardan özellikle Lyme borreliyozis (LB) ve kene kökenli ensefalit (TBE) 1980’lerden itibaren artış göstermeye başlamıştır (Rizzoli ve ark., 2011; Lundkvist ve ark., 2011). *Ixodes ricinus* keneleri tarafından taşınan *Borrelia burgdorferi* bakterisi Lyme borreliosis hastalığını özellikle insan ve evcil hayvanlar üzerinde diğer kene kökenli hastalıklara göre yüksek ölüm oranına sahiptir. Avrupa’daki küçükbaş hayvan ölümlerinin %60’ının nedenini bunlar olduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2012).

Kenelerin *Rickettsia*, *Coxiella*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis*, *Chryseobacterium indologenes*, *Diplorickettsia massiliensis* (Adelson ve ark., 2004; Holman ve ark., 2004; Subramanian ve ark., 2012) gibi çok sayıda bakteriyel patojeni taşıdıkları gösterilmiştir.

Bulaştırdıkları hastalıklar ve sebep oldukları ekonomik zararlar nedeniyle kenelerin kontrolü zorunlu hale gelmiştir. Kene kökenli hastalıkların kontrolü ile ilgili çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır ve bu amaçla kimyasal ilaçlama, biyolojik kontrol, kısır böcek (steril insect) tekniği, anti-kene aşıları ve entomopatojenlerden yararlanma gibi uygulamalar kullanılmaktadır (Kaaya ve Hassan, 2000; Abdel-Shafy ve Zayed, 2002; Lundh ve ark., 2005; De la Fuente ve Kocan, 2006; Labuda ve ark., 2006; Gosh ve ark., 2007).

Kene ve kene kökenli hastalıkların kontrolünde en önemli aşamalardan biri kene türlerinin taşıdığı mikroorganizmaların belirlenmesidir. Bir bölgedeki kene faunasının taşıdığı patojen mikroorganizmaların bilinmesi, bunlara karşı önceden koruyucu önlem ve metodların geliştirilmesine imkan sağlamakta ve hangi kene türüne karşı önlem alınması konusunda yol göstermektedir. Kenelerle taşınan birçok mikroorganizma gibi, henüz bilinmeyen patojenik mikroorganizmaların gelecekte dünya için bir küresel tehdit

haline dönüşebilecek enfeksiyonlara sebep olma ihtimali de bulunmaktadır (Hotez, 2009; Heyman, 2010).

Yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalar sonucunda, kenelerde çok sayıda bakteri türü bulunmuştur (Murrell ve ark., 2004; Moreno ve ark., 2006; van Overbeek ve ark., 2008; Yuan, 2010; Clay ve ark., 2008; Clay and Fuqua, 2010; Andreotti ve ark., 2011). Kenelerdeki bakteri, mantar, virüs, protozoa çeşitliliğini belirleme çalışmaları sonucunda, hem kenelerin taşıdığı tehlikeli patojenlerin belirlenerek bunların hastalık bulaştırma potansiyellerinin ortaya çıkartılması, hem de kenelerde bulunan bakteriyel veya fungal endosimbiyont biyokontrol ajanlarının tespit edilmesine imkan sağlayacaktır.

Bu çalışmada aerobik bakteriler için kullanılan klasik kültür yöntemiyle ülkemizde bulunan bazı sert kene türlerinin bakteri florasının (bakteriyom) belirlenerek, kenelerin biyolojik kontrolünde kullanılma potansiyeli olan bakteri türlerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Kenelerin Özellikleri

2.1.1. Kenelerin Sistematikteki Yeri

Keneler, *Ixodida* ordosunda, *Parasitiformes* superordosunda sınıflandırılan, zorunlu nedenler dışında karasal omurgalılarda kanla beslenen ektoparazitlerdir (Ribeiro ve ark., 2012). Belirlenen yaklaşık 900 kene türü 3 familyaya bölünmüştür. *Ixodidae* familyası (Sert keneler) 14 cinste 713 türden, *Argasidae* familyası (Yumuşak keneler) da 185 türü kapsar. Diğer familya da tek türlü *Nuttalliellidae* (*Nuttalliella namaqua*) familyasıdır. Bu sınıflandırmada halen genus sınıflandırması tartışılacak durumdadır (Barker ve Murrell, 2004; Ullmann ve ark., 2008; Nava ve ark., 2009; Guglielmone ve ark., 2010; Mans ve ark., 2011).

Phylum : *Arthropoda*

Subphylum : *Chelicerata*

Classis : *Arachnida*

Subclassis : *Acari*

Superordo : *Parasitiformes*

Ordo : *Ixodida*

Familia : *Argasidae*

Familia : *Ixodidae*

Familia : *Nuttalliellidae*

Şekil 2.1. Kenelerin sistematigi (Guglielmone ve ark., 2010; Mans ve ark., 2011)

Yapılan çalışmalar Türkiye kene faunasında *Ixodidae* familyasından 38 kene türü, *Argasidae* familyasından da 8 kene türü bulunduğunu göstermiştir (Bursalı ve ark., 2012).

Türkiye'nin birçok bölgesinde, keneler ve kene kökenli hastalıkların yaygınlığı hakkında bilgi bulunmamaktadır. Ülkemizde kenelerle ilgili çalışmalar, özellikle Kırım

Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı'nın ciddi bir sorun haline geldiği son 10 yılda artış göstermiştir ve halen yoğun bir şekilde devam etmektedir.

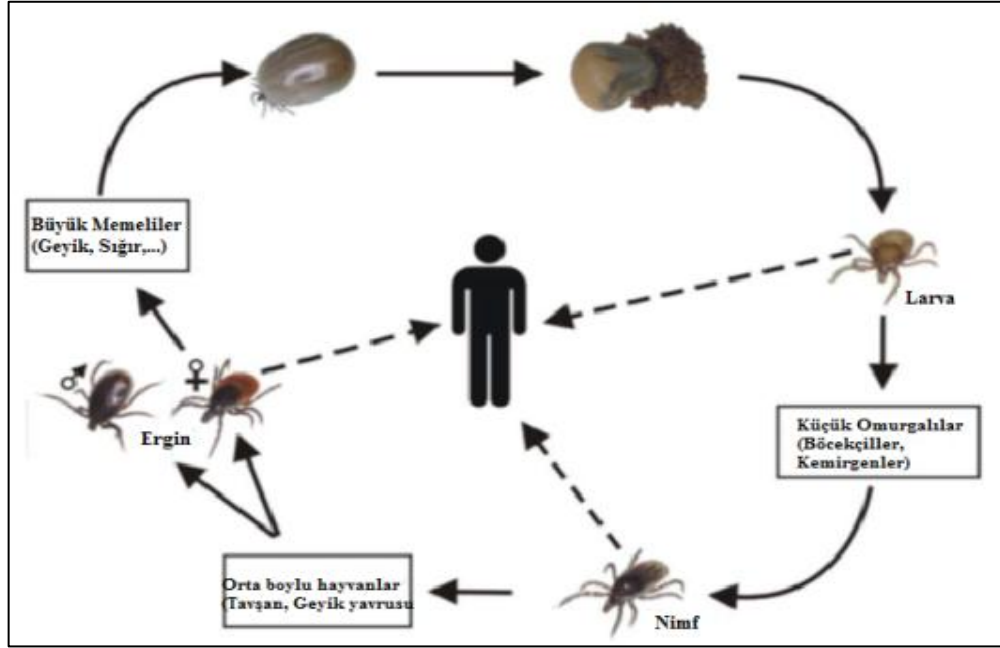
2.1.2. Kenelerin Yaşam Döngüleri

Sert kenelerin yaşam döngüleri, larva, nimf ve erişkin olmak üzere üç evreden ibarettir. Bu döngü, erkek kenenin dişiyle çiftleşmesi sonucunda başlar. Doyduktan sonra konağı terk eden dişiler, bulundukları yerde (bitki örtüsü veya mesken) kendilerini emniyete alıp yumurtlamaya başlarlar. Yumurtlama işlemi, çevre şartlarına (ısı ve nem) bağlı olarak birkaç gün ile 2-3 haftalık bir sürede tamamlanır. Yumurtlamayı tamamlayan dişiler, yaşamlarını devam ettiremez ve kısa sürede ölürlür. Yumurtalardan çevre koşullarına bağlı olarak birkaç hafta içinde larvalar gelişir ve dışarı çıkar. Bundan sonraki gelişme safhaları (larva, nimf, erişkin), türlere göre bir, iki veya üç konaktan kan emerek tamamlanır (Camicas ve ark., 1998).

Buna göre ixodid keneler bir, iki veya üç konaklı gelişim özelliği gösterirler. *Bir konaklı keneler* (*Boophilus* spp.), deri değiştirme dahil bütün gelişme safhalarını aynı konak üzerinde geçirirler. *İki konaklı keneler*, larva ve nimf dönemlerini bir konakta, erişkin dönemlerini başka bir konakta tamamlar. *Üç konaklı keneler* ise larva, nimf ve erişkin dönemlerinin her birinde, üç ayrı konaktan kan emerler (kenelerdeki farklı konak tercihleri, vektörlük yaptıkları patojenlerin taşınması ve yayılmasında çok önemlidir) (Şekil 2.2.).

2.1.3. Kenelerde Beslenme

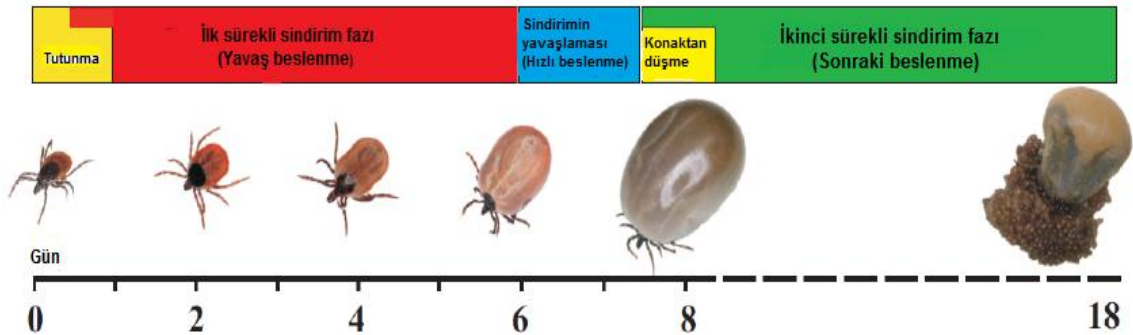
Keneler, keliserleriyle konağın derisini parçalayıp hipostomlarını deri içine sokup, bölgede sabitlendikten sonra beslenmeye başlarlar. Keneler, konak kanıyla beslenme sırasında salgıladıkları tükrük salgısıyla, taşıdıkları patojenleri konağa geçirirler veya konakta bulunan patojenleri alırlar. Patojenleri taşımalarının yanısıra kene tükrük salgısında kenelerin kan emmesini kolaylaştıran çok çeşitli kan pıhtılaşmasını önleyici ve immün cevabı baskılayıcı moleküller bulunmaktadır (Gooding, 1972; Ribeiro, 1988; Fogaca ve ark., 1999; Sonenshine ve ark., 2005; Miyoshi ve ark., 2007). Sert kenelerin yaşam döngüleri sırasındaki beslenme periyodu ve beslenmeye bağlı gelişimleri Şekil 2.3.'te şematize edilmiştir.



Şekil 2.2. Üç Konaklı Kenelerde Yaşam Döngüsü (Franta, 2012)

2.1.4. Kene-konak ilişkisi

Zorunlu kan emici dış parazitlerden olan keneler, bütün yaşam dönemlerinde konaklarından kan emmek zorundadırlar. Konak yelpazeleri oldukça geniş olup, memeli, kanatlı, sürüngen ve amfibik hayvanlardan kan emebilirler. Gelişme safhalarının tamamını memeli hayvanlarda geçirebildikleri gibi, bu safhalardan birini veya ikisini kanatlıda, diğerini memelide de tamamlayabilirler (Sonenshine, 1993a, 1993b; Camicas ve ark., 1998).



Şekil 2.3. Sert Kenelerin Beslenme Periyodu (Franta, 2012) (Ergin dişi *Ixodes ricinus* yaklaşık olarak 7-8 gün beslenir. Yavaş beslenme periyodunda (ilk sürekli sindirim fazı) emeceği toplam kanın üçte birini konağa tutunduktan sonra, asıl kanı da çiftleşmeden sonra alır ve sindirimini 24-48 saat içinde tamamlar ve konaktan düşer. Ayrılmadan sonraki beslenme periyodunda (ikinci sürekli sindirim fazı) dişi yumurtlama evresini tamamlar ve ölür. Bu periyod yaklaşık 10 gün sürer)

2.1.5. Kene-patojen ilişkisi

Keneler, konak olarak yararlandığı insan veya hayvanlarda direkt ve indirekt etkiler oluştururlar. Kan emdikleri konaklarında güç kaybı, verim düşüklüğü, hatta küçük hayvanlarda aşırı anemi dolayısı ile ölümlere sebep olurlar. Bazı türlerin (*Dermacentor* spp., *Amblyomma* spp., *Ixodes* spp. vs.) tükürük salgısında bulunan birtakım bileşikler, konakta toksik etki oluşturmak suretiyle kene felcine neden olabilirler (Cunha ve Burke, 2000). Direkt etkilerinin dışında, kenelerin konaklarındaki esas zararlı etkileri, yaşam tarzları itibarı ile kan emme ve konak değiştirme özelliklerine bağlı olarak virüs, bakteri, riketsia, protozoon ve helmint gibi birçok hastalık etkenini nakletme kabiliyetine sahip olmalarıdır.

Larva ve/veya nimf döneminde hastalık taşıyıcısı konaklardan kan emen keneler, kanla birlikte bu etkenleri de alır ve bir sonraki gelişme döneminde kan emdiği başka bir konağa naklederler (transstadial nakil). Aynı şekilde, erişkin dönemde enfekte konaktan kan emen dişiler, hastalık etkenlerini yumurtalarına ve bu yumurtadan çıkan yeni nesil larvalara taşıyabilirler (transovarial nakil). Böylece insan ve hayvanlarda hastalığa neden olan çok sayıda patojenin doğal odaklardaki devamlılığı sağlanmış olur. Transtadial yolla nakilde, bazı patojenlerin (*Rickettsia rickettsii*, *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Theileria annulata* vs.) duyarlı konağa verilebilmesi ve geçişin olabilmesi için patojenin önce enfekte kenede yeniden aktive olması veya çoğalması gerekir (Minjauw ve McLeod, 2003).

2.2. Kenelerin Neden Olduğu Hastalıklar

Bir kenenin gerçek anlamda vektör olduğuna karar vermek için kenenin larva ve/veya nimf döneminde kan emdiği viremik bir konaktan virüsü alabilmesi, deri değiştirme aşamaları sırasında muhafaza etmesi ve takip eden gelişme dönemlerinde bunu duyarlı başka konaklara verebilmesi gerekmektedir (transstadial nakil) (Kahl ve ark., 2002; Jongejan ve ark., 2004). Aynı şekilde, erişkin döneminde enfekte konaklardan kan emen bir dişi kenenin virüsü yumurtalarına aktarabilmesi (transovarial nakil) de vektörlük işareti olarak kabul edilmektedir. (Spielman ve ark., 2000; Jongejan ve ark., 2004; Turell, 2007).

