***Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*'A KARŞI ETKİLİ BAKTERİ İÇERİKLİ BİYOLOJİK ÜRÜN GELİŞTİRİLMESİ**

Merve ŞENOL KOTAN

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Doktora Tezi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

2020

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

Fusarium oxysporum f.sp. *radicis-cucumerinum*'A KARŞI ETKİLİ BAKTERİ İÇERİKLİ BİYOLOJİK ÜRÜN GELİŞTİRİLMESİ

(Development of the Bacteria-Content Biological Product Effective Against *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum)*

DOKTORA TEZİ

Merve ŞENOL KOTAN

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Erzurum
Kasım, 2020

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Merve ŞENOL KOTAN tarafından hazırlanan "*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*'a Karşı Etkili Bakteri İçerikli Biyolojik Ürün Geliştirilmesi" başlıklı çalışması 03/11/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	**Prof. Dr. Recep KOTAN** *Atatürk Üniversitesi*	…….
Danışman:	**Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ** *Atatürk Üniversitesi*	…….
Jüri Üyesi:	**Prof. Dr. Emine ORHAN** *Atatürk Üniversitesi*	…….
Jüri Üyesi:	**Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ** *Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi*	…….
Jüri Üyesi:	**Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ** *Erzurum Teknik Üniversitesi*	…….

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak 1002 projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 119O542

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, Tablo, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında sunulan "*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*'a Karşı Etkili Bakteri İçerikli Biyolojik Ürün Geliştirilmesi" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	13	**30**
Kuramsal Temeller	14	**30**
Materyal ve Yöntem	26	**35**
Bulgular	3	**20**
Tartışma	15	**20**
Tezin Geneli	15	**25**

Not: *Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının* ***%5'den*** *büyük olmaması gerekir.*

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Merve ŞENOL KOTAN	Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ
3.11.2020	3.11.2020
İmza:	İmza:

× Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☒ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve ……. sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve ……. sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak hazırladığım bu çalışmada, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarıma ışık tutan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a, tez izleme komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Recep KOTAN'a ve Sayın Prof. Dr. Emine ORHAN'a, ayrıca Sayın Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ'e ve Sayın Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmamda, laboratuvar imkanlarıyla destekleyen Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'ne ve Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ'a, Bitki Koruma Bölümü'ne ve Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Önder ÇALMAŞUR'a, bilimsel araştırma projesi ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a, sera çalışmalarımı yürütme imkanı bulduğum Atatürk Üniversitesi Bitkisel Üretim Uygulama Merkezine, bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya, Sayın Doç. Dr. Elif TOZLU'ya, Sayın Doç. Dr. Yeliz DEMİR'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fazilet PARLAKOVA KARAGÖZ'e teşekkür ederim. Labaratuvar ve sera çalışmalarımda yardımları ve destekleri ile yanımda olan kıymetli arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca, göstermiş oldukları büyük fedakarlık, sabır ve özveriyle bana hep destek olan değerli aileme ve sevgili eşim ve biricik oğluma teşekkürü bir borç bilirim.

Merve ŞENOL KOTAN

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Fusarium oxysporum f.sp. *radicis-cucumerinum*'A KARŞI ETKİLİ BAKTERİ İÇERİKLİ BİYOLOJİK ÜRÜN GELİŞTİRİLMESİ

Merve ŞENOL KOTAN

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Amaç: Bu çalışmada, bakteri içerikli ve uygun bir katı taşıyıcılı formülasyon geliştirilerek, hıyarda Fusarium kök ve gövde çürüklüğü hastalığına sebep olan *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*'a karşı biyoajan olarak kullanılabilirliğini ve bitki gelişimine etkisini incelemek amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada, biyoajan bakterilerin (MF-1, TV-6F, TV-17C, C-37A) antifungal etkinliği belirlenmiş ve 16s rDNA dizi analiziyle tanılaması yapılmıştır. Bakterilerin optimum geliştiği ortam, pH ve sıcaklık şartları belirlenerek, 12 farklı formülasyon oluşturulmuştur. Formülasyonların farklı dozlarda hastalığa karşı etkinliği, serada hıyar bitkilerine test edilmiştir. En etkili olduğu belirlenen 2 formülasyonla, hıyar bitkilerinde hastalık şiddeti değerlendirilmesi ve bitki analizleri yapılmıştır. Ayrıca 12 formülasyonun oda ve buzdolabı sıcaklıklarında, 6 ay boyunca raf ömürleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Bulgular: Çalışma sonucunda, *Pseudomonas chlororaphis* olarak tanılanan MF-1 ve C-37A izolatları ile *Bacillus subtilis* olarak tanılanan TV-6F ve TV-17C izolatlarının endosporları kullanılarak, $1,6\times10^{9}$ – 4×10^{7} kob/g aralığında bakteri içerikli formülasyonlar oluşturulmuştur. Genel olarak hastalığa karşı, formülasyon uygulamalarının kimyasal ilaç uygulamasına göre antifungal etkinliğinin daha yüksek olduğu, ayrıca bitki beslenmesine de önemli katkı sağladığı belirlenmiştir. Formülasyonların raf ömrü çalışmalarında, 6. aydaki bakteri sayıları $8,9\times10^{9}$ – $9,3\times10^{6}$ kob/g aralığında bulunmuştur.

Sonuç: Hıyarda Fusarium kök ve gövde çürüklüğü hastalığına karşı bu çalışmada geliştirilen biyolojik ürünler, kimyasal ilaçlara göre önemli üstünlüklerinden dolayı alternatif olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus subtilis*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, antifungal, biyopestisit, raf ömrü

Kasım 2020, 121 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

DEVELOPMENT OF THE BACTERIA-CONTENT BIOLOGICAL PRODUCT EFFECTIVE AGAINST *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*

Merve ŞENOL KOTAN

Supervisor: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Purpose: This study aimed to develop the bacterial formulations with a suitable solid carrier and to investigate its usability as biogenic agent against *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, which causes Fusarium root and stem rot disease in cucumber and also its effect on plant growth.

Method: In study, the antifungal activity of bioagent bacterias (MF-1, TV-6F, TV-17C, C-37A) was determined and diagnosed by 16s rDNA sequence analysis. By determining the medium, pH and temperature conditions in which bacteria grows optimally, 12 formulations were created. The efficacy of formulations against the disease in different doses was tested on cucumber plants in greenhouse. With the most effective 2 formulations, disease severity assessment and plant analysis were made on cucumber plants. Besides, for 12 formulations, its shelf lives were tried to be determined at room and refrigerator temperatures for 6 months.

Findings: By using the endospores of TV-6F, TV-17C isolates (*Bacillus subtilis*) and MF-1, C-37A isolates (*Pseudomonas chlororaphis*), the bacterial formulations were created in the range of 1.6×10^9 – 4×10^7 cfu/g. In general, it was determined that the antifungal efficiency of the formulations against the disease was higher than the chemical drug application, and also contributed significantly to plant nutrition too. In the shelf life studies of the formulations, bacterial counts in the 6th month were found in the range of 8.9×10^9 – 9.3×10^6 cfu/g.

Results: The biological products developed in this study against Fusarium root and stem rot disease in cucumber, can be used as an alternative due to their significant advantages over chemical drugs.

Keywords: *Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus subtilis*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, antifungal, biopesticide, shelf life

November 2020, 121 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ xii
GİRİŞ 1
KURAMSAL TEMELLER 8
Kabakgillerde Görüleren *F. oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*'un Neden Olduğu Kök ve Gövde Çürüklüğü ve İlgili Çalışmalar 8
Biyolojik Mücadelede PGPB Bakterilerinin Kullanımı ve Hıyarda *F. oxysporum'la* Biyolojik Mücadele Çalışmaları 10
Dünyadaki Ticari *B. subtilis* ve *Pseudomonas* sp. Kaynaklı Geliştirilen Ticari Mikrobiyal Biyopestisitler ve Mikrobiyal Kaynaklı Formülasyonlar ile İlgili Çalışmalar 17
MATERYAL ve METOD 24
Materyal 24
Çalışmada kullanılan patojen fungus 24
Çalışmada kullanılan biyoajan bakteriler 24
Araştırma yerinin tanımı ve çalışmada kullanılan hıyar çeşidi 24
Çalışmada kullanılan yetiştirme ortamı 24
Çalışmada kullanılan besi ortamları 25
Enzim aktiviteleri ölçümünde kullanılan çözeltiler 27
Metod 29
ET 46 fungusunun patojenite testi 29
Petride antifungal deneme 29
ET 46 Fungusunun Kabakgillerde Patojenitesinin Test Edilmesi 30
Bakterilerde DNA izolasyonu 30