Keneler barındırdıkları hastalık etkenlerini tükürük salgısı (Arboviruslar, *B. burgdorferi*, benekli humma grubu rickettsialar), coxal sıvı (relapsing fever grubu rickettsialar),

kusma (*Ehrlichia ruminantium*, bazen *B.burgdorferi*) ve dışkı (*Coxiella burnetii*) ile verebilse de, kenelerle bulaşan hastalıkların en önemli bulaşma yolu tükürük salgısıdır (Lane, 1994). Tükürük salgısı ile etkenlerini konağa verilmesi bazen zaman alabilmektedir. Virüsler, kene kan emmeye başladıktan 5-6 saat sonra verilebildiği halde, *Rickettsia* türleri 10 saat, *Borrelia* türleri ise 48 saat sonra verilebilmektedir (Lane, 1994; Spielman ve Hodgson, 2000). Kenelerin etkin vektör olmasını sağlayan en önemli unsurlardan birisi, sahip oldukları tükürük salgısının özellikleridir. Bu salgı, konak direncini baskılayan birçok faktörün yanında, hastalık etkenlerinin konakta barınabilmesini ve enfeksiyon oluşturabilmesini sağlayan faktörleri de içermektedir (Piesman ve ark., 1990; Labuda ve ark., 1993). Zoonoz hastalıkların, özellikle de vektörlerle bulaştırılanların epidemiyolojisinde Evgeny N. Pavlovsky'nin tanımladığı hastalıkların doğal odakları (Natural nidality of the infections) kuramı yatmaktadır. Bu kurama göre, zoonoz karakterdeki patojenler ekosistemin bir parçasıdır ve yabani memeli konak ile artropod arasında geçişlerle varlıklarını devam ettirmektedirler (Kahl ve ark., 2002; Balashov, 2005). Kenelerle bulaştırılan hastalıkların yayılışı belli arazi yapıları ve iklimle sınırlıdır. Bu gibi hastalıkların doğal odakları zaman ve mekan içinde sabit olup, keneler buralarda hem vektör, hem de hastalık etkenlerinin rezervuarı olarak işlev görürler (Balashov, 2005).

Kenelerle hastalık arasındaki ilişki ilk kez Smith ve Kilborne (1893) tarafından sığır felcine neden olan *Babesia bigemina* protozoonunun *Boophilus (Rhipicephalus) microplus* keneleri tarafından sığırlara taşınmasının tespiti ile başlamıştır (Sonenshine ve ark., 2002). Bundan sonra 20. yy.'ın son 10 yılından başlayarak 21. yy.'da kene kökenli hastalıkların artması sonucunda keneler, evrensel bir sorun haline gelmiştir. Bu hastalıklar içinde kene kökenli ensefalit (TBE)'nin Doğu ve Orta Avrupa'da, Kyasanur Orman Hastalığı (KFD)'nin Hindistan'ın Karnaka Eyaleti'nde, KKKA Hastalığının Türkiye'nin kuzeyinde (Şekil 2.4.) ve Rusya Federasyonu'nun güneybatı bölgesinde ve Rocky Mountain Ateşli Humması (RMSF)'nin A.B.D.'nin Arizona ve Baja Kaliforniya'da ciddi anlamda artması bu evrensel soruna örnek gösterilebilir (Randolph, 2008; Pattnaik, 2006; Maltezu ve ark., 2010; McQuiston ve ark., 2010; Moreno ve Méndez, 2010).

Özellikle son 30 yılda diğer kene kökenli hastalıkların sayısında da artış görülmüştür. Örneğin 1984'ten beri gözlenmeyen riketsiyöz tifüs vakası yeniden çoğalmıştır (Raoult

ve ark., 1996; Parola ve ark., 2005; Paddock ve ark., 2008; Shapiro ve ark., 2010). A.B.D.'de, yalnız 2 kene kökenli hastalık, RMSF ve Tularemi, 1990-1998 arası ulusal olarak bildirilen, bu listede 3 yeni enfeksiyon Lyme Hastalığı, İnsan Granülosit Ehrlichiozis (Anaplazmozis) ve İnsan Monositik Ehrlichiozis (*Ehrlichia chaffeensis* enfeksiyonu) yıllık ortalaması gittikçe artan hastalıklardır. Lyme Hastalığı, A.B.D.'de 1992-2006 yılları arasında %101 oranında artmıştır (Bacon ve ark., 2008). RMSF hastalığının 1,7 milyondan 9,4 milyona çıkması oldukça dramatiktir (Openshaw ve ark., 2010). 2000-2007 yılları arasında *A. phagocytophilum* ve *E. chaffeensis*'in neden olduğu enfeksiyonların oranı da sırasıyla 0,8'den 3,0'e ve 1,4'ten 3,0'e yükselmiştir (Dahlgren ve ark., 2010). Dünya genelinde kenelerin taşıdıkları patojenler, bunların sebep olduğu hastalıklar ve coğrafi dağılımları Çizelge 2.1 de verilmiştir.

2.3. Mikrobiyom

Mikrobiyom, bir canlının vücudunda bulunan bakteri, virüs, fungus, protozoa, gibi mikroskobik canlıların tümüne ve onların genomlarına verilen addır. Mikrobiyom çalışmaları sadece bakterilerle yapılırsa *bakteriyom* ismini almaktadır (Bosch ve McFall-Ngai, 2011).

Mikrobiyom çalışmaları özellikle moleküler teknolojilerin gelişmesiyle birlikte hızlı bir şekilde artmıştır. Mikrobiyom çalışmaları, çoğunlukla universal 16S-rDNA primerleriyle yapılan PCR ve sekans analizi veya pirosekanslama gibi tekniklerle yapılmaktadırlar.

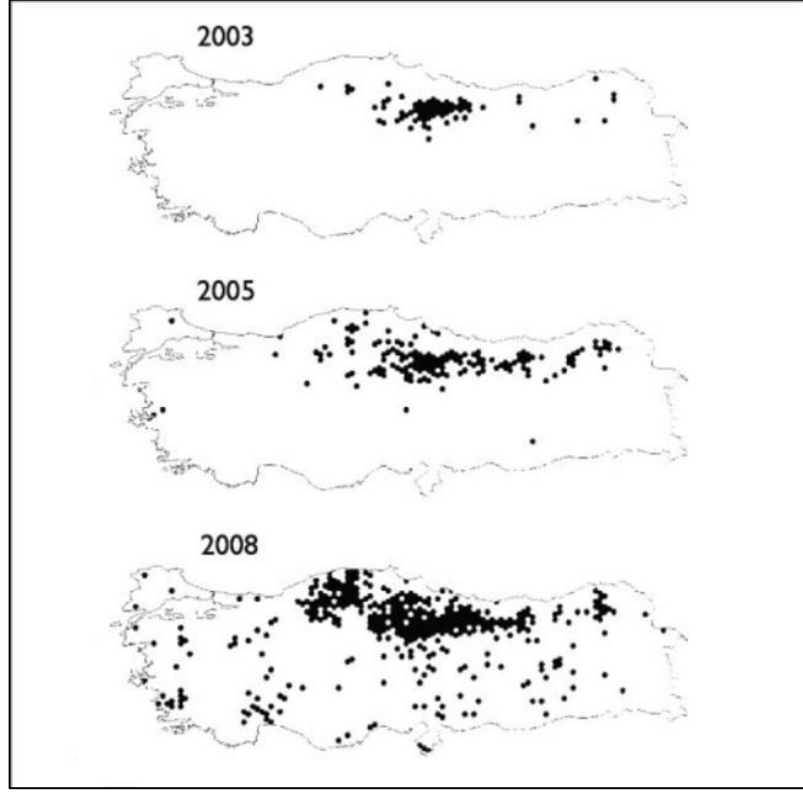
2.3.1. 16S-rDNA Dizi Analizi

Woese ve arkadaşları, bakterilerin ve diğer yaşam formlarının filogenetik ilişkisinin, genetik şifrenin değişmeyen bir bölgesinin kıyaslanması ile saptanabilir olduğunu ortaya koymuştur (Woese ve ark., 1985, 1987).

Bakterilerde 5S, 16S ve 23S rDNA'yı şifreleyen genlerdeki değişmeyen gen bölgeleri bulunmaktadır. Bunlar içinde taksonomik amaçlar için en çok kullanılan DNA parçası 16S rDNA genidir (Bottger, 1989; Palys ve ark., 1997; Kolbert ve Persing, 1999; Garrity ve Holt, 2001). 16S rDNA geni sadece bakteriler arasında değil, aynı zamanda arkebakterilerin 16S rDNA geni ve ökaryotların 18S rDNA geni ile de karşılaştırılabilir.

Çizelge 2.1. Kenelerin taşıdıkları patojenler, sebep oldukları hastalıklar ve coğrafi dağılımları (Dantas-Torres ve ark., 2012)

HASTALIK	PATOJEN	VEKTÖRÜ	COĞRAFİ DAĞILIMI
African tick bite fever	<i>Rickettsia africae</i>	<i>Ambylomma hebraeum</i> , <i>A. variegatum</i>	Afrika, Batı Hindistan
İnsan granülosit anaplazmozis	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Hae. concinna</i> , <i>H. punctata</i> , <i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>Rhipicephalus bursa</i>	Avrupa, Kuzey Amerika
İnsan monositik ehrliyozis	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	<i>A. americanum</i>	Kuzey Amerika
Lyme borreliyozis	<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	<i>Ixodes hexagonus</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>	Asya, Avrupa, Kuzey Amerika
Akdeniz lekeli ateşi	<i>Rickettsia conorii</i>	<i>R. sanguineus</i> , <i>R. turanicus</i>	Afrika,Asya, Avrupa
Q ateşi	<i>Coxiella burnetii</i>	Farklı genusların birçok türünde	Afrika, Asya,Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya
Relapsing ateşli	<i>Borrelia spp.</i>	<i>Ornithoros spp.</i>	Afrika, Asya, Avrupa, Kuzey Amerika
Kayalık dağlar lekeli ateşi	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>A. americanum</i> , <i>A. aureolatum</i> , <i>A. cajennense</i> , <i>Dermacentor andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>R. sanguineus</i>	Kuzey, Güney, Orta Amerika
Tularemi	<i>Francisella tularensis</i>	Farklı genusların birçok türünde	Asya, Avrupa, Kuzey Amerika
Babesiozis	<i>Babesia divergens</i> , <i>B. microti</i>	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>	Avrupa, Kuzey Amerika
Colorado kene ateşi	<i>Coltivirus</i>	<i>Dermacentor andersoni</i>	Kuzeybatı Amerika
Kırım Kongo Kanamalı Ateşi	<i>Naiovirus</i>	<i>A. variegatum</i> , <i>H. punctata</i> , <i>H. anaticum</i> , <i>H. marginatum</i> , <i>H. truncatum</i> , <i>R. bursa</i>	Afrika, Asya, Avrupa
Kyasanur orman hastalığı	<i>Flavivirus</i>	<i>Hae. spinigera</i> , <i>H. turturis</i>	Hint yarıkıtası
Louping Hastalığı	<i>Flavivirus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Batı Avrupa
Omsk kanamalı ateşi	<i>Flavivirus</i>	<i>D. marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Asya
Powassan ensefalit	<i>Flavivirus</i>	<i>Dermacentor andersoni</i> , <i>Hae. longicornis</i> , <i>I. cookei</i> , <i>I. scapularis</i>	Asya, Kuzey Amerika
Kene kökenli ensefalit	<i>Flavivirus</i>	<i>Ixodes persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>H. concinna</i> , <i>H. punctata</i>	Asya, Avrupa



Şekil 2.4. Türkiye’de 2003-2008 yılları arası kene kökenli hastalıkların görüldüğü yerler (Clay ve Fuqua, 2010).

2.4. Simbiyotik Yaşam (Simbiyozis)

Simbiyozis terimi, Yunanca “birlikte yaşamak” anlamına gelmektedir. İlk defa simbiyozis kavramını ortaya atan kişi, 1879 yılında Heinrich Anton de Bary’dir. de Bary simbiyozisi kısaca “Farklı organizmaların birlikte yaşamasıdır” olarak tanımlamaktadır. Türler arasındaki simbiyotik ilişkide, iki tür de birbirine karşı baskın olamamaktadır. Biri diğerine fayda sağlayarak yaşama şansını artırabilmektedir. Simbiyoz yaşamda hiçbir organizma diğer türler olmadan yaşamını sürdürememektedir. Türler arasındaki bu birliktelik yeni organizma veya türlerin oluşması ile sonuçlanmaktadır. Bu simbiyozis, çevrede yaşandığı gibi canlının (konak) vücudunda da meydana gelmektedir. İşte o zaman bu simbiyozis’e *Endosimbiyozis* adı verilmektedir.

Yapılan mikrobiyom çalışmaları sonucunda simbiyozis, *Obligat (Primer Simbiyoz, P-Simbiyoz)*, ve *Fakültatif (Sekonder Simbiyoz, S-Simbiyoz)* olmak üzere sınıflandırılmıştır (Moran ve ark., 2008).

2.4.1. Artropodlarda Bulunan Önemli Simbiyoz Canlılar

Virüsler: Virüsler konusunda, artropodlar içerisinde çoğunlukla, böcekler (Insecta)'de çalışmalar yapılmıştır. Günümüzde yaklaşık 500 böcek türünden 450'den fazla virüs tanımlanarak sınıflandırılmıştır (Demirbağ ve Sezen, 2005). Özellikle böcekler üzerinde önemli bir biyolojik ajan olan virüslerin çoğu *Poxviridae* familyası içinde olanlardır. *Poxviridae* familyası, böcek poksvirüslerini içeren *Entomopoxvirinae* ve omurgalı poksvirüslerini içeren *Chordopoxvirinae* olmak üzere 2 alt familyaya sahiptir. Entomopoxvirinae virüs morfolojisi, konak türü ve genom hacmi bakımından 3 cins ayrılır. Cins A *Coleoptera* grubu virüsleri (*Melolontha melolontha* EPV), Cins B *Lepidoptera* (*Amsacta moorei* EPV) ve *Orthoptera* grubu virüsleri (*Melanoplus sanguinipes* EPV) Cins C ise *Diptera* (*Chironomus luridis* EPV) grubu virüsleri kapsamaktadır.

Virüs grupları içerisinde en önemli grup *Baculoviridae* grubuna mensup virüslerdir. Bunlar 25x250 nm büyüklükte ve 80-180 kbp kapalı yuvarlak ve çift zincir, süpersarmal DNA içerirler (Hayakawa ve ark. 2000, Herniou ve ark. 2001, Theilmann ve ark. 2005). Virüs DNA'sı, hücre zarı yapısına benzer ve karmaşık yapıda olan bir zarf ile çevrili nükleokapsid içerisine paketlenmiştir. *Helicoverpa zea nudivirüs 2* (HzNV-2) nin juvenil hormon esterase geni taşıdıkları tahmin edilmekte ve pulkanatlılarda üreme organlarının aşırı büyümesine neden olarak işlevsiz hale gelmesine neden oldukları rapor edilmiştir (Burand ve ark., 2012).

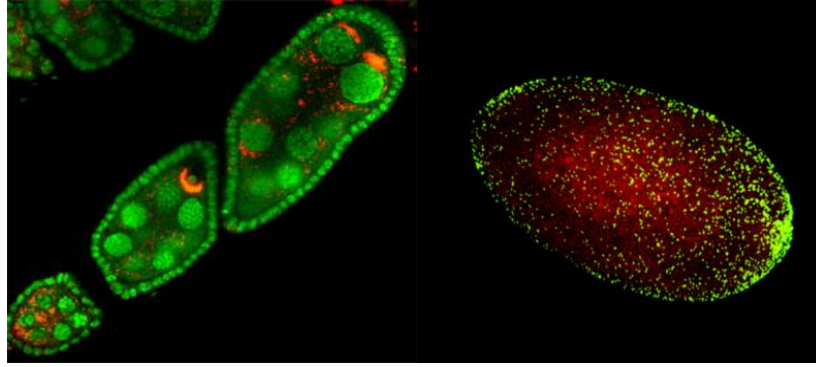
Bakteriler : Kenelerde en çok bulunan canlı gruplarından biridir. Eklembacaklılarda en çok rastlanan ve entomopatojenik özelliğe sahip bakterilerden bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Wolbachia : *Anaplasmataceae* familyasına ait (Scola, 2005) gram negatif bakterilerdir. Bunlar obligat, hücre içi organizmalar olup, artropodların üreme ile ilgili dokularında bulunurlar (Werren, 1997). İnsanlarda hastalık yapmazlar. Konaklarının üremesi üzerine müdahale ederek, sitoplazmik uyumsuzluk, partenogenesis, erkek öldürücülük, virülenslik ve feminizasyon şeklinde üreme değişikliklerine neden olurlar (Doran, 2001).

Bu bakteriler, cinsiyet belirlenmesini bozmakta ve genetik erkekler, fonksiyonel fenotipik dişilere dönüşmektedir. Crustacealarda, cinsiyet farklılığı, androjen bezler

tarafından üretilen erkeklik hormonları ile kontrol edilmektedir. Eğer androjen bezleri farklılaşması varsa, hormon, erkek gelişimini teşvik etmektedir. Androjen bez farklılaşması yoksa dişi gelişmesi gerçekleşmektedir. *Wolbachia*, konukçunun feminizasyonunu teşvik eden bezlerin gelişimini baskılayarak erkekleri dişilere dönüştürmektedir (Werren, 1997; Charlat, 2000; Doran, 2001). Bakteri, selektif olarak enfekte ettiği erkek yumurtaları öldürmektedir. 1950'li yıllarda *Culex spp.*'de tür içi çaprazlamalarda uyumsuzluk olduğu, ya çok az nesil üretebildikleri, ya da hiç üretemedikleri keşfedilmiştir. Bu durum, daha sonra *sitoplazmik uyumsuzluk* olarak isimlendirilmiştir.

Wolbachia, *ftsZ* gen sekansına bağlı olarak A'dan F'ye kadar altı gruba ayrılmıştır. *Wolbachia*'nın A ve B ırkları böceklerin büyük bir kısmını, C ve D ırkı nematodları, E ırkı Collembolaları, F ırkı da termitleri enfekte etmektedir (Gotoh ve ark., 2003).



Şekil 2.5. *Wolbachia sp.*

Arsenophonus nasoniae: Gammaproteobacterium bakteri grubu içerisinde yer almaktadır. Endosimbiyont bir bakteridir. İlk defa bir eşekarısı türü olan *Nasonia vitripennis*' ten izole edilmiştir (Ferree ve ark., 2008). Konak türleri çeşitliliği böcekler başta olmak üzere diğer eklembacaklılar ve bazı bitkiler olarak geniştir. Hücre kültürü dışında klasik kültürle de çoğaltılabilir. Özellikleri kısaca, üremede tahribat yapma (erkek öldürücülük), fitopatojenite şeklinde parazitlik ve zorunlu mutualizmdir. Konak fenotipinde yaptığı etkiler bilinmemektedir. Yapılan rRNA filogenetik analizlerde yüksek oranda bakteriyel çeşitliliği olan bir gruptur. Konak spesifikliğı bulunmaktadır, bunlar keneler, bitkiler, tahtakurusu türleri, beyaz sinekler, ve karıncalardır. Dikey olarak anneden yavruya taşındığı gibi yatay olarak da taşınır.

Cardinium hertigii : *Cardinium*, Flexibacteriaceae familyasına mensup, gram negatif, çubuk şekilli bir bakterilerdir ve ilk defa *Ixodes scapularis* kenesinden izole edilmiştir (Kurti ve ark., 1996). Özellikle *Hymenoptera*, *Hemiptera*, Akarlar ve *Areneae* (Hunter ve ark., 2003; Matalon ve ark., 2007; Weeks ve ark., 2003; Zchori-Fein ve ark., 2001, 2004a, 2004b; Zchori-Fein ve Perlman, 2004; Enigl ve Schausberger, 2007; Hoy ve Jeyaprakash, 2008; Duron ve ark., 2008) gruplarında sınırlı olarak bulunmuştur. Konaklarındaki etki şekli büyük oranda *Wolbachia* bakterilerinin etki şekli gibidir. Özellikle örümcek akarı *Estetramychus suginamensis* 'te parazittirler (Gotoh ve ark., 2007).

Spiroplasma : *Mollicutes* sınıfı bakterilerdir. Bazı türleri artropod türüne göre spesifiktir. *Spiroplasma apis* ve *Spiroplasma melliferum* balırlarında patojendir. *Spiroplasma penaei* ise beyazsineklerde patojenik etki gösterir (Gasparich ve ark., 2004; Regassa ve ark., 2006). *Spiroplasma ixodetis*'in kenelerde, *Ostrinia zaguliaevi*'nin de güvelerde (özellikle güvelerin dişilerinde) folikül zarında yerleştiği bildirilmiştir (Tabata ve ark. 2011).

Bacillus thuringiensis : Böcekler ile biyolojik mücadelede uzun yıllardır kullanılan bir entomopatojen bakteri türüdür. *B. thuringiensis*, gram pozitif ve endospor oluşturma özelliğinde bir bakteridir. Endosporun oluşturulması sırasında bakteri kristal görümlü bir toksin (endotoksin) sentezler (Gill ve ark., 1992). Bunların biyoinsektisit olarak pratikte kullanılmasını sınırlandıran bazı sebepler vardır. Bunlardan en önemlisi, Bt preparatlarının uygulama sonrası çevresel etkenler (sıcaklık, UV ışınları) nedeniyle kalıcılığının düşük olmasıdır. Bu tip problemler sebebiyle *B. thuringiensis* endotoksin (Bt) geni klonlanarak bitkilere aktarılmaya başlanmıştır. Bt genini içeren ilk transgenik bitki tütün olup, 1987 yılında *Agrobacterium tumefaciens* t-DNA'sının vektör olarak kullanılmasıyla Belçika'daki bir biyoteknoloji şirketi tarafından geliştirilmiştir (Pedersen ve ark., 2002; Stein ve ark., 2005).

Sodalis glossinidius : *Enterobacteriaceae* familyasına mensup, fakültatif kommensal bir bakteridir (Dale ve ark., 1999). Son zamanlarda çeşesineklerinde bulunduğu gibi diğer sinek türlerinde de bulunmuştur (Weiss ve ark., 2006). Tüm sinek topluluklarında yapılan araştırmalarda en fazla çeşesineği türlerinde bulunduğu görülmüştür. Daha çok bağırsak, salgı bezleri, tükürük bezleri, kaslarda görülmüştür. *Sodalis*, uzun zaman

çeçesineği vektörlüğünde her yere taşınır. Uyku hastalığı etkeni *Trypanasoma* ile pozitif uyum içerisindedir. Bu nedenle de Çeçesineği'nde bu bakteri yoksa *Trypanasoma*'nın enfeksiyonu durmaktadır.

Buchnera sp. : Genelde yaprak bitinde simbiyoz yaşayan bir bakteridir. Arjinin sentezinde konak ile ortak çalışır. Burada *Buchnera*, kendisine gereken tirozini metabolize edemediğinden, oluşturduğu fenilpirüvatı konağına verir, konak da bunu fenilalanine çevirerek tekrardan *Buchnera*'ya verir. Yine aynı şekilde konak reaksiyona devam ederek tirozin dönüşümünü gerçekleştirir ve bu atık maddeyi *Buchnera*'ya verir. Konak canlı, *Acrythosiphum pisum* (yaprak biti), tirozini yıkmaktan kurtulur (Wilson ve ark., 2010).

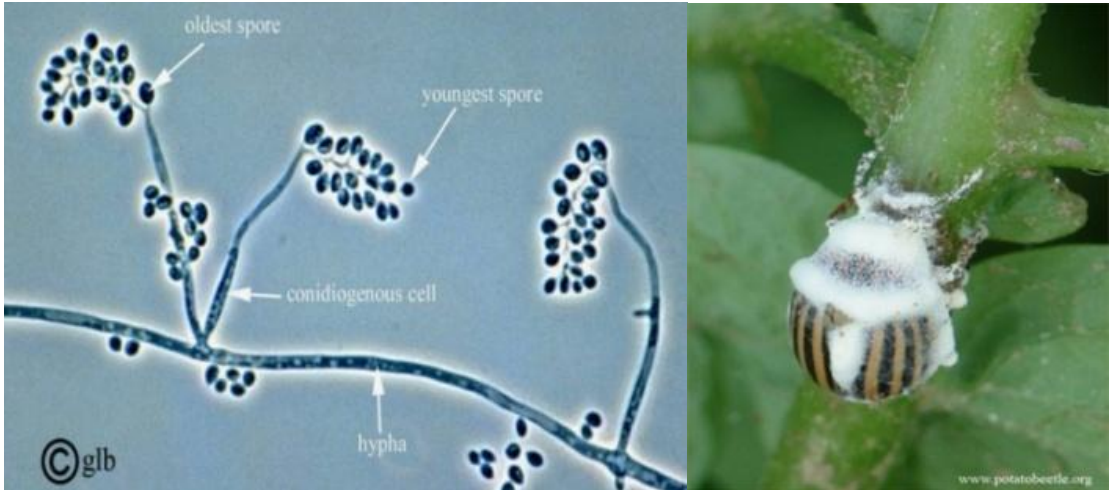
Diğer Bakteri Türleri : Özellikle sivrisinekler, *Asaia*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Serratia* ve *Chryseobacterium* cinsi bakterileri de barındırırlar (Favia ve ark., 2007, Dong ve ark., 2009, Zouache ve ark., 2011). Bunların içinde en baskın olanlar, *Asaia* cinsi bakterilerdir. Bu bakteriler, α -*proteobacterium* bakterilerinin *Acetobacteriaceae* familyasına aittir. *Anopheline* ve *Aedes* cinsi sivrisineklerden izole edilmiştir (Damiani ve ark., 2010). Yapılan analizlerde *A. gambiae* türünde yapılan incelemede *Asaia* bakterisi yoğun olarak yumurtalarda bulunmuş, muhtemelen de anneden yavruya geçmiştir (Damiani ve ark., 2010). Yapılan araştırmalarda bu bakterinin sivrisineğin epitel dokusunda enfeksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir (Favia ve ark., 2007, 2012).

Bir koleopter olan *Rhyzopertha dominica* ile yapılan çalışmalar, *Aeromonas liquifaciens* adlı bakterinin bu böcekte başlıca yaşamsal vitaminleri, nitrojeni ve selülozu yıkıcı özellikler gösterdiği bulunmuştur (Anand ve Pant, 1978; Vasquez-Arista ve ark., 1997; Douglas, 2000).

Mantarlar : Mantarlar eklembacıklılarda bulunan ve entomopatojenik potansiyele sahip olabilen önemli mikroorganizmalardan biridir. Entomopatojen mantarlar akarların önemli doğal düşmanlarından biridir (Davidson ve ark. 2003; Benoit ve ark. 2005). Bazı akar salgılarının fungusların gelişmesine yardımcı olduğu bilinmekle birlikte, bazı fungusların da akarlarda parazit olduğu gösterilmiştir. Patojen fungusların *Astigmata*, *Oribatida*, *Prostigmata*, *Mesostigmata* ve *Metastigmata* (*Ixodida*) türlerini öldürdüğü ifade edilmiştir (Doğan ve ark. 2003). Esasında fungusların misel ve sporları kolayca

tanınabildiği için, akar patojenlerinin en sık rastlanan grupları arasında bulunmaktadır (Poinar ve Poinar, 1998). Deacon (1983), entomopatojen fungusların diğer mikroorganizmalara göre çok daha geniş konukçuya sahip olduğunu ve *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Coleoptera* ve *Diptera* takımlarına bağlı türlerde enfeksiyon yaptıklarını bildirmiştir. Bunlardan, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* ve *Lecanicillium lecanii*'nin tüm dünyada yaygındır (Deacon 1983).

Beauveria bassiana: Doğada geniş yayılım gösterir ve yaklaşık 70 kadar zararlı böceğe karşı kontrol potansiyeline sahip entomopatojenlerdendir. *Eustigmaeus segnis* (Koch) ve *Galumna* sp. akarlarından izole edilmiştir. Bu fungus, böceklerle karşı konidial spreyler şeklinde uygulanmaktadır. Bunun yanında *B. bassiana* hedef olmayan çok sayıda organizmaya da zarar vermemektedir (Sáenz-de-Cabezón Irigaray ve ark., 2003). *Beauveria bassiana* böceklerde “beyaz muskadin” olarak bilinen bir hastalığa sebep olmaktadır. Bu fungusun sporları böceklerin üst deri tabakası ile temasa geçtiği zaman çimlenirler ve doğrudan üst derisinden konakçılarının vücutlarının içine doğru büyürler. Fungus, toksin üreterek ve böceğin gıdalarını kurutarak vücudunda hızla çoğalır. Bal arılarında parazitlenen *Varroa destructor* akarlarından elde edilen *B. bassiana* izolatu, bu akarlarla parazitlenen bal arılarının (*Apis mellifera*) tedavisinde kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Meikle ve ark. 2006, 2007).



Şekil 2.6. *B. bassiana* (mikroskop altında görüntüsü ve böceklerde yaptığı küf benzeri yapı)

Lecanicillium lecanii : Bu tür, küçük vücutlu birçok arthropodlarda, afitler, thripsler ve beyazsineklerde patojendir ve diğer funguslar gibi canlı olmayan organik substratlarda beslenir ve bir saprofit gibi hareket edebilir (Deacon, 1983). *L. lecanii* seralarda ilk enfeksiyon inokulumu mevcutsa doğal epidemi meydana getirebilir. *L. lecanii* günde 10–12 saat, 15-25 °C’ sıcaklık ve % 85–90 nisbi nemde rahatlıkla gelişir. *L. lecanii*’nin spor solüsyonu *B. tabaci* ve *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.)’un yumurta, birinci, ikinci ve üçüncü dönem nimfleri ile bulaşık *Euphorbia* ssp. yapraklarına sprey edildiğinde *T. vaporariorum*’da % 79-96, *B. tabaci*’de ise % 89- 96’dan daha fazla ölüm meydana getirdiği saptanmış, beyazsineğin hem yumurtaları hem de erginleri nispeten *L. lecanii* enfeksiyonuna dirençli olup, %1’den daha az bir ölüm görülmüş, *L. lecanii* daha çok seralarda hıyarlarda zararlı olan *T. vaporariorum* ve kavunlarda zararlı olan *B. tabaci*’nin kontrolü için kullanılmakta, *L. lecanii* ile birlikte asla eşzamanlı olarak herhangi bir fungusit kullanılmaması gerektiği bildirilmektedir (Hoddle, 1999). *L. lecanii*, beyazsineklerin kontrolünde birçok ülkede ticari olarak kullanılan biyopestisitlerin başında geldiği kaydedilmektedir (Lipa, 1985, 1996).



Şekil 2.7. *Lecanicillium lecanii* (mikroskop altında görüntüsü ve böceklerde yaptığı küf benzeri yapı)

2.4.2. Kenelerde Simbiyoz

Birçok bakteri türünün (*Rickettsia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Buchnera aphidicola*, α -cyanobacterium , β - cyanobacterium, *Sodalis glossinidius*, *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Ruminococcus* spp. ve *Faecalibacterium* spp., *Coxiella* spp.)simbiyont olarak kenelerde bulunduğu bilinmektedir (Eremeeva ve ark., 2007; Barker ve ark., 2004; Moreno ve ark. 2006, Reyes-Prieto ve ark. 2010; Dale

ve Maudlin 1999; Yuan, 2010; Noda ve ark. 1997; Andreotti ve ark. 2011). Bu bakteriler, kenelerin genellikle gut (bağırsak), ovary (yumurtalık), yumurta, mitokondri, tükürük bezleri'ne yerleşirler.

2.5. Biyolojik Mücadele (Biyolojik Kontrol)

Doğada hemen her türün çoğalmasını frenleyen doğal düşmanları ya da predatörleri, parazitoitleri ve patojenleri bulunmaktadır. İşte zararlıların popülasyonunu azaltmak ve zararsız halde, yani baskı altında tutabilmek için, canlı organizmalardan faydalanılarak yapılan mücadele şekline *Biyolojik Mücadele* denir (Doutt, 1964; Hagen ve Franz, 1973; DeBach, 1974).

Biyolojik mücadele, özellikle tarım zararlısı canlılar olmak üzere hayvan, bitki endüstrisine etkili olan canlılar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu canlıların büyük bölümünü de böcekler oluşturmaktadır.