Bakterilerde fitaz ve kitinaz aktivitesinin ölçülmesi 32
Canlı bakteri sayılarının hesaplanması 33
Bakteri gelişimi için optimum ortamın belirlenmesi 34
Bakteri gelişimi için optimum pH'nın belirlenmesi 34
Bakteri gelişimi için optimum sıcaklık koşullarının belirlenmesi 34
Katı taşıyıcılı formülasyon çalışmaları 35
Hıyar (*Cucumis sativus*) bitkisinin ekimi ve yetiştirlmesi 38
ET- 46 fungusunun kepeğe sardırılması 38
Katı taşıyıcılı formülasyonların oluşturulması 39
Sera çalışmaları 41
Bitki ve yetiştirme ortamı analizleri 43
İstatistik Analiz 47
Katı taşıyıcılı Formülason Raf Ömrü Tayini 47
ARAŞTIRMA BULGULARI 48
Patojen Fungusun Virülanslık Test Sonuçları 48
Petride Antifungal Denemenin Sonuçları 51
Bakterilerin 16s rDNA Dizi Analizi Sonuçları 52
Bakterilerde Kitinaz ve Fitaz Enzimi Aktivitesi Sonuçları 53
Bakterilerin Optimum Geliştiği Besiyeri Sonuçları 55
Bakterilerin Optimum Geliştiği pH Sonuçları 56
Bakterilerin Optimum Geliştiği Sıcaklık Sonuçları 57
Katı Taşıyıcılı Formülasyon Çalışma Sonuçları 59
Katı taşıyıcılı formülasyon ön deneme sonuçları 59
Katı taşıyıcılı formülasyonda kullanılacak koruyucu maddelerin bakteriler üzerine antibakteriyel etkisi 63
Katı Taşıyıcılı Formülasyonların Üretimi Aşaması Sonuçları 63
Sera Çalışması Sonuçları 65
Formülasyonların dört dozda bitkiye uygulanması sonuçları 65
Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması sonuçları 67
Bitki ve Yetiştirme Ortamı Analiz Sonuçları 69
Bitki büyüme parametre sonuçları 69
Bitki yaprağında besin elementi analizi sonuçları 71
Bitki yaprağında antioksidan enzim aktivitelerinin sonuçları 71
Yetiştirme ortamı besin elementi analizi sonuçları 72
Katı Taşıyıcılı Formülasyonların Raf Ömrü Sonuçları 73

TARTIŞMA VE SONUÇ..... 77
KAYNAKLAR..... 93
ÖZGEÇMİŞ..... 107

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Dünyada üretilen *B. subtilis* kaynaklı ticari biyopestisitler 18
Tablo 2. Dünyada üretilen Pseudomonas sp. kaynaklı ticari biyopestisitler 19
Tablo 3. Yetiştirme ortamı besin elementi değerleri 25
Tablo 4. Ön denemede kullanılan katı taşıyıcılı formülasyonların içerikleri 35
Tablo 5. Çalışmada kullanılan katı taşıyıcılı formülasyonları 40
Tablo 6. Farklı ET 46 funguslarının hıyar bitkisinde neden olduğu hastalık skalasına göre değerlendirilmesi 48
Tablo 7. Biyoajan bakterilerin NA ve PDA besiyerinde patojen fungusun gelişimine etkisi . 51
Tablo 8. Bakteri izolatlarına ait 16S rDNA bölgesinin tarama sonucu 52
Tablo 9. Bakterilerin (NH4)2SO4 çöktürme aralıkları ve bu aralıklarda belirlenen fitaz ve kitinaz enzim aktivite değerleri 54
Tablo 10. Bakterilerin farklı besiyerlerindeki gelişme sonuçları 55
Tablo 11. Bakteri izolatlarının pH bakteri sayısı arasındaki ilişkisi 56
Tablo 12. Bakteri izolatlarının farklı sıcaklıklarda gelişme durumları 58
Tablo 13. Formülasyon-C ve Formülasyon-D'nin bakteri sayım sonuçları 60
Tablo 14. MF-1 ve TV-17C bakteri izolatlarının zamana göre sayım sonuçları 61
Tablo 15. TV-6F ve TV-17C bakterilerinin DSM ve BSM ortamında endospor üretim sonuçları 61
Tablo 16. Koruyucu maddelerin bakteriler üzerine etkisi 63
Tablo 17. Katı taşıyıcılı formülasyonların farklı üretim aşamalarındaki sayım sonuçları 64
Tablo 18. Formülasyonların dört dozda bitkiye uygulanması hastalık şiddeti sonuçları 66
Tablo 19. Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması hastalık şiddeti sonuçları 68
Tablo 20. Bitki gövde özelliklerinin sonuçları 69
Tablo 21. Bitki kök özelliklerinin sonuçları 70
Tablo 22. Bitki yaprağında besin elementi analiz sonuçları 71
Tablo 23. Bitki yaprağında antioksidan enzim aktivitelerinin sonuçları 72
Tablo 24. Yetiştirme ortamı besin elementi analizi sonuçları 73
Tablo 25. Katı taşıyıcılı formülasyonların oda ve buzdolabı sıcaklığındaki raf ömürleri 75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 2007-2010 yılları arasında değişim gösteren biyopestisit pazarı..... 5
Şekil 2. Dünyada kullanılan biyopestisit türlerinin oranları 5
Şekil 3. Denemede kullanılan yetiştirme ortamının karıştırılmadan önceki görüntüsü..... 25
Şekil 4. Hastalık skalası 29
Şekil 5. Qiacube DNA- RNA izolasyon robotu 30
Şekil 6. Hıyar tohumunun viyollere ekimi ve sonrası 38
Şekil 7. ET 46 Fungusunun kepeğe sardırılma işlemi ve sonuç görüntüsü 39
Şekil 8. Katı taşıyıcılı formülasyonlar 41
Şekil 9. Formülasyonların dört dozda uygulaması aşamaları ve son halinin görüntüsü 42
Şekil 10. Protein tayininde kullanılan standart grafik 47
Şekil 11. Farklı ET 46 fungusunun uygulandığı hıyar bitkileri 49
Şekil 12. ET 46 F. oxysporum f.sp. radicis-cucumerinum'un neden olduğu kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığının kabakgillerde görüntüsü 50
Şekil 13. Biyoajan bakterilerin NA besiyerinde patojen fungusun gelişimine etkisi..... 51
Şekil 14. Biyoajan bakterilerin PDA besiyerinde patojen fungusun gelişimine etkisi..... 52
Şekil 15. Bakterilerin 16S rDNA PCR ürünlerinin jel elektroforezinde görüntüleri 53
Şekil 16. Bakterilerin farklı besiyeri ortamlarındaki gelişme grafiği..... 56
Şekil 17. MF-1 ve C-37A için (pH – bakteri sayısı) ilişkisi 57
Şekil 18. TV-6F ve TV-17C için (sıcaklık – bakteri sayısı) ilişkisi..... 57
Şekil 19. MF-1 ve C-37A bakterileri için (sıcaklık – bakteri sayısı) ilişkisi 58
Şekil 20. TV-6F ve TV-17C bakterileri için (sıcaklık – bakteri sayısı) ilişkisi 59
Şekil 21. Formülasyon-C ve Formülasyon-D için süreçteki bakteri sayısı değişimi 60
Şekil 22. TV-6F ve TV-17C bakterilerinin DSM ve BSM ortamında endospor üretimi 62
Şekil 23. TV-6F ve TV-17C bakterilerinin DSM ve BSM ortamında endospor üretimi 62
Şekil 24. Katı taşıyıcılı formülasyonların farklı üretimi aşamasındaki sayım sonucu petri görüntüleri..... 65
Şekil 25. Sera çalışmalar için oluşturulan hastalık skalası..... 67
Şekil 26. Hıyar bitkisinde ET 46 fungusunun oluşturduğu hastalık şiddetine etkili olan formülasyonların görüntüsü 67
Şekil 27. Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması sonuç görüntüsü..... 68
Şekil 28. Pozitif kontrol, K-1 ve K-11 uygulamalarının kök gelişimine etkisi..... 70

Şekil 29. Katı taşıyıcılı formülasyonların oda sıcaklığında başlangıç ve 6. aydaki bakteri sayıları 76
Şekil 30. Katı taşıyıcılı formülasyonların buzdolabı sıcaklığında başlangıç ve 6. aydaki bakteri sayıları 76

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

cm : Santimetre
DNA : Deoksiribonukleik Asit
DNSA : Dinitrosalisilik Asit
EPA : ABD Çevre Koruma Ajansı
EU/mL : Enzyme Units per milliliter
FAO : Dünya Gıda ve Tarım Teşkilatı
kob : Koloni oluşturan birim
L : Litre
M : Molar
mg : Miligram
ml : Mililitre
mM : Milimolar
mm : Milimetre
NA : Nutrient agar
NB : Nutrient broth
nm : Nanometre
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA : Potato dextrose agar (Patates dekstroz agar)
rpm : Dakikada devir sayısı
sp. : Species (tür, tekil)
TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu
WEF : Dünya ekonomi formu
µl : Mikrolitre

GİRİŞ

Toplumların sosyal ve ekonomik gelişiminde önemli bir yere sahip olan tarım, beslenme ve ticari faaliyetler olarak elzem iki amaca hizmet etmektedir. Hızla artan nüfus ve sanayileşmeye bağlı olarak tarım alanlarının giderek azalması, olumsuz çevre koşulları tarımsal ürünlerin önemini gün geçtikçe daha da arttırmıştır. Kimyasalların aşırı kullanımı da azalan tarım alanlarını iyice elverişsiz hale getirmiştir.