Biyolojik mücadelede mikroorganizmalar kullanılarak yapılan ilk çalışmalarda funguslar ve *Bacillus thuringiensis* bakterisi kullanılmıştır. Bu ve benzeri organizmalarla yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin, 1726 yılında de Reaumur, ilk böcek patojeni olan *Cordyceps* cinsi mantarları keşfetmiş, 1834 yılında bu mantarlar, afitlerle yapılan biyolojik mücadelede kullanılmıştır. 1911 yılında Berliner'in tanımladığı *Bacillus thuringiensis* bakterisinin Akdeniz ungüvesinde hastalığa sebep olduğu bulunmuş ve bu canlıya karşı biyolojik ajan olarak kullanılmıştır (Van Driesche ve Bellows, 1996).

2.5.1. Kenelerde Yapılan Biyolojik Mücadele Çalışmaları

Böceklerin aksine kenelerin biyolojik kontrolüyle ilgili uygulamalar çok sınırlıdır. Kenelere karşı biyolojik mücadele için kullanılabilecek çok sayıda doğal düşman olduğu düşünülmesine rağmen bunlardan sadece birkaçının kenelerin biyolojik mücadelesinde uygun olabileceği belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle entomopatojen funguslardan *Beauveria sp.*, *Metarhizium sp.*, *Nomuraea sp.* ve *Paecilomyces sp.* türleri (Campos ve ark., 2010; Perinotto ve ark., 2012), entomopatojen nematodlardan *Steinernema* ve *Heterorhabditis* türleri (Samish ve Glazer, 2001), parazitoit hymenopterlerden *Ixodiphagus* türleri (Plantard ve ark., 2012) ile kuşlardan *Buphagus africanus* ve *Buphagus erythrorhynchus* türlerinin kenelerin biyolojik

mücadelesinde potansiyel öneme sahip olabilecekleri rapor edilmiştir. Lubeck ve ark. (2008), Leemon (2009) ve Kaaya (2011) ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda *Metarhizium anisopliae* suşlarının keneler üzerinde % 90-100 oranında etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki bakterisi ve bazı suşlarının (Samish ve ark. 2004), *Wolbachia sp.* türlerinin (Noda ve ark., 1997) ve *Chryseobacterium indologenes* bakterilerinin (Burenová ve ark., 2006) kenelerin biyolojik kontrolünde kullanılabileceği düşünülmektedir. Fernández-Ruvalcaba ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmalarda *Bacillus thuringiensis*'in kimyasal pestisitlere dayanıklı *R. microplus* türüne önemli zarar verdiği bulunmuştur.

Bir bölgede ve/veya yöredeki keneleri tamamen yok etmek, kenelerin kullandığı arakonaklar ve coğrafik özellikler düşünüldüğünde olanaksızdır. Fakat doğru ve kombine yöntemlerle (Kimyasal ve doğal ilaçlar, entomopatojenik bakteri ve mantarlar, virüsler) kenelerin bir bölgede kene popülasyonlarının kontrol altına alınmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kenelerin Toplanması

Bu çalışmada kullanılan kene örnekleri (17 *Haemaphysalis parva* ve 1 *Hyalomma marginatum* türü), 40°19'37" K ve 36°28'95" D koordinatları arasında bulunan Tokat İli Gaziosmanpaşa Üniversitesi Taşlıçiftlik Yerleşkesi ve çevresinden, 40°34'45" K ve 37°01'27" D koordinatları arasında bulunan Niksar İlçesi Gülbayır Köyü ve çevresinden toplanmıştır (Şekil 3.1.).

Kene örnekleri, doğrudan hayvanlar üzerinden (Çizelge 3.1.), veya araziden *Bayraklama Tekniği* ile 1x1,5 m boyutlarında bir kumaş bayrağın arazi ve bitkiler üzerinde gezdirilmesi suretiyle toplanmaya çalışılmıştır. Bazı durumlarda da toprak, bitki ve hayvanlar üzerinden keneler pens yardımıyla toplanmıştır.

Toplanan kene örnekleri laboratuvara canlı olarak getirilmiş, kenelerin tür tayinleri, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyoloji Bölümü Akaroloji Laboratuvarı ve Kene Müzesi'nde Yrd. Doç. Dr. Ahmet BURSALI ve Uzm. Adem Keskin tarafından, Estrada-Peña ve arkadaşları (2004), Apanaskevich ve Horak (2008) tarafından verilen kene tayin anahtarları kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra keneler %70'lik etil alkol içerisine atılarak bir kez yıkandıktan sonra açıkta kurumaları sağlanmış, hazırlanan LB Broth sıvı besiyeri ve gliserin içerisine alınmış ve bakteri kültürü yapılncaya kadar -20° C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Kenelerin toplandığı yerler (Google Earth programından)

3.2. Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması

3.2.1. Luria-Bertani (LB Broth) Hazırlanması

LB Broth, mikroorganizmaların, uygun ortam koşullarında uzun zaman hayatta kalmaları için önemli olan ve yaygın olarak kullanılan bir sıvı besiyeridir.

Besiyeri içeriği (gram/litre): 10 gr Trypton, 5 gr Yeast extract, 10 gr NaCl.

Besiyerinden 25 gram hassas terazide tartıldı ve üzerine 1 litre deiyonize su eklendi. 10 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda tamamen homojen bir renk alıncaya kadar karıştırıldı. Ağzı alüminyum folyo ile sıkıca kapatılarak otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilizasyona maruz bırakıldı. Otoklavdan çıkarılarak oda koşullarında soğuması sağlandı.

3.2.2. Luria-Bertani Agar (LB Agar)

LB Agar, içerisindeki agar nedeniyle katı besiyeri olarak bilinir. Çoğu mikroorganizmanın yaşaması için uygun olduğundan genellikle bu katı besiyeri kullanılır.

Besiyeri içeriği (gram/litre): 10 gr Trypton, 5 gr Yeast extract, 10 gr NaCl, 15 gr Agar.

Besiyerinden 40 gram hassas terazide tartıldı ve üzerine 1 litre deiyonize su eklendi. Manyetik karıştırıcıda hem karıştırıldı hem de ısıtılarak homojen bir renk alması sağlandı. Ağzı alüminyum folyo ile sıkıca kapatılarak otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilizasyona maruz bırakıldı. Otoklavdan çıkarılan besiyeri el ile tutulabilecek sıcaklıkta soğutularak petri kaplarına steril kabinde, petri kabının içi tamamen besiyeri kaplanana kadar döküldü. Petri kapları daha sonra besiyerlerinin kurumaması için soğuk ve steril bir ortama konuldu.

3.2.3. 50X Tris Acetate EDTA (TAE) Tamponu

Bu tampon, agaroz jel elektroforezinde kullanılmaktadır. Tamponun hazırlanmasında 242 gr Tris, 57.1 ml Glasiyel asetik asit ve 100 ml 0.5 M EDTA (pH:8) kullanıldı, malzemeler manyetik karıştırıcı yardımı ile homojen bir görüntü alıncaya kadar karıştırıldı. Hazırlanan çözeltinin pH'ı Glasiyel asetik asitle 8.5'e ayarlandı ve toplam

hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilizasyona maruz bırakıldı. Steril edildikten sonra +4 °C’lik soğutucuya konuldu.

3.2.4. PBS (Fosfat Tamponu)

PBS, DNA pürifikasyonu sırasında ortamda DNA’yı istenmeyen maddelerden temizlemek için kullanılır. Üreticinin (Sigma-Aldrich) sunduğu protokole göre 500 ml otoklavlanmış deiyonize su içerisine 4,8 gram PBS powder eklenerek hazırlandı.

3.2.5. Primerlerin Hazırlanması

Primerler, üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda, 519FB primerine 1 ml, 1392RS primerine ise 1,4 ml Elution Buffer (Roche) eklenerek 100 µM konsantrasyonda hazırlanmıştır. Daha sonra bu primerlerden sık kullanım doğrultusunda 10 µl stok primerden, 90 µl Elution Buffer’dan 10 µM konsantrasyonda primerler hazırlanmıştır. Unv-Bac 27F ve Unv-Bac 1525R primerleri 10 µM konsantrasyonda hazır olarak geldiğinden herhangi bir işlem yapılmamıştır (Bu primerler Prof. Dr. İsa Gökçe’den temin edilmiştir).

3.3. Yöntem

3.3.1. Kenelerin besiyeri içerisinde parçalanması

Keneler, 500 µl Gliserin ve 500 µl LB Broth denilen sıvı besiyeri bulunan 1,5 ml’lik ependorf tüplerinde bistüri yardımıyla mümkün olduğu kadar parçalandı. Parçalama işleminin ardından kene örnekleri -20°C’lik soğutucuya konuldu (Bundan sonra bu tüpler stok tüp olarak anıldı) (Şekil 3.2.-1).

3.3.2. Kene homojenatlarının LB Broth ile dilüsyonunun yapılması

Kene homojenatında yoğun miktarda mikroorganizma olabileceği düşüncesiyle stok tüplerden alınan bir miktar homojenat, yeteri kadar dilüe edildi. Bu dilüsyonda 1 örnek / 9 sıvı besiyeri oranı dikkate alınarak her bir örnek için 6 adet tüpe 900 µl LB Broth konuldu. Bundan sonra birinci tüpe stok tüp’ten 100 µl örnek pipetle alındı ve birinci tüpe konuldu. Birinci tüpün içeriği pipetle çek-boşalt yaparak iyice karıştırılması sağlandı. Birinci tüpten alınan karışımdan pipetle 100 µl alınarak ikinci tüpe aktarıldı.

İkinci tüpte de pipet yardımıyla çek-boşalt yapıldı ve iyice karıştırılması sağlandı. İkinci tüpten alınan 100 µl'lik karışım üçüncü tüpe aktarıldı ve yine aynı işlemler uygulandı. Bu şekilde 6 tüpte de sırasıyla 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 'lık dilüsyonlar yapıldı. Bu tüpler bu şekilde LB Agarlı petri kapları için hazırlandı (Şekil 3.2.-2).

3.3.3. Kene homojenatlarının LB Agar üzerine ekiminin yapılması

Önceden hazırlanan katı besiyerli petri kaplarına tarih, örnek numarası ve katı besiyerinin adı yazıldı. Tüplerde dilüe edilmiş örnekler, pipet yardımıyla 100 µl alınarak petri kaplarına steril kabin içerisinde inoküle edildi. Daha sonra eküvyon çubuğu (Swab) yardımıyla yayma işlemi yapıldı. İşlem tamamlandıktan sonra petri kapları 36,5-37 °C'lik etüvde 1 gün inkübasyona bırakıldı. Bu işlem sonucunda kolonilerin tek koloniye düşmesi amaçlandı (Şekil 3.2.-3).

3.3.4. LB Agar'da bakteri kolonilerinin varlığının gözlenmesi

Petri kaplarında bakteri kolonilerinin oluşup-oluşmadığına bakıldı, koloni oluşumu gözlenmeyen petriler direkt olarak ayrıldı, koloni oluşumu gözlenen petrilerde farklı tek kolonilerden steril kabinde öze yardımıyla örnek alınıp yeni LB Agar üzerine çizgi yayma tekniğiyle ekildi. Koloni oluşumu gözlenmeyen LB Agarlı petriler etüve tekrar konularak 1 gün daha inkübe edildi. Koloni varlığı gözlenen petrilerden öze ile örnek alınıp başka LB Agarlı petriye ekim yapıldı (Şekil 3.2.-4). Çalışmanın genel şeması Şekil 3.2.'de özet olarak gösterilmiştir.

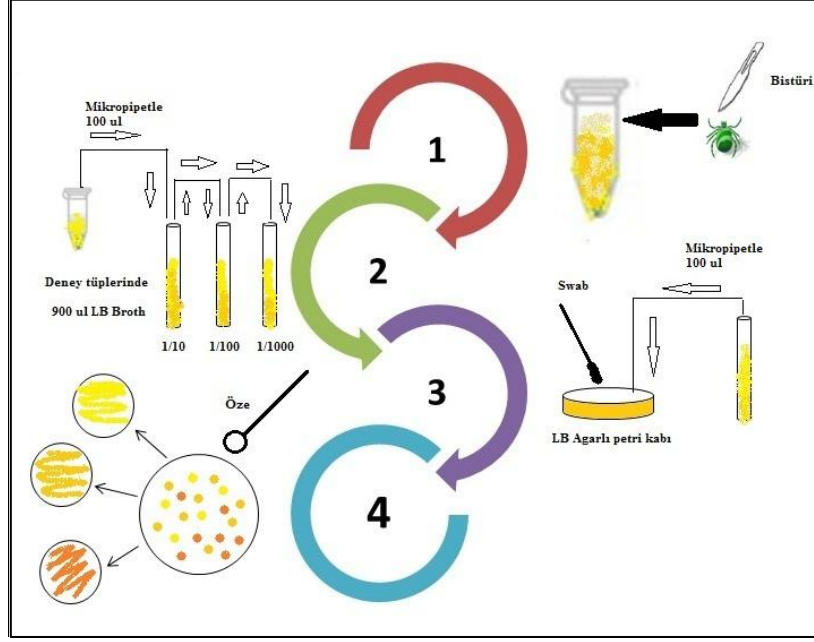
3.3.5. DNA İzolasyonu

Kenelerden elde edilen bakteri kolonilerinden DNA İzolasyonu "High Pure PCR Template Preparation" kiti (Roche) ile üretici firmanın prosedürüne göre yapıldı. Kısaca, saflaştırılan bakteri türlerinden steril kabinde öze ile bir miktar koloni alındı ve önceden hazırlanan, içinde 200 µl PBS bulunan ependorf tüpleri içerisine aktarıldı. Bakterilerin tamamen homojenize olması için sonikatörde parçalandı. DNA izolasyonunun kalan kısmı aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

DNA İzolasyonu

1. Örnekler üzerine 10 µl Lysis buffer tamponu eklendi.
2. Örnekler 3000 RCF'de 1 dakika santrifüj edildi.
3. Örnekler 1-1,5 saat 37°C'de sallamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
4. Örneklerin üzerine 200 µl Binding buffer tamponu ve 40 µl Proteinaz K⁺ eklendi.
5. Örnekler 10 dakika 70°C'lik sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı.
6. Örneklerin üzerine 100 µl izopropanol eklendi.
7. Örnekler için alta koleksiyon tüpü, üstüne de filtreli tüp hazırlandı.
8. Örnekler pipet yardımıyla filtreli tüplere aktarıldı.
9. Örnekler 8000 RCF'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
10. Alttaki koleksiyon tüpleri atılarak yeni koleksiyon tüpleri konuldu.
11. Örnekler 500 µl Inhibitor removal buffer tamponu eklendi.
12. Örnekler 8000 RCF'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
13. Alttaki koleksiyon tüpleri atılarak yeni koleksiyon tüpleri konuldu.
14. Örnekler 500 µl Wash buffer tamponu eklendi.
15. Örnekler 8000 RCF'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
16. Alttaki koleksiyon tüpleri atılarak yeni koleksiyon tüpleri konuldu.
17. Örnekler 500 µl Wash buffer eklendi.
18. Örnekler 8000 RCF'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
19. Alttaki koleksiyon tüpleri atılmadan yüksek hızda 10-15 saniye tekrar santrifüj yapıldı.
20. Alttaki koleksiyon tüpleri atılarak yerine steril ependorf tüpleri konuldu.
21. Filtreli tüplere önceden 70°C'ye ısıtılmış 200 µl Elution buffer tamponu eklendi.
22. Örnekler 8000 RCF'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
23. Ependorf tüpünün dibinde beyazımsı bir şekilde saf DNA gözlendi.