Türkiye istatistik kurumu (TÜİK) verilerine göre 30 yıl sonra dünya nüfusunun 100 milyonu geçeceği bildirilmiştir. Dünya ekonomi formu (WEF) verilerine göre Dünya nüfusunun 2050 yılında 9,8 milyar insanı aşacağı tahmin edilmektedir. Bu bakımdan, artan dünya nüfusunun beslenme ihtiyacının karşılanabilmesi için önümüzdeki 30 yıllık süreçte gıda üretiminin yaklaşık %70 oranında bir artış sağlanması gerektiği öngörülmektedir (Anonim 2020a). Dünya nüfusunda gerçekleşen ve beklenen bu önemli artışa karşın, dünyanın yüzölçümü değişmemekle birlikte yeni yerleşim yerlerinin açılması yeni fabrikalar kurulması ve erozyon gibi nedenlerle, tarıma elverişli alanlar giderek azalmaktadır. Diğer taraftan 2018 yılı Dünya Gıda ve Tarım Teşkilatı'nın (FAO) raporlarına göre, dünya nüfusunun %10,8'i yeterli derecede beslenememekte, hatta açlığa bağlı nedenlerle her yıl milyonlarca insan ölmektedir (Anonim 2020b). Artan Dünya nüfusunun ihtiyacını karşılayacak bitkisel üretim için yeni alanların tarıma açılması da mümkün görünmemektedir (Akköprü ve Demir 2005).

Tarım alanlarını artırmak mümkün olamayacağından, ürün verimini artırmakla birlikte soğuk, kurak ve tuzlu alanların da kullanılması gerekmektedir. Ancak, bitkisel üretimi sınırlayan birçok problemler bulunmaktadır. Verimi yüksek ve tarıma uygun olmayan koşullarda büyüyebilen, besin içeriği zengin yeni bitki genotiplerinin geliştirilmesine küresel anlamda büyük bir gereksinim bulunmaktadır. Bu nedenle modern biyoteknolojinin ilk ve en önemli konusu tarım olmuştur. Tarımsal ürünlerin, verim artışının sağlanması ve daha nitelikli hale gelmesinin yolu Tarımsal Biyoteknoloji'den geçmektedir. Tarımsal Biyoteknoloji, dünya tarımının geleceğine yön verecek bir bilim dalıdır. Tarımsal Biyoteknoloji uygulamaları ile tarım ürünlerinde verim artışı, çeşit geliştirme, dayanıklılık, ürün kalitesinin artırılması ve raf ömrünün uzatılması, zararlılar ile mücadele gibi amaçlar hedeflenmekte ve gerçekleştirilmektedir.

FAO tarafından yayınlanan istatistiklere göre; her yıl dünya genelinde tarım ürünlerinin en az %12'lik bir bölümü (tarla ve depo şartlarında) patojen mikroorganizmaların neden olduğu bitki hastalıklarından, %20'lik bir bölümü ise böceklerden dolayı kaybedilmektedir. Bu oranın,

az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde daha da fazla olduğu görülmektedir. Verim ve kalite üzerine olumsuz etki eden biyotik faktörler arasında; hastalık etmeni olarak bilinen patojenler (fungus, bakteri, virüs ve mikoplazma, spiroplazma), zararlılar olarak bilinen hayvansal organizmalar ve yabancı otlar sayılabilir (Agrios 1997; Şahin 2010).

Tarımsal üretimin yapıldığı bölgelerde, biyotik faktörlerle mücadele etmek ve verim artışı için modern girdilerin kullanımı oldukça fazladır. Hatta bu girdiler kullanılmadan üretim yapılması neredeyse imkansız hale gelmiştir. Bu girdilerin başında kimyasal gübre ve pestisitler gelmektedir. Ancak, verimi artırmak amacıyla tarımsal üretimde uygulanan başta yoğun kimyasal gübre ve pestisit kullanımı olmak üzere birçok hatalı teknikler sebebi ile insan sağlığı ve toprak canlılığı olumsuz yönde etkilenmekte ve sürdürülebilir bir tarım mümkün olmamaktadır (Aksoy and Yılmaz 2008). Gıda maddelerindeki ilaç kalıntıları, insan ve hayvan sağlığının tehdit edilmesi, çevre kirliliği ve yüksek ilaç fiyatları da eklenince, kimyasal mücadeleye alternatif çevre dostu ve daha ucuz mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir.

Gelişmiş ülkelerde kimyasal pestisit ve gübre tüketimi azaltılmakta, hastalık-zararlı mücadelesinde ve bitki beslenmesinde kullanılan biyolojik ürünlerinlerin miktarı arttırılmaktadır. Bu yüzden son yıllarda çevreyle dost, toksik etki göstermeyen biyolojik ürünlerin kullanımına yönelik çalışmalar hızla artmaktadır. Bu çalışmalar ışığında tarımsal üretimde aşırı kimyasalların kullanımının olumsuz yan etkilerini azaltmak veya bütünüyle ortadan kaldırmak için alternatif tarımsal üretim sistemleri geliştirilmiştir (Şahin 2010). Tarımsal üretim sistemlerinde en çok üzerinde durulan konu; tarımda kullanılan kimyasalların azaltılarak biyolojik yöntemlerle sorunların çözülmesidir. Bu sayede tarımsal üretimde sentetik ürünleri azaltan, organik tarım stratejileri önem kazanmıştır (Aksoy and Yılmaz 2008). Böylece kimyasal mücadele yerine biyolojik mücadele, kimyasal gübre yerine organik ve mikrobiyal gübre yöntemleri geliştirilmiştir ve mikrobiyal temelli biyoteknolojik yöntem ve ürünler alternatif olarak sunulmuştur. Bu ürünlerin üretimi ve tarımda yapılan uygulamaları oldukça parlak ve geleceğe ışık tutan sonuçlar göstermektedir.

Ülkemiz, kendi sebze ve meyvesini yetiştirmede çok önemli bir yere sahip olduğu gibi, kabakgil yetiştiriciliğinde de diğer ülkelere göre üst sıralarda yer almaktadır. Kabakgiller familyasından ve önemli kültür bitkilerinden olan hıyar (*Cucumis sativus* L.) tek yıllık bir bitkidir. Doksan cins ve 750 türle, ülkemizde sebzeler içinde önemli bir yere sahiptir. Hıyar, bileşiminde bulundurduğu vitamin, enzim ve mineral maddeler yönüyle zengin bir üründür. Ülkemizde hıyar, taze tüketiminin yanı sıra turşu sanayinde de kullanılmakta ve yaz aylarında

dışarıda, kış aylarında örtü altında yetiştirilerek üretimi bütün bir yıl yapılabilmektedir (Günay 1993).

FAO verilerine göre; 2018 yılında, dünyada 1 milyon 984 bin 518 hektar alanda, 75 milyon 219 bin 440 ton hıyar (*Cucumis sativus*) üretilmiştir. Dünya hıyar üretiminde Türkiye yıllık 1.916.645 ton üretimle üçüncü sırada yer almaktadır (Anonymous 2020a). Hıyar üretimi, ülkemizin hemen her yöresinde yapılabilmekle birlikte, 2019 yılında sofralık hıyar üretimi 168.488 ton ve turşuluk hıyar üretimi 1.748.157 ton olarak gerçekleşmiştir (Anonim 2019). Ancak hıyar bitkisi, pek çok hastalık ve zararlı etmenlerin saldırısına maruz kalarak ciddi verim kayıplarının yaşandığı önemli bir bitkidir. Ülkemizde ve dünyada bu sebzenin verimini düşüren pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin başında da patojen fungusların sebep olduğu hastalıklar gelmektedir (Kurt *et al.* 2002).

Phythium spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Alternaria* spp. ve *Sclerotinia* spp. cinsine dahil pek çok fungus türleri birçok sebze fidelerinde olduğu gibi hıyar fidelerinde de kök ve kök boğazı çürüklüğü veya çökerten olarak da adlandırılan hastalığa veya solgunluğa sebep olmakta, daha fide dönemindeyken bitkinin ölmesine sebep olmaktadır. Hatta sağlıklı fideler dikilse bile sera ve tarla koşullarında bu patojenler hıyarda çok büyük boyutlarda zarara sebep olabilmektedirler (Anonim 2010).