Elde edilen DNA örnekleri PCR işlemi yapılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan yöntemler

3.3.6. Kenelerde Bulunan Bakterilerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Belirlenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu; bakteri, virüs, fungus, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin, primerler (özellik tamamlayıcı oligonükleotitler) ile ısıya dayanıklı enzimleri kullanarak laboratuvar ortamında çoğaltılmasını sağlayan özgün ve güvenilir bir yöntemdir. Üzerinde çalışma yapılan genetik materyal, çok az sayıda ve hatta birçok ilgisiz DNA moleküllerinin arasında olsa bile çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilebilir ve böylelikle kolayca tanımlanabilir. Bu işlemde, kenelerde bulunan bakterilerin DNA'ları kalıp olarak kullanıldı. Çalışmalarında örneklerdeki bakteri türünü belirlemek için uygun primerler kullanılarak PCR yapıldı. PCR reaksiyonlarında enzim olarak Pfu DNA Polimeraz enzimi kullanıldı.

Çalışmada kullanılan primer dizileri ;

519FB: 5'-ATT GGA TCC CAG CMG CCG CGG TAA-3',

1392RS: 5'-TGA GTC GAC ACG GGC GGT GTG TRC-3',

Unv-Bac 27F: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3',

Unv-Bac 1525R: 5'-AAG GAG GTG WTC CAR CC-3'.

PCR Reaksiyon İçeriği : 2,5 µl Pfu buffer, 1 µl dNTP karışımı, 2 µl Forward primer, 2 µl Reverse primer, 0,5 µl Pfu DNA Polimeraz enzimi, 17 µl dH₂O, 3 µl Örnek DNA dan oluşmakta olup, toplam hacim 25 µl olarak ayarlanmıştır (Pfu buffer ve Pfu DNA Polimeraz enzimi Prof. Dr. İsa Gökçe'den temin edilmiştir).

PCR koşulları cihazı (PCR Thermal Cycler)'nda aşağıdaki programlamalar yapıldı.

1. Temp		95 °C	3 dakika
2. 35 cycle	Denaturation	94 °C	1 dakika
	Annealing	56 °C	1 dakika
	Elongation	72 °C	1,5 dakika
3. Son uzama		72 °C	5 dakika

3.3.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürünlerinin varlığı ve boyutları agaroz jel elektroforezi ile belirlendi.

Agaroz jel elektroforezinin aşamaları aşağıda kısaca listelenmiştir:

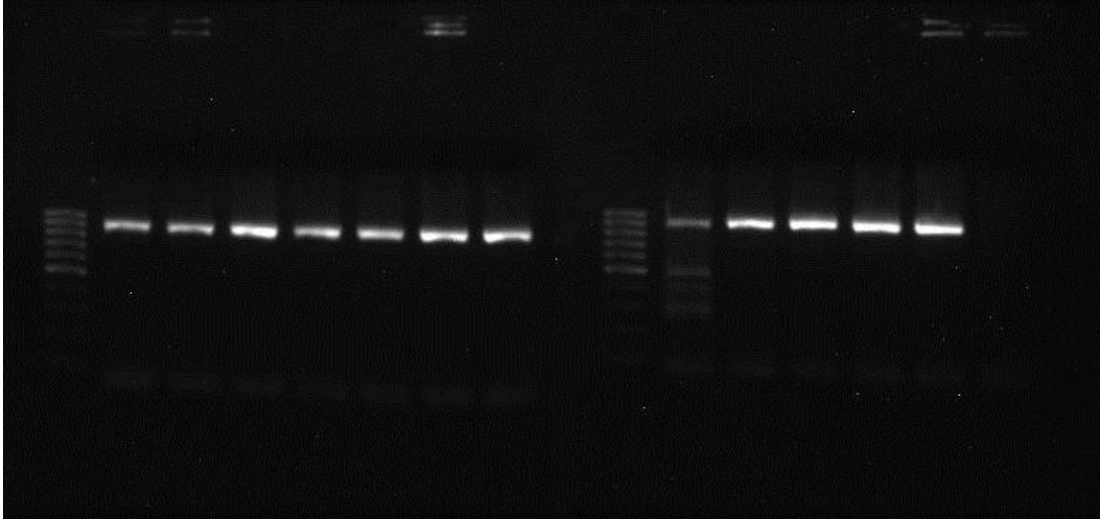
Buna göre, her bir jel için 500 mg toz Agar, hassas terazide tartıldı ve steril behere kondu. Üzerine 50 ml 1x TAE Buffer eklenip, mikrodalga fırında agar tamamen eriyene kadar ısıtılıp karıştırıldı. Tamamen eriyen agar biraz soğutulduktan sonra agar içerisine 0,5 µl Etidyum bromür katıldı ve karıştırıldı. Bundan sonra agar jel kasetine döküldü ve agar tamamen katılaşmaya bırakıldı.

Katılaşan jel tanka konuldu, üzerine yaklaşık 250 ml 1x TAE tamponu döküldükten sonra taraklar çıkarıldı. 5 µl PCR ürünü, 4 µl Bromfenolblue (BFB) ile karıştırıldıktan sonra pipet yardımıyla kuyucuklara pipetlendi. Tankın kapağı kapatıldı ve güç kaynağı 600 V, 200 mA, 80 W, 45 dakika - 1 saat'e ayarlanarak DNA örnekleri koşturuldu. DNA örneklerinin yeterince koştuğu gözlenen jeller tanktan çıkarılarak UV ışını altında gözlemlenmek için UV cihazına kondu ve fotoğraflandı (Şekil 3.3.)

3.3.8. DNA Dizi Analizi

Agaroz elektroforez jeline tek (saf) bantlaşma gösteren örneklerin PCR ürünlerinin 5-10 µl'si, alınarak dizi analizi için Refgen Firmasına yollandı. Elde edilen DNA dizilerinden BioEdit programında (versiyon 7.1.3.0) konsensus sekanslar hazırlandı. Konsensus sekanslar, NCBI'nın BLAST nükleotid arama motorunda

(<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>) homoloji analizine tabi tutularak diğerk bakterilerin rDNA sekanslarına benzerliğine bağılı olarak muhtemel türleri belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Kenelerden izole edilen DNA ile yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde koşturulması ve oluşan pozitif bantlar

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kenelerin birçok patojeni taşıdığı ve bu patojenleri insan ve hayvanlara bulaştırdığı bilinmektedir. Ülkemizde 46 kene türü bulunmasına rağmen, bugüne kadar bunların taşıdığı bakteriler (bakteriyom) hakkında grubumuzun yaptığı pirosekans çalışması haricinde ülkemizde yapılmış detaylı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada Tokat bölgesinden toplanmış *Haemaphysalis parva* ve *Hyalomma marginatum* türü kenelerde bulunan bakterilerin varlığı standart bakteri kültür yöntemiyle araştırılmıştır.

Bu çalışmada, *Hemaphysalis parva* ve *Hyalomma marginatum* türü kenelerde bulunan bakteri kolonileriyle yapılan PCR testleri sonucunda tespit edilen bakteri türleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Burada elde edilen sonuçlar kenelerde çok sayıda bakterinin simbiyont olarak bulunabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada kenelerde bulunan bakterilerin çoğunun toprak ve su kaynaklı olduğu, bir kısmının da konakta beslenme sırasında kenelere bulaştığı düşünülmektedir. Çalışmada kullanılan standart bakteri kültür koşullarının sınırlı olmasına karşın, çok sayıda bakteri kolonisi elde edilmiş ve bunların türü 16S-rDNA universal primerleri kullanarak yaptığımız PCR yöntemiyle belirlenebilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada her iki kene türünde toplam 20 muhtemel bakteri türü belirlenmiştir.

Bu çalışmada az sayıda bakteri türünün belirlenmiş olmasının bir nedeni, kullanılan besiyeri çeşitliliğinin azlığı ve inkübasyon süresinin yetersiz olmasından kaynaklanabileceği sanılmaktadır. Öyleki, Rudolf ve arkadaşlarının (2009) *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna* keneleriyle yaptıkları çalışmada, spesifik besiyeri aramayan bakterileri için Tripton-Soya Agar, spesifik besiyeri arayan ve patojenik bakteriler için Brain-Heart Agar ve Columbia Agar, Enterokoklar için Kanamisin-Aesculin Agar, Mykobakterler için Lowenstein-Jensen Agar besiyerleri kullanılmış, inkübasyon süreleri de 28°C-37°C’de 1 hafta süreyle (Mykobakterler için yaklaşık 1 ay) tutulmuştur. Bu sayede ilgili çalışmada *Ixodes ricinus* kenelerinde *Bacillus* ve *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Advenella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* ve *Xanthomonas* bakterileri; *Dermacentor reticulatus* kenelerinde *Bacillus* ve *Paenibacillus* bakterileri başta olmak üzere *Kocuria*, *Rothia*, *Staphylococcus* ve *Pseudomonas*; *Haemaphysalis concinna* kenelerinde *Bacillus*, *Paenibacillus*,

Frigoribacterium, *Microbacterium*, *Plantibacter*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* ve *Rahnella* bakterileri tespit edilmiştir.

Benzer şekilde, Murrell ve arkadaşlarının (2004) Avustralya keneleriyle yaptıkları çalışmada *I. holocyclus*, *B. decoloratus*, *A. triguttatum*, *H. longicornis*, *A. fimbriatum* kenelerinde, besiyeri olarak Nütrient Agar, Kanlı Agar ve ISP2 Agar kullanılmıştır. Çalışma sonunda, *I. holocyclus* kenelerinde; *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *S. xylosus*, *Pantoea stewartii*, *S. maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia* bakterileri, *Amblyomma triguttatum* kenelerinde; *B. licheniformis*, *B. cohnii*, *B. pumilus* bakterileri, *Aponoma fimbriatum* kenelerinde; *P. putida*, *S. maltophilia* bakterileri, *B. microplus* kenelerinde de *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *S. saprophyticus*, *P. putida*, *S. maltophilia*, *Enterobacter cloacae*, *P. agglomerans*, *Serratia entomophila*, *S. rubidea*, *Klebsiella planticola* bakterileri ortaya çıkmıştır.

Dolayısıyla, literatürdeki bu çalışmaların sonuçları kullanılan bakteri kültür koşulları zenginleştirildiği takdirde daha çok bakteri türünün tespit edilme ihtimali çok yüksek olacağını ifade etmektedir. Bununla birlikte keneler ergin kenelerin yanı sıra, yumurta, larva ve nimf evresindeki keneler bulunan bakterilerin varlığının belirlenmesi de, bu kenelerin bakteriyomunun tam olarak bilinmesine daha da katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada bulunan bakterilerin kaynakları ve özellikleri tam olarak bilinmemekle birlikte bir kısmının çevre kaynaklı, bir kısmının konak derisinden veya kanından, bir kısmının da kenelerde simbiyont olarak yaşadığı tahmin edilmektedir. Çalışmada bulunan kenelerin bilinen özellikleri Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

Bu bilgilere göre bunların bir kısmının patojenik, bir kısmının da kene canlılığıyla alâkalı olduğu anlaşılmaktadır. Çizelgeden de anlaşılabileceği gibi bu bakterilerin bazılarının entomopatojen olarak kullanılma potansiyeli olduğu da görülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada her ne kadar tespit edilen bakteri türü sayısı az gözükse de, çalışma kısmen de olsa amacına ulaşmıştır. Çünkü kenelerin kontrolünde kullanılma potansiyeli bulunan en az iki bakteri bu çalışmada belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 Bu çalışmada *H. parva* ve *H. marginatum* türü kenelerde tespit edilen bakteri türleri

Kene Kodu	Kene Türü	Cinsiyeti	Toplandığı Hayvan	Bakteri türü
6	<i>Haemaphysalis parva</i>	♂	Köpek	Bakteri türü bulunamadı
7	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Köpek	Bakteri türü bulunamadı
8	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Köpek	<i>Staphylococcus sp.</i>
				<i>Stenotrophomonas sp.</i>
				<i>Staphylococcus xylosus</i>
				<i>Enterococcus faecium</i>
				<i>Staphylococcus sciuri</i>
				<i>Enterococcus durans</i>
				<i>Staphylococcus succinus</i>
				<i>Enterococcus ENA07</i>
9	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Köpek	Bakteri türü bulunamadı
10	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Köpek	Bakteri türü bulunamadı
11	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Köpek	<i>Bacillus sp.</i>
				<i>Lysinibacillus sp.</i>
19	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Köpek	<i>Bacillus pumilus</i>
				<i>Pseudomonas sp.</i>
				<i>Acinetobacter lwoffii</i>
20	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Köpek	<i>Rickettsia sp.</i>
				<i>Pantoea agglomerans</i>
T1	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Tavşan	<i>Micrococcus yunnanensis</i>
				<i>Staphylococcus sp.</i>
				<i>Bacillus pumilus</i>
				<i>Bacillales bacterium</i>
				<i>Staphylococcus xylosus</i>
T2	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Tavşan	<i>Bacillus pumilus</i>
				<i>Bacillus safensis</i>
T3	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Tavşan	<i>Bacillus pumilus</i>
T4	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Tavşan	<i>Bacillus pumilus</i>
T5	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Tavşan	<i>Micrococcus flavus</i>
T6	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Tavşan	<i>Bacillus pumilus</i>
HC1	<i>Hyalomma marginatum</i>	♀	Köpek	<i>Bacillus sp.</i>
				<i>Bacillus pumilus</i>
HC2	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Köpek	<i>Bacillus sp.</i>
				<i>Pseudomonas koreensis</i>
				<i>Acinetobacter sp.</i>
HC3	<i>Haemaphysalis parva</i>	♀	Köpek	<i>Bacillus pumilus</i>

Çizelge 4.2. Çalışmada tespit edilen bakteri türlerinin bilinen bazı özellikleri

Bakteri Türü	Özellikleri	Referans
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Altyutakta ve deride bulunmaktadır. Helicobacterin yaptığı enfeksiyonlara yani gastritite, pnömoni benzeri enfeksiyonlar, neden oldukları bildirilmiştir.	Huddam ve ark. 2012
<i>Acinetobacter sp.</i>	Colorado patates böceği <i>Leptinotarsa decemlineata</i> 'nın biyolojik mücadelesinde kullanılmıştır ¹ . İnsanda ve insan parazitlerinde patojendir ²	1- Muratoğlu ve ark. 2011 2- Peleg ve ark. 2008, La Scola ve Raoult 2004
<i>Bacillus pumilus</i>	Keratin parçalayıcı özellikleri vardır	Fakhfakh ve ark., 2012
<i>Bacillus sp.</i>	Kene defansinine dirençlidir	Chrudimská ve ark. 2011
<i>Enterococcus faecium</i>	Lizozim etkili nekroz yani hücre ölümüne sebep olmaktadır. Vankomisine dirençlidir (VRE)	Höring ve ark. 2012
<i>Lysinibacillus sp.</i>	Sentezlediği Sphaericolysin, Mtx toksinleri, Bin toksinleri gibi toksinler nedeniyle özellikle <i>Aedes</i> cinsi sivrisineklerde biyolojik mücadelede kullanılmaktadır	Berry, 2012
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	Krom yıkıcı özellikleri vardır. Bu nedenle ağır metal kirliliğine karşı kullanılmaktadır. Arsenik dirençlidir.	Delavat ve ark., 2012
<i>Pantoea agglomerans</i>	Fırsatçı insan patojenidir. Üriner bölge enfeksiyonları ve bakteremi durumuna yol açar ¹ . <i>Klebsiella pneumoniae</i> ile simbiyonttur ve pnömoni etkenidir ² . Salgılamış olduğu anti-Plasmodium efektör proteini sayesinde sivrisineklerde enfeksiyon taşınmasını engeller ³ . Sentezlediği 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP) <i>Dermaecentor variabilis</i> kenesinde feromon olarak bilinmektedir ⁴ .	1- Sharma ve ark. 2012 2- Lauzon 2012 3- Favia 2012 4- Hanson ve ark. 2005
<i>Rickettsia sp.</i>	<i>R. helvetica</i> türü, insanlarda subakut menenjit etkenidir ¹ . Bazı türleri epidemik tifüs nedenidir ² . Kalp problemleri ³	1- Nilsson ve ark. 2010 2- Raoult ve ark. 1997 3- Nilsson ve ark. 2002
<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>S. agalactiae</i> , <i>S. aureus</i> (metisilin dirençli) türleri ineklerde meme iltihabı (Bovine mastitis) enfeksiyonu nedenidir ¹ . <i>Staphylococcus aureus</i> penisiline dirençli bir bakteridir ² . Atıksu endüstrisinde kullanılmaktadır. Fenol yıkıcısıdır. Polisiklik aromatik hidrokarbonların yıkıcısıdır. Koagülaz negatiflerdir (CNS)	1- Mantovani ve ark., 2011 2- Casal ve ark., 2005
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Özellikle çiftlik hayvanlarında kolonize olmuş bir bakteridir. İnsanda Astımın nedenidir. Deride kolonize olmaktadır.	Ege ve ark. 2012

Çizelge 4.2. (Devam) Çalışmada tespit edilen bakteri türlerinin bilinen bazı özellikleri

<i>Staphylococcus succinus</i>	Et soslarında kolonize olan bir bakteridir. Önemli bir probiyotiktir.	Sathyabama ve ark. 2012
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Et ürünlerinin fermente işlemlerinde kullanılmaktadır ¹ . Cd(II) ve Cr(VI) absorbe edici etkisi bulunmuştur ² . Domuzlarda deri, kalp, karaciğer, dalak gibi organlarda hastalıklar ³ .	1- De Macedo ve ark. 2012 2- Ziagova ve ark. 2007 3- Gourreau ve ark. 1994
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Kene defansinine dirençlidir ¹ Sivrineklerin (Anopheles) florasında mevcuttur ² Balarılar larvalarında çıkmıştır. Antagonistik etki yaptığı düşünülüyor ³ Keratit ve skleritit etkeni ⁴ Antibiyotikleri hidrolize eden kromozomal enzimleri bulunmaktadır. Yoğun bakım ünitelerinde yoğunlaşmasıyla birlikte ölümlerin arttığı gözlenmiştir ⁵ . Akciğer ve diğer organlarda yayılarak özellikle kanser hastalarında ölüm nedeni olmaktadır ⁶	1- Chrudimská ve ark. 2011 2-Lindh ve ark. 2005 3- Loncaric ve ark. 2011 4- Yeong-Fong Chen ve ark. 2005 5- Yıldırım ve ark. 2009 6- Safdar ve ark. 2006; 2007 Aisenberg ve ark. 2007

Çalışmada tespit edilen bakterilerden bir kısmı literatürdeki çalışmalarda bulunanlara benzerlik gösterirken, bir kısmı ise daha önce bulunanlardan farklıdır. Bu çalışmada kenelerde tespit edilen bakteri türlerinden daha önce hangi kene türlerinde tespit edildiği Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızın sonuçlarının diğer çalışmalarla uyumlu olduğunu ve kullandığımız yöntemlerin nispeten uygunluğunu göstermesi açısından önemlidir.

Çizelge 4.3. Bu çalışmada tespit edilen bakterilerin önceki çalışmalarda bulunduğu kene türleri.

Bakteri Türü	Bulunduğu Keneler	Referans
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Ixodes holocyclus</i>	Murrell ve ark. 2004
<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Amblyomma cajennense</i> <i>Amblyomma americanum</i> <i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Rhipicephalus microplus</i>	Andreotti ve ark. 2011 Benson ve ark. 2004 Carpi ve ark. 2011 Yuan 2010
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Amblyomma triguttatum</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Haemaphysalis concinna</i>	Murrell ve ark. 2004 Rudolf ve ark. 2009
<i>Bacillus safensis</i>	<i>Haemaphysalis parva</i>	İlk defa bu çalışmada bulunmuştur.
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Amblyomma cajennense</i> <i>Amblyomma americanum</i> <i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Dermacentor reticulatus</i> <i>Haemaphysalis concinna</i>	Andreotti ve ark. 2011 Benson ve ark. 2004 Carpi ve ark. 2011 Rudolf ve ark. 2009 Yuan 2010
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Haemaphysalis parva</i>	İlk defa bu çalışmada bulunmuştur.
<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i> <i>Ixodes ricinus</i>	Andreotti ve ark. 2011 Carpi ve ark. 2011
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Haemaphysalis parva</i>	İlk defa bu çalışmada bulunmuştur.
<i>Lysinibacillus sp.</i>	<i>Haemaphysalis parva</i>	İlk defa bu çalışmada bulunmuştur.
<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Haemaphysalis parva</i>	İlk defa bu çalışmada bulunmuştur.
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	<i>Haemaphysalis parva</i>	İlk defa bu çalışmada bulunmuştur.
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i> <i>Amblyomma americanum</i> <i>Ixodes scapularis</i>	Andreotti ve ark. 2011 Clay ve ark. 2008 Murrell ve ark. 2004 Yuan 2010
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Aponomma fimbriatum</i> <i>Amblyomma americanum</i> <i>Amblyomma cajennense</i> <i>Rhipicephalus microplus</i> <i>Haemaphysalis longicornis</i> <i>Haemaphysalis concinna</i> <i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Dermacentor reticulatus</i>	Andreotti ve ark. 2011 Carpi ve ark. 2011 Clay ve ark. 2008 Murrell ve ark. 2004 Rudolf ve ark. 2009 Yuan 2010
<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>Haemaphysalis parva</i>	İlk defa bu çalışmada bulunmuştur.

Çizelge 4.3. (Devamı) Bu çalışmada tespit edilen bakterilerin önceki çalışmalarda bulunduğu kene türleri

<i>Rickettsia sp.</i>	<i>Amblyomma americanum</i> <i>Amblyomma cajennense</i> <i>Hyalomma marginatum marg.</i> <i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Rhipicephalus microplus</i>	Abdel-Shafy ve ark. 2012 Andreotti ve ark. 2011 Benson ve ark. 2004 Carpi ve ark. 2011 Clay ve ark. 2008 Eremeeva ve ark. 2007 Yuan 2010
<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Amblyomma americanum</i> <i>Amblyomma cajennense</i> <i>Haemaphysalis longicornis</i> <i>Haemaphysalis concinna</i> <i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Dermacentor reticulatus</i> <i>Rhipicephalus microplus</i>	Andreotti ve ark. 2011 Carpi ve ark. 2011 Murrell ve ark. 2004 Rudolf ve ark. 2009 Yuan 2010
<i>Staphylococcus sciuri</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Andreotti ve ark. 2011
<i>Staphylococcus succinus</i>	<i>Ixodes holocyclus</i> <i>Rhipicephalus microplus</i>	Andreotti ve ark. 2011 Murrell ve ark. 2004
<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Ornithodoros moubata</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Boophilus decoloratus</i> <i>Rhipicephalus microplus</i>	Andreotti ve ark. 2011 Burenová ve ark. 2006 Hendry ve Reclav 1981 Murrell ve ark. 2004
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	<i>Amblyomma americanum</i> <i>Amblyomma cajennense</i> <i>Aponomma fimbriatum</i> <i>Rhipicephalus microplus</i> <i>Ixodes holocyclus</i> <i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes ricinus</i>	Andreotti ve ark. 2011 Benson ve ark. 2004 Carpi ve ark. 2011 Murrell ve ark. 2004 Rudolf ve ark. 2009 Yuan 2010

Çalışmanın esas amaçları doğrultusunda ortaya çıkarılan bakterilerden bazılarının biyolojik mücadelede kullanıldıkları ve dolayısıyla kenelerde de kullanılma ihtimalleri olduğu düşünülmektedir. Örneğin, çalışmada bulunan *Lysinibacillus* bakterilerinin kene kontrolünde biyokontrol amaçlı kullanım potansiyelinin bulunması alınan sonuçların önemini ifade etmektedir. Gelecekte modern tekniklerle yapılacak çalışmalar farklı kene türlerinde daha farklı bakterilerin ve kenelerin biyokontrolünde kullanılabilir ajanların varlığı ortaya çıkartması muhtemeldir. Özellikle pirosekanslama yöntemiyle yapılacak kene bakteriyom ve fungom çalışmaları bu konuda avantaj sağlayacak tekniklerdendir. Öyleki Rudolf ve ark. (2009), Andreotti ve ark. (2011) ve Carpi ve ark. (2011) kenelerle yapmış oldukları çalışmalarda kullandıkları pirosekanslama teknikleri sonucu çok

sayıda bakteri türü ortaya çıkarılmıştır. Fakat günümüz koşullarında bu teknik oldukça pahalı olması nedeniyle kullanımı oldukça sınırlıdır.

Dünyada kene bakteriyomu konusunda çok çalışma yapılmasına rağmen, ülkemizde bu konuda yapılmış bir çalışmaya rastlanmadığından, bu çalışma *Haemaphysalis parva* keneleriyle yapılan ilk bakteriyom çalışması niteliğindedir. Sonuç olarak bu çalışmada hedeflendiği gibi kene kontrolünde kullanılma ihtimali olan bazı bakteri türleri tespit edilmiştir. Bunlar *Lysinibacillus sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Stenotrophomonas sp.* bakterileri olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla bakteriyom ve fungom çalışmaları sadece kenelerdeki patojen organizmaları değil özellikle kene kontrolünde kullanılabilecek bakteri ve mantarların belirlenmesine katkı sağlayacaktır. Ülkemizde bu sert keneler ve diğer sert kenelerin ne kadar yoğun olduğu ve hastalık bulaştırdıkları düşünüldüğünde kenelerin mikrobiyomlarının belirlenmesinin önemi açıkça ortaya çıkmaktadır. Bu ve benzeri çalışmalar özellikle kenelerin kontrolünde kullanılabilecek entomopatojenlerin belirlenmesine katkı sağlayacak olması açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Shafy, S., Allam, N.A.T., Mediannikov, O., Parola, P., Raoult, D., (2012). Molecular detection of spotted fever group *Rickettsiae* associated with Ixodid ticks in Egypt. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, Volume 12, Number 5, 346-359.
- Abdel-Shafy, S., Zayed, A.A., (2002). In vitro acaricidal effect of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). *Vet Parasitol.* (106) 89–96.
- Adelson, M.E., Rao, R.V., Tilton, R.C., Cabets, K., (2004). Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella spp.*, *Babesia microti*, and *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes scapularis* ticks collected in Northern New Jersey. *J Clin Microbiol*, 842), 2799–2801.
- Aisenberg, G., Rolston, K.V., Dickey, B.F., Kontoyiannis, D.P., Raad, I.I., Safdar, A., (2007). *Stenotrophomonas maltophilia* pneumonia in cancer patients without traditional risk factors for infection, 1997–2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, (26), 13–20.
- Aktaş, M., Altay, K., Dumanlı, N., (2011). Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. *Ticks and Tick-borne Diseases*, (2), 62–65.
- Aktaş, M., Vatansever, Z., Altay, K., Aydın, M.F., Dumanlı, N., (2009). Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, (104), 10–15.
- Anand, M., Pant, N.C., (1978). Nutrition of *Rhizopertha dominica* fabricius with reference to possible role of its intracytoplasmic microbes. *Indian-Journal of Entomology* 8, 5-6.
- Andreotti, R., Perez de Leon, A.A., Dowd, S.E., Guerrero, F.D., Bendele, K.G., Scoles, G.A., (2011). Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiology*, (11), 6.
- Apanaskevich, D.A., Horak, I.G., (2008). The Genus *Hyalomma* Koch, 1844: V. re-evaluation of the taxonomic rank of taxa comprising the *H. (Euhyalomma) marginatum* Koch complex of species (*Acari: Ixodidae*) with redescription of all parasitic stages and notes on biology. *International Journal of Acarology*, 34(1):13-42.
- Bacon, R.M., Kugler, K.J., Mead, P.S., (2008). Surveillance for Lyme disease—United States, 1992-2006. *MMWR* 57 (No. SS-10): 1-9.
- Balashov, Y.S., (2005). Bloodsucking Insects and Ticks and Mites, Vectors of Transmissible Infections of humans and domestic animals. *Entomological Review*, (58), 990-1007.
- Barker, S.C., Murrell, A., (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, (129), 15–36.
- Benoit, J. B., Yoder, J.A., Ark, J.T., Rellinger, E.J., (2005). Fungal fauna of *Ixodes scapularis* say and *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (*Acari: Ixodida*) with special reference to species-associated internal mycoflora', *International Journal of Acarology*, 31, pp. 417–422.

- Benson, M.J., Gawronski, J.D., Eveleigh, D.E., Benson, D.R., (2004). Intracellular symbionts and other bacteria associated with deer ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 1, p. 616–620.
- Berry, C., (2012). The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen *Journal of Invertebrate Pathology*, (109), 1–10.
- Bosch, T.C.G., McFall-Ngai, M.J., (2011). Metaorganisms as the new frontier, *zoology* 114 (4) 185-190. doi:10.1016/j.zool.2011.04.001
- Bottger, E.C., (1989). Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol. Let.*, 65: 171–176.
- Burand, J.P., Kim, W., Afonso, C.L., Tulman, E.R., Kutish, G.F., Lu, Z., Rock, D.L., (2012), Analysis of the Genome of the Sexually Transmitted Insect Virus *Helicoverpa zea* Nudivirus, *Viruses*, 4, 28-61; doi:10.3390/v4010028
- Burenová, V., Franta, Z., Kopáček, P., (2006). A comparison of *Chryseobacterium indologenes* pathogenicity to the soft tick *Ornithodoros moubata* and hard tick *Ixodes ricinus*, *Journal of Invertebrate Pathology* (93), 96–104.
- Bursalı, A., Keskin, A., Tekin, S., (2012). A review of the ticks (Acari: Ixodida) of Turkey: species diversity, hosts and geographical distribution. *Exp. Appl. Acarol*, (57), 91–104
- Bursalı, A., Tekin Ş., Keskin A., Ekici, M., Dündar, E., (2011). Species diversity of ixodid ticks feeding on humans in Amasya, Turkey: seasonal abundance and presence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Med Entomol* 48(1):85–93
- Bursalı, A., Tekin, Ş., Orhan, M., Keskin, A., Özkan, M., (2010). Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) infesting humans in Tokat Province of Turkey: species diversity and seasonal activity. *J. Vector Ecol.* 35, 180–186
- Camicas, J.L., Hervy, J.P., Adam F., Morel, P.C., (1998). *The Ticks of the World (Acarida, Ixodida)*. Nomenclature, Described Stages, Hosts, Distribution. Orstom Editions Paris.
- Campos, R.A., Boldo, J.T., Pimentel, I.C., Dalfovo, V., Araújo, W.L., Azevedo, J.L., Vainstein, M.H., Barros, N.M., (2010). Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria sp.* to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genetics and Molecular Research* (9), 1421–1430.
- Carpi, G., Cagnacci, F., Wittekindt, N.E., Zhao, F., Qi J, (2011). Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS ONE* 6(10): e25604. doi:10.1371/journal.pone.0025604
- Casal, M., Vaquero, M., Rinder, H., Tortoli, E., Grosset, J., Rusch-Gerdes, S., Gutierrez, J., Jarlier, V., (2005). A case-control study for multidrug-resistant tuberculosis: risk factors in four European countries. *Microbial Drug Resistance*.(11) 62–67.
- Charlat, S., Merçot, H., (2000). News and Comment Trends. *Trends in ecology and evolution*, 15(11): 438-440.
- Chrudimská, T., Slaninová, J., Rudenko, N., Růžek, D., Grubhoffer, L., (2011). Functional characterization of two defensin isoforms of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors*, (4), 63.
- Clay, K., Fuqua, C., (2010). The tick microbiome: diversity, distribution and influence of the internal microbial community for a blood-feeding disease vector. “Critical