Hıyar bitkisinde *F. oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*'un neden olduğu kök ve kök boğazı çürüklüğü, en önemli fungal hastalık etmenlerinden biridir. Bu fungus hıyar bitkisini bütün gelişme dönemlerinde etkileyebilmektedir (Vakalounakis 1996; Tok 2010; İncekara 2011). Bu hastalık ilk kez Yunanistan'dan bildirilmiş olup, kendi ülkemizin de içinde bulunduğu birçok ülkede yaygın olarak bulunmaktadır. Bu ülkeler arasında Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Yunanistan, İsrail, Japonya, Çin, Almanya, Avustralya ve Hollanda sayılabilir (Martyn and Gordon 1996; Vakalounakis and Fragkiadakis 1999; Altın 2004).

Fungal hastalıklara karşı değişik mücadele yöntemleri kullanılmaktadır. Ülkemizde en çok kullanılan mücadele yöntemi ise kimyasal mücadele yöntemidir. Kimyasal mücadele de etkin olarak kullanılan fungisitler, hastalıkların mücadelesinde ümit verici olmalarına karşın fitotoksite, çevre kirliliği ve insan sağlığına zararlı etkileri nedeniyle problem oluşturmaktadır (Bora *et al.* 2004; Kotan 2020).

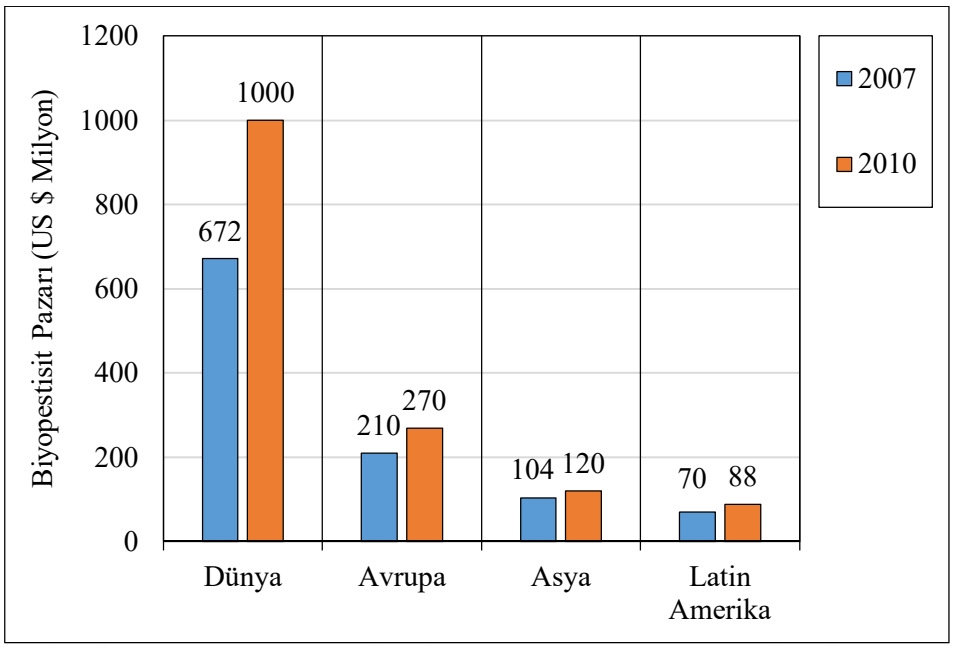
Bitki hastalıklarının kontrolünde pestisit kullanımının özellikle toprak kökenli patojenlere uygulanmasında karşılaşılan çevresel, teknik ve ekonomik zorluklar nedeniyle istenen hastalık kontrolü sağlanamamaktadır. Uzun süreli toksik kimyasalların muameleleri sonucu, pestisitlere karşı direnç kazanan patojenlerin ve zararlıların kontrolü güçleşmiş ve yeni uygulamaları yapılan pestisitlere karşı da çok çabuk direnç geliştirmeye başlamışlardır.

Bilinçsiz kullanılan pestisitler nedeniyle biriken kimyasallar, toprak altı patojenler ile mücadelede bitkisel üretimde son yılların en önemli sorunlarından biri olan kalıntı problemini gündeme getirmiştir. Dayanıklı çeşit geliştirme yöntemi ile de geniş bir patojen grubunun sebep olduğu bu hastalıkların kontrolü mümkün olmamaktadır (Braunbeck *et al.* 2005).