- Needs and Gaps in Understanding Prevention, Amelioration, and Resolution of Lyme and Other Tick-Borne Diseases: The Short-Term and Long-Term Outcomes" Washington, D. C., October 11-12, 2010
- Clay, K., Klyachko, O., Grindle, N., Civitello, D., Oleske, D., Fuqua, C., (2008). Microbial communities and interactions in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Molecular Ecology*, (17), 4371–4381
- Cunha, M.D., Burke, A., (2000). *Tickborne Infectious Diseases: Diagnosis and Management*. New York, NY, USA: Marcel Dekker Incorporated, p 105.
- Dahlgren, F.C., Mandel, E., Krebs, J., Massung, R., McQuiston, J. H., (2010). Surveillance for infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the United States, 2000-2007. In press. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Dale, C., Maudlin, I., (1999). *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (Pt 1), 267.
- Damiani, C. ve ark., (2010). Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microb. Ecol.*, (60), 644.
- Dantas-Torres, F., Bruno, B., Otranto, C.D., (2012). Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective *Trends in Parasitology*, Vol. 28, No. 10
- Davidson, G., Phelps, K., Sunderland, D., J. Pell, K., Ball, B.V., Shaw, K.E., Chandler, D., (2003) 'Study of temperature–growth interactions of entomopathogenic fungi with potential for control of *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata) using a nonlinear model of poikilotherm development', *Journal of Applied Microbiology*, 94, pp. 816–825.
- De Castro, J.J., (1997). Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet Parasitol* (71), 77–97.
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol.* (28) 275–83.
- de Macedo, R.E.F., Pflanzner, S.B., Gomes, C.L., (2012). Probiotic Meat Products. <http://dx.doi.org/10.5772/50057>.
- Deacon, J. W., (1983). *Microbial control of pests and diseases*. New York., 31-41.
- DeBach, P. (1974). *Biological control by natural enemies*. Cambridge University Press, London. 323 pp.
- Delavat, F., Lett, M.C., Lièvremon, D., (2012). Novel and unexpected bacterial diversity in an arsenic-rich ecosystem revealed by culture-dependent approaches. *Biology Direct*, (7), 28.
- Demirbağ, Z., Sezen, K., (2005). Entomopoksvirüsler ve biyolojik kontrol. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 29(4), 280-286.
- Doğan, S., Ocak, İ., Hasenekoğlu, İ., Sezek, F., (2003). First record of fungi in the families *Caligonellidae*, *Cryptognathidae*, *Stigmaeidae* and *Tectocephidae* mites (*Arachnida: Acari*) from Turkey', *Archives des Sciences*, 56, pp. 137–142.
- Dong, Y. ve ark. (2009) Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* 5, e1000423
- Doran, T., Moore, R., (2001). Application of the Reproductive Parasite *Wolbachia* to the Biological Control of Flystrike. *Proceedings of the FLICS Conference*, Launceston.
- Douglas, A.E., (2000). Symbiotic microorganisms in insects. *Encyclopedia of Microbiology* 4, 526-537.

- Doutt, R. L. (1964). The historical development of biological control. p. 21-42. In *Biological Control of Insect Pests and Weeds* (P. DeBach, editor). Chapman and Hall Ltd, London. 844 pp.
- Duh, D, Punda-Polić, V., Trilar, T., Petrovec, M., Bradarić, N., Avšič-Županc, T., (2006). Molecular identification of *Rickettsia* felis-like bacteria in *Haemaphysalis sulcata* ticks collected from domestic animals in southern Croatia. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1078) 347–351.
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstadter, J., Hurst, G.D., (2008). The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol* 6:27. doi: 10.1186/1741-7007-6-27
- Ege, M.J., Mayer, M., Schwaiger, K., Mattes, J., Pershagen, G., van Hage, M., Scheynius, A., Bauer, J., von Mutius, E., (2012). Environmental bacteria and childhood asthma. *Allergy*, DOI: 10.1111/all.12028.
- Enigl, M., Schausberger, P., (2007). Incidence of the endosymbionts *Wolbachia*, *Cardinium* and *Spiroplasma* in phytoseiid mites and associated prey. *Exp Appl Acarol* (42), 75–85.
- Eremeeva, M.E., Oliveira, A., Moriarity, J., Robinson, J.B., Tokarevich, N.K., Antyukova, L.P., Pyanyh, V. A., Emeljanova O. N., Ignatjeva V. N., Buzinov R., Pyankova, V., Dasch, G.A., (2007). Detection and identification of bacterial agents in *Ixodes persulcatus schulze* ticks from the north western region of Russia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* Volume 7, Number 3, 426-436.
- Estrada-Peña, A, Bouattour, A, Camicas, J.L., Walker, A.R., (2004). Ticks of veterinary and medical importance: the mediterranean basin. A guide of identification of species. University of Zaragoza Press, Zaragoza, p. 131.
- Fakhfakh, N., Gargouri, M., Dahmen, I., Sellami-Kamoun, A., El Feki, A., Nasri, M., (2012). Improvement of antioxidant potential in rats consuming feathers protein hydrolysate obtained by fermentation of the keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(4), pp. 938-949.
- Favia, G. ve ark. (2007) Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 9047
- Favia, G., ve ark., (2012). Facing malaria parasite with mosquito symbionts www.intechopen.com
- Fernández-Ruvalcaba, M., Peña-Chora, G., Romo-Martínez, A., Hernández-Velázquez, V., Bravo de Parra, A., De La Rosa, D.P., (2010). Evaluation of *Bacillus thuringiensis* pathogenicity for a strain of the tick, *Rhipicephalus microplus*, resistant to chemical pesticides. *J Insect Sci.*, (10), 186.
- Ferree, P.M., Avery, A., Azpurua, T., Wilkes, T., Werren, J.H., (2008). A bacterium targets maternally inherited centrosomes to kill males in *Nasonia*. *Curr. Biol.* (18), 1409–1414.
- Fogaca, A.C., da Silva, P.I., Jr., Miranda, M.T., Bianchi, A.G., Miranda, A., Ribolla, P.E., Daffre, S., (1999). Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem* 274, 25330-25334.
- Franta, Z., (2012). Blood meal digestion in the hard tick *Ixodes ricinus*. Ph.D. Thesis, In English, University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic, 57 pp.

- Garrity, G.M., Holt, J.G., (2001). The road map to the manual, p. 119–166. In G. M. Garrity (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Gasparich, G.E., Whitcomb, R.F., Dodge, D., French, F.E., Glass, J., Williamson, D.L., (2004). The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *Int J Syst Evol Microbiol* (54), 893–918.
- Gill, S.S., Cowle, E.A., Pietrantonio, P.V., (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins, *Annual Review of Entomology* Vol. 37: 615-634.
- Gooding, R.H., (1972). Digestive processes of haematophagous insects--II. Trypsin from the sheep ked *Melophagus ovinus* (L.) (hippoboscidae, diptera) and its inhibition by mammalian sera. *Comp Biochem Physiol B* 43, 815-824.
- Gosh, S., Azhahianambi, P., Yadav, M.P., (2007). Upcoming and future strategies of tick control: a review *J Vect Borne Dis* 44, June 2007, pp. 79–89
- Gotoh, T., Noda, H., Ito, S., (2007). *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity* (98):13–20.
- Gotoh, T., H. Noda and X. Y. Hong, (2003). *Wolbachia* Distribution and Sitoplasmic Incompatibility Based on a Survey of 42 Spider Mite Species (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Heredity* 91: 208-216.
- Gourreau, J.M., Colardelle, C., Filleton, R., (1994). Dermatitis due to *Staphylococcus xylosus* in sheep. *Le Point Vet*; 26: 271– 274
- Grisi, L., Massard, C.L., Moya-Borja, G.E., Pereira, J.B., (2002) Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Vet* 21(125):8–10
- Guglielmone, A.A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada-Pena, A., Horak, I.G., Shao, R.F., Barker, S.C., (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 1-28.
- Hagen, K.S., Franz, J.M., (1973). A history of biological control. p. 433-476. In *A History of Entomology* (R. F. Smith, T. E. Mittler, and C. N. Smith, editors). Annu. Rev. Inc., Palo Alto, California. 517 pp.
- Hanson, P., Ghisays, F., Thompson, T.M., (2005). A preliminary report on the capacity for chlorophenol production by microorganisms present in tick tissues, *International Journal of Acarology*, (31):1, 83-86.
- Hayakawa, T., G.F. Rohrmann ve Y. Hashimoto (2000). Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculovirus. *Virology*. 278: 1-12.
- Hendry, D.A., Reclav, Y., (1981). Acaricidal bacteria infecting laboratory colonies of the tick *Boophilus decoloratus*. *J. Invertebr. Pathol.* (38) 149-151.
- Herniou, E.A., T. Luque, X. Chen, J.M. Vlak, D. Winstanley, J.S. Cory ve D.R. O'Reilly. (2001). Use of whole genome sequence data to infer *Baculovirus* phylogeny. *J. Virol.* (75), 8117-8126.
- Heyman, P., Cochez, C., Hofhuis, A., van der Giessen, J., Sprong, H., Porter, S.R., Losson, B., Saegerman, C., Donoso-Mantke, O., Niedrig, M., Papa, A., (2010). A clear and present danger: tickborne diseases in Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 8(1), 33-50.
- Hoddle, M.S., (1999). The biology and management of silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* bellows and perring (*Homoptera: Aleyrodidae*) on Greenhouse Grown Ornamentals. Department of Entomology, University of California, Riverside, CA 92521 USA (<http://www.biocontrol.ucr.edu/bemisia.html>).

- Hoffmann, V.G., Hörchner, F., Schein, E., Gerber, HCh. (1991). Saisonales auftreten von zecken und piroplamen bei haustieren in: den asiatischen provinzen der Türkei: Berl Munch Therarztl, 94 (8), 152-156.
- Holman, M.S., Caporale, D.A., Goldberg, J., Lacombe, E., (2004). *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti*, and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis*, southern coastal Maine. Emerg Infect Dis., (10) 744–746.
- Hornok, S., Farkas, R., (2009). Influence of biotope on the distribution and peak activity of questing ixodid ticks in Hungary. Medical and Veterinary Entomology (23), 41–46.
- Hotez, P.J., Kamath, A. (2009). Neglected tropical diseases in sub-Saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and disease burden. PloS Negl Trop Dis., (3), 412.
- Hoy, M., Jeyaprakash, A., (2008). Symbionts, including pathogens, of the predatory mite *Metaseiulus occidentalis*: current and future analysis methods. Exp Appl Acarol 46:329–347.
- Höring, S., Schütz, M., Autenrieth, I.B., Gröbner, S., (2012). Lysozyme facilitates adherence of *Enterococcus faecium* to host cells and induction of necrotic cell death. Microbes and Infection, (14), 554-562.
- Hubálek, Z., (2010). Biogeography of Tick-Borne *Bhanja Virus* (*Bunyaviridae*) in Europe. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. doi: 10.1155/2009/372691
- Huddam, B., Koçak, G., Azak, A., Duranay, M., (2012). *Acinetobacter lwoffii* peritonitis in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis, Letter to the Editor. Therapeutic Apheresis and Dialysis. doi: 10.1111/j.1744-9987.2012.01099.x
- Hunter, M.S., Perlman, S.J., Kelly, S.E. (2003). A bacterial symbiont in the Bacterioidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. Proc R Soc Lond B Biol Sci 270:2185–2190.
- İça, A., İnci, A., Vatansever, Z., Karaer, Z., (2007). Status of tick infestation of cattle in the Kayseri region of Turkey. Parasitol Res (101), 167–169.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., (2004). The global importance of ticks. Parasitology 129 Suppl: S3-14.
- Kaaya, G.P., Hassan, S., (2000). Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. Exp Appl Acarol. (24), 913–26.
- Kaaya, G.P., Samish, M., Hedimbi, M, Gindin, G., Glazer, I., (2011). Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. Experimental & Applied Acarology (55):3, 273-81.
- Kahl, O., Gern, L., Eisen, L., Lane, R.S., (2002). Ecological Research on *Borrelia burgdorferi sensu lato*: Terminology and Some Methodological Pitfalls. Gray, J.S., Kahl, O., Lane, R.S., Stanek, G., eds. Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control: CABI Publishing, 368 pp.
- Kolbert, C.P., Persing, D.H., (1999). Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. Curr. Opin. Microbiol., 2: 299–305.
- Kurtpınar, H., (1954). Türkiye Keneleri: Güven Matbası, Ankara, 1-112.
- Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., Andreadis, T.G., Magnarelli, L.A., Mather, T.A., (1996) Tick cell culture isolation of an intracellular prokaryote from the tick *Ixodes scapularis*. J Invertebr Pathol 67:318–321

- La Scola, B., Raoult, D., (2004). *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Acinetobacter baumannii* in human body louse 10:1671-1673.
- Labuda, M., Jones, L.D., Williams, T., Nuttall, P.A., (1993). Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Med Vet Entomol* 7: 193-6.
- Labuda, M., Trimnell, A.R., Lickova, M., (2006). An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogens. *PLoS Pathogens*, 2(4), 1–18.
- Lane, R.S., (1994). Competence of Ticks as vectors of microbial agents. Sonenshine, D.E., Mather, T.N., eds. *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses*: Oxford University Press, 45-67.
- Lauzon, C.R., Potter, S.E., (2012). Description of the irradiated and nonirradiated midgut of *Ceratitiscapitata wiedemann* (Diptera: Tephritidae) and *Anastrepha ludens loew* (Diptera: Tephritidae) used for sterile insect technique. *J Pest Sci* (85) 217–226.
- Leemon, D., (2009). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* for biopesticide control of livestock ectoparasites. PhD Thesis, School of Veterinary Science, The University of Queensland.
- Li, S., Heyman, Paul., Cochez, C., Simons, Vanwambeke, L., Sophie, O.A., 2012. Multi-level analysis of the relationship between environmental factors and questing *Ixodes ricinus* dynamics in Belgium. *Parasites & Vectors*, (5), 149.
- Lindh, J.M., Terenius O., Faye, I., (2005). 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae sensu lato* and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts. *Appl Environ Microbiol* 71: 7217–7223.
- Lipa, J.J., (1985). History of biological control in protected cultures. 2. Eastern Europa, In: N.W. Hussey and N. Scopes (eds.), *Biological Pest Control, The Glasshouse Experience*, Blandford Press, 23-29.
- Lipa, J.J., (1996). Insect pathology and microbial control in the EEPRS region and in Poland, *IOBC/WPRS Bulletin* 19 (9): 1-11.
- Loncaric, I., Ruppitsch, W., Licek, E., Moosbeckhofer, R., Busse, H.J., Rosengarten, R., (2011). Characterization of selected Gram-negative non-fermenting bacteria isolated from honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie*, (42), 312–325.
- Lubeck, I., Arruda, W., Souza, B.K., Stanisquaskia, F., Carlinia, C.R., Schranka, A., Vainstein, M.H., (2008). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecology*. (1), 78–88.
- Lundh, J., Wikteliu, D., Chirico, J., 2005. Azadirachtin-impregnated traps for the control of *Dermanyssus gallinae*. *Vet Parasitol.*, (130) 337–42.
- Lundkvist, A., Wallensten, A., Vene, S., Hjertqvist, M., (2011). Tick-borne encephalitis increasing in Sweden. *Euro Surveill.*, 16.
- Mallon, A. R., Fernández, E., Encinosa, P.E., Belloa, Y., Méndez-Pérez, L., Ruizb, L.C., Pérez, D., González, M., Garay, H., Reyes, O., Méndez, L., Estrada, M. P., (2012). A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine* (30), 1782–1789.
- Maltezou, H. C., L. Andonova, R. Andraghetti, et al. (2010). Crimean-Congo hemorrhagic fever in Europe: current situation calls for preparedness. *Eurosurveillance* 15: pii=19504.

- Mans, B.J., de Klerk, D., Pienaar, R., Latif, A.A., (2011). *Nuttalliella namaqua*: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks. *PLoS One* 6, 23-675.
- Mantovani, H.C., Cruz, A.M.O., Paiva, A.D., (2011). Bacteriocin activity and resistance in livestock pathogens. *Formatex*, 853-863
- Matalon Y, Katzir N, Gottlieb Y, Portnoy V, Zchori-Fein E (2007). *Cardinium* in *Plagiomerus diaspidis* (Hymenoptera: Encyrtidae). *J Invertebr Pathol* 96:106–108
- McQuiston, J., C. Levy, M. Traeger, et al. (2010). Rocky Mountain spotted fever associated with *Rhipicephalus sanguineus* ticks: from emergence to establishment of an enzootic focus in the United States. Paper presented at the 2010 International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, Georgia.
- Meikle, W.G., Mercadier, G., Girod, V., Derouané F., Jones W.A., (2006). Evaluation of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota: Hyphomycetes) strains isolated from varroa mites in southern France, *Journal of Apicultural Research*, 45, pp. 219–220.
- Meikle, W. G., Mercadier, G., Holst, N., Nansen, C., Girod, V., (2007). Duration and spread of an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes), used to treat varroa mites (Acari: Varroidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) hives, *Apiculture and Social Insects*, , pp. 1–10.
- Milutinović, M., Radulović, Ž., 2002. Ecological notes on ticks (Acari: Ixodidae) in Serbia (central regions). *Acta Veterinaria Belgrad*, (52), 49–58.
- Mimoğlu, M., (1959). Genel ve Özel Tıbbi Artropodoloji: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları; 111, Ankara, 172-236.
- Minjauw B, McLeod A. (2003). Tick-borne diseases and poverty. The impact of ticks and tickborne diseases on the livelihood of small-scale and marginal livestock owners in India and eastern and southern Africa. Research report, DFID Animal Health Programme, Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, UK.
- Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M.K., Huang, X., Motobu, M., Alim, M.A., Fujisaki, K., (2007). Molecular and reverse genetic characterization of serine proteinase-induced hemolysis in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Insect Physiol* 53, 195-203.
- Moran, N.A., McCutcheon, J.P., Nakabachi, A., (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu. Rev. Genet.* (42), 165–90.
- Moreno, C.X., Moy, F., Daniels, T.J., Godfrey, H.P., Cabello, F.C., (2006). Molecular analysis of microbial communities identified in different developmental stages of *Ixodes scapularis* ticks from Westchester and Dutchess Counties, New York. *Environmental Microbiology*, (8), 761-722.
- Moreno, B., Méndez, J.G., (2010). Actualización en la vigilancia epidemiológica de “rickettsiosis”. Part I. *Epidemiología Boletín* 6: 1-4.
- Muratoğlu, H., Demirbağ, Z., Sezen, K., (2011). The first investigation of the diversity of bacteria associated with *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) section cellular and molecular biology, *Biologia*, (66/2), 288-293.
- Murrell A., Dobson S.J., Yang X., Lacey E., Barker S.C. (2004). A survey of bacterial diversity in ticks, lice and fleas from Australia. *Parasitol.Res.* (89), 326–334.

- Nava, S., Guglielmone, A.A, Mangold A.J., (2009). An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience*, 14(7), 2857–2877.
- Nilsson, K., Pahlson, C., Lukinius, A., Eriksson, L., Nilsson, L., Lindquist, O., (2002). Presence of *Rickettsia helvetica* in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis. *J. Infect. Dis.*, (185), 1128–1138.
- Nilsson, K., Elfving, K., Pahlson, C., (2010). *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis. *Emerg. Infect. Dis.*, (16), 490–492.
- Noda, H., Munderloh, U.G., Kurtti, T.J., (1997). Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia spp.* and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.* (63), 3926–3932.
- Openshaw, J.J., Swerdlow, D.L., Krebs, J.W., (2010). Rocky Mountain spotted fever in the United States: interpreting contemporary increases in incidence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83: 174–182.
- Paddock, C.D., Finley, R.W., Wright, C.S., (2008). *Rickettsia parkeri* rickettsiosis and its clinical distinction from Rocky Mountain spotted fever. *Clinical Infectious Diseases* 47: 1188–1196.
- Palys, T., Nakamura, L.K., Cohan, F.M., (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 47: 1145–1156.
- Parola, P., Paddock, C.D., Raoult, D., (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews* 18: 719–756.
- Pattnaik, P., (2006). Kyasanur forest disease: an epidemiological view in India. *Reviews in Medical Virology* 16: 151–165.
- Pedersen, P.B., Bjornvad, M.E., Rasmussen, M.D., Petersen, J.N., (2002). Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus sp.* *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36, 155–161.
- Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L., (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:538–582.
- Perinotto, W.M.S., Terra, A.L.M., Angelo, I.C., Fernandes, É.K.K., Golo, P.S., Camargo, M.G., (2012). *Nomuraea rileyi* as biological control agents of *Rhipicephalus microplus* tick. *Bittencourt Parasitol Res.* (111), 1743–1748.
- Piesman, J., Oliver, J.R., Sinsky, R.J., (1990). Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in vector ticks (*Ixodes dammini*). *Am J Trop Med Hyg* (42), 352–7.
- Plantard, O, Bouju-Albert, A., Malard, M.A., Hermouet, A., Capron, G., ve ark., (2012). detection of *Wolbachia* in the tick *Ixodes ricinus* is Due to the Presence of the *Hymenoptera* endoparasitoid *Ixodiphagus hookeri*. *PLoS ONE* 7(1): e30692.
- Poinar G. Jr., Poinar R., (1998). Parasites and pathogens of mites', *Annu. Rev. Entomol.*, 43, pp. 449–469.
- Punda-Polić, V., Petrovec, M., Trilar, T., Duh, D., Bradarić, N., Klismanic, Z., Avšić-Županc, T., 2002. Detection and identification of spotted fever group Rickettsiae in ticks collected in southern Croatia. *Experimental and Applied Acarology*, (28) 169–176.
- Randolph, S.E., (2008). Dynamics of tick-borne disease systems: minor role of recent climate change. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, Vol. 27, No. 2, (August 2008), pp. 367–381, ISSN 0253-1933.

- Raoult, D., Broqui, P., Roux, V., (1996). A new spotted fever group rickettsiosis. *Lancet* 348: 412.
- Raoult, D., Roux, V., (1997). Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, (10), 694-719.
- Regassa, L.B., Gasparich, G.E., (2006). *Spiroplasmas*: evolutionary relationships and biodiversity. *Front Biosci*, (11), 2983–3002.
- Reyes-Prieto, A., Yoon, H.S., Moustafa, A., Yang, E.C., Andersen, R.A., Boo, S.M., Nakayama, T., Ishida, K., Bhattacharya, D., (2010). Differential gene retention in plastids of common recent origin. *Mol Biol Evol*, (27) 1530-1537.
- Ribeiro, J.M., (1988). The midgut hemolysin of *Ixodes dammini* (Acari:Ixodidae). *J Parasitol* 74, 532-537.
- Ribeiro, J.M.C., Labruna, M. B., Mans, B. J., Maruyama, S. R., Francischetti, I. M.B., Barizon, G. C., de Miranda Santos, I. K.F., (2012). The sialotranscriptome of *Antricola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, (42), 332-342
- Rijpkema, S, Golubc, D, Molkenboer, M., Verbeek-De Kruif, N, Schellekens, J., (1996). Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Experimental and Applied Acarology*, (20), 23–30.
- Rizzoli, A., Hauffe, H.C., Carpi, G., Neteler, M., Rosà, R, (2011). Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill.*, 16.
- Rudolf, I., Mendela, J., Šikutová, S., Švec, P., Masaříková, J., Nováková, D., Buňková, L., Sedláček, I., Hubálek, Z., (2009). 16S rRNA Gene-Based identification of cultured bacterial flora from host-seeking *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* Ticks. *Vectors Of Vertebrate Pathogens Folia Microbiol.* 54 (5), 419–428.
- Sáenz-de-Cabezón Irigaray, F.J., Marco–Mancebón, V., Pérez-Moreno, I., 2003. ‘The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and compatibility with triflumeron: effects on the twospotted spider mite *Tetranychus urticae*, *Biological Control*, (26), 168–173.
- Safdar, A., Rodriguez, G.H., Balakrishnan, M., Tarrand, J.J., Rolston, K.V., (2006). Changing trends in etiology of bacteremia in patients with cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, (25), 522–6.
- Safdar, A., Rolston, K.V., (2005). *Stenotrophomonas maltophilia*: changing spectrum of a serious bacterial pathogen in patients with cancer. *Clin Infect Dis.*, (45), 1602–9.
- Samish, M., Glazer, I., (2001). Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends in Parasitology*, Vol.17, No.8, 368-371.
- Samish M., Ginsberg H., Glazer I., (2004). Biological control of ticks. *Parasitology*, (129), 389-403. doi:10.1017/s0031182004005219.
- Sathyabama, S., Vijayabharathi, R., Bruntha devi, P., Ranjith kumar, M., Priyadarisini, V.B., (2012). Screening for Probiotic Properties of Strains Isolated from Feces of Various Human Groups. *The Journal of Microbiology* Vol. 50, No. 4, pp. 603–612.
- Scola B, Bandi C, Raoult D (2005). Genus IV. *Wolbachia* Hertig 1936, 472 AL. In DJ Brenner, NR Krieg, GM Garrity, JT Staley, DR Boone, P Vos, M Goodfellow, FA Rainey, K-H Schleifer (eds.), *Bergey’s manual® of systematic bacteriology*,

- Springer, New York, p. 138-143. the Biological Control of Flystrike. Proceedings of the FLICS Conference, Launceston.
- Shapiro, M.R., Fritz, C.L., Tait, K., (2010). Rickettsia 364D : a newly recognized cause of eschar-associated illness in California. *Clinical Infectious Diseases* 50: 541-8.
- Sharma, M., Dogra, B.B., Rabindranath, M., Nageswari, G., Moumita, S., Jadhav, S., (2012). Multidrug Resistant Pantoea Agglomerans in a patient with septic arthritis- a rare report from India *International Journal Of Microbiology Research*, Issn: 0975-5276 & E-Issn: 0975-9174, Volume 4, Issue 6.
- Sonenshine, D.E., (1993)a. *Biology of Ticks*. Vol 2. Oxford University Press Oxford pp. 60-65.
- Sonenshine, D.E. (1993)b. *Biology of Ticks*. Vol 2. Oxford University Press Oxford pp. 112-113.
- Sonenshine, D.E., Lane, R.S., Nicholson W.L., (2002). *Ticks (Ixodida)*. eds. *Medical and Veterinary Entomology*. San Diego: Academic Press, 517-558.
- Sonenshine, D.E., Hynes, W.L., Ceraul, S.M., Mitchell, R., Benzine, T., (2005). Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. *Exp Appl Acarol* 36, 207-223.
- Spielman, A., Hodgson, J.C., (2000). *The Natural History of Ticks: A Human Health Perspective*. Cunha B.A., ed. *Tickborne Infectious Diseases Diagnosis and Management*. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc., 281.
- Stein, T., (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56, 845–857.
- Subramanian, G., Sekeyova, Z., Raoult, D., Mediannikov, O., (2012). Multiple tick-associated bacteria in *Ixodes ricinus* from Slovakia. *Ticks and Tick-borne Diseases*, (3), 405– 409
- Tabata, J., Hattori, Y., Sakamoto, H.,Yukuhiro, Fumiko, F., Takeshi, K., Soichi, M., Atsushi, Ishikawa, Y., Kageyama, D., (2011). Male killing and incomplete inheritance of a novel *Spiroplasma* in the moth *Ostrinia zaguliaevi*, *Microb Ecol.* 61:254–263
- Theilmann, D.A., Blissard, G.W., Bonning, B., Jehle, J.A., O'Reilly, D.R., Rohrmann, G.F., Thiem, S., Vlak, J.M., (2005). *Baculoviridae*, s: 177-185. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Academi Press*, San Diago.
- Tonbak, S., Aktaş, M., Altay, K., Azkur, A.K., Kalkan, A., Bolat, Y., Dumanlı, N., Özdarendeli, A., (2006). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: genetic analysis and tick survey in Turkey. *J. Clin. Microbiol.*, (44), 4120–4124.
- Turell, M., (2007). Role of Ticks in the Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic FeverVirus. Ergonul O, Whitehouse CA, eds. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A GlobalPerspective*, 143-154.
- Ullmann, A.J., Stuart, J.J., Hill, C.A., (2008). Tick [Genome Mapping]. *Public Health Resources*. Paper 108.
- van Overbeek L, Gassner F, van der Plas CL, Kastelein P, Rocha UND, et al. (2008) Diversity of Ixodes ricinus tick-associated bacterial communities from different forests. *Fems Microbiology Ecology*, (66), 72–84.
- Van Driesche, R. G., Bellows, T.S., (1996). *Biological control*. Chapman and Hall, New York. 539 pp.
- Vasquez-Arista, M., Smith, R.H., Olalde-Portugal, V., Hinojosa, R.E., Hernandez-Delgadillo, R., Blanco-Labra, A., (1997). Cellulolytic bacteria in the digestive

- system of *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). Journal of Economic Entomology 90, 1371-1376
- Weeks, A.R., Breeuwer, J.A.J., (2003). A new bacterium from the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* phylum that causes sex ratio distortion. In: Bourtzis K, Miller TA (eds) Insect symbiosis. CRC, Boca Raton, pp 165–176.
- Weiss, B.L. ve ark. (2006) Inter-specific transfer of bacterial endosymbionts between tsetse species: infection establishment and effect on host fitness. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7013.
- Werren, J.H., (1997). Biology of *Wolbachia*. Annual Review of Entomology 42: 587-609.
- Wilson ve ark., (2010). Insect Molecular Biology , 19 (Suppl. 2), 249–258
- Woese, C.R., (1987). Bacterial evolution. Microbiol. Rev., 51: 221–271.
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Macke, T.J., Fox, G.E., (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. Sys. Appl. Microbiol., 6: 143–151.
- Yeong-Fong Chen, M.D., Pei-Chen Chung, M.D., Ching-Hsi, H., Gung, Chang, M.D., (2005). *Stenotrophomonas maltophilia* keratitis and scleritis. Med J Vol. 28 No: 3.
- Yıldırım, F., Yaşar, K.K., Şengöz, G., Yamanlar, R., Nayman, F., İdin, K., (2009). Erişkin yoğun bakım ünitesinde *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonu ve kontrolü Ankem Derg., 23(4), 166-171.
- Yuan, D.T., (2010). A metagenomic study of the tick midgut. UT Graduate School of Biomedical Sciences at Houston: Dissertations and Theses. Paper 85.
- Zchori-Fein, E., Gottlieb, Y., Kelly, S.E., Brown, J.K., Wilson, J.M., Karr, T.L., Hunter, M.S., (2001). A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behaviour in parasitoid wasps. Proc Natl Acad Sci USA 98:1255–1260.
- Zchori-Fein, E., Perlman, S.J., Kelly, S.E., Katzir, N., Hunter, M.S., (2004)a. Characterization of a ‘Bacteroidetes’ symbiont in *Encarsia* wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of Candidatus *Cardinium hertigii*. Int J Syst Evol Microbiol (54), 961–968
- Zchori-Fein, E., Perlman, S.J., (2004)b. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. Mol Ecol (13): 2009–2016.
- Ziagova, M., Dimitriadis, G., Aslanidou, D., Papaioannou, X., Tzannetaki, E.L., Kyriakides, M.L., (2007). Comparative study of Cd(II) and Cr(VI) biosorption on *Staphylococcus xylosus* and *Pseudomonas* sp. in single and binary mixtures. Bioresource Technol 98: 2859-2865.
- Zouache, K. ve ark. (2011). Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. FEMS Microbiol. Ecol. 75, 377–389.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Haktan ÇAĞLAYAN
 Doğum Tarihi ve Yeri : 16.07.1985 / Niksar-TOKAT
 Yabancı Dili : İngilizce
 Telefon : 0 356 228 09 19 – 0 544 549 13 88
 E – Posta : haktancaglayan@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Kurumu	Yeri
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	TOKAT
Lisans	İnönü Üniversitesi	MALATYA
Lise	Mükrimin Halil Lisesi	ELBİSTAN/K.MARAŞ

İş Deneyimi

Yıl	Kurum	Alan	Statü	Yeri
2007-2008	İnönü Üniversitesi Kayısı Araştırmaları Enstitüsü	Kayısı Islah Projeleri	Çalışmacı	MALATYA