Bu sebepler ışığında bitki hastalıklarının kontrolünde çevre ve insan sağlığı için olumsuzlukları en aza indiren etkili kontrol yöntemlerinin kullanılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Özellikle toprak kaynaklı fungal patojenlerin kontrolüne yönelik alternatif mücadele yöntemleri içerisinde biyolojik mücadele oldukça önemli yer tutmaktadır. Biyolojik mücadelede kullanılan, toprak ve bitki gibi tamamen doğal kaynaklardan üretilen biyopreparatların en önemli özelliği entegre mücadele yönetimine uygun olması, düşük dozlarda kullanılması, insan sağlığı ve çevre kirliliği yönünden düşük riskli grupta yer almasıdır. (Caeser and Burr 1991; Delen vd 2005; Chung *et al.* 2010). Bu sayede biyolojik mücadelenin hastalıkların kontrolünde çevresel olarak kabul edilebilir ve sürdürülebilir olduğu düşünülmektedir. Tarımda biyolojik mücadele amaçlı kullanılan, biyopestisit ve biyogübre 1990'lı yıllardan sonra yaygınlaşmıştır. Kimyasallara alternatif yeni bir büyük pazar oluşturma çabası özellikle gelişmiş ülkelerde hızlı bir şekilde sürdürülmektedir. Moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, bitki hastalıklarına karşı etkili biyolojik mücadele programlarının oluşturulmasını ve uygulanmasını daha da teşvik etmiştir.

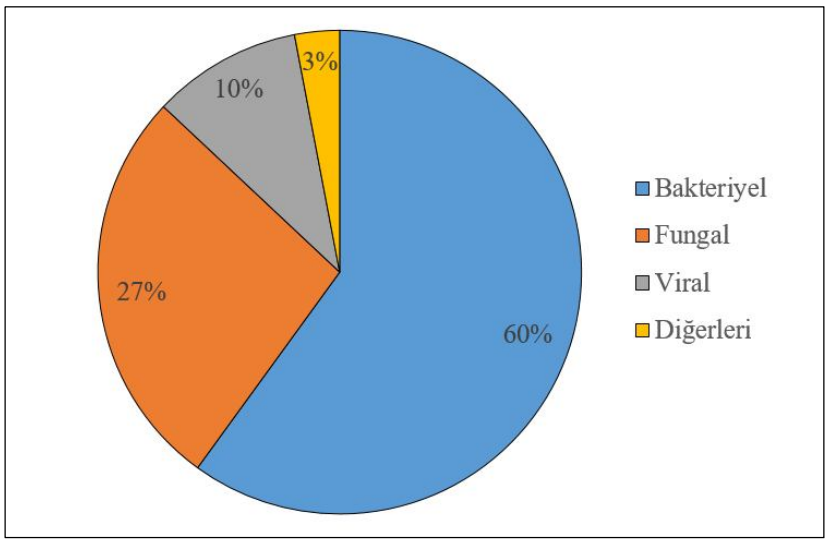
Yakın zamana kadar, dünya pestisit piyasası 30 milyon dolarlar seyrinde iken biyopestisit satışları sadece bu pazarın %1'i kadar. 1990'lı yıllarda *B. thuringiensis* kaynaklı biyopestisit, tüm biyopestisit satışlarının %90'ı gibi bir oranla neredeyse tüm pazara hakim olduğu belirtilmiştir (Rosell *et al.* 2008). Ancak gelişen teknoloji ile birlikte bu satışların oranları ve kaynakları da hızla değişmiştir. Bu göstergelere paralel olarak, 2012 yılında biyopestisit pazarı yaklaşık 3,3 milyon dolara kadar yükselmiştir. Bu durum, sentetik pestisit satışlarında gün geçtikçe artan bir düşüş yaşandığının göstergesidir (Glare *et al.* 2012).

2013 yılında biyopestisit pazarı küresel bitki koruma pazarının %3'ünü temsil ederken, 2015 yılına gelindiğinde bu oran %5'lere yükselmiştir. Küresel biyopestisit pazarı 2007'den 2012 yılına %200 artış göstermiştir. Şekil 1'de 2007-2010 yılları arasında değişen biyopestisit pazarı gösterilmiştir. En büyük biyopestisit pazarını Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada üstlenmektedir. Bu bölgeyi takiben Avrupa, Pasifik Asya ve Latin Amerika gelmekte ve batı dünyasında 170-200 biyopestisit şirketi bulunmaktadır (Anonymous 2016a).



Şekil 1. 2007-2010 yılları arasında değişim gösteren biyopestisit pazarı (Koul 2011)

2019 yılı dünya biyopestisit üretimi 4,4 milyon dolar iken 2027 yılında %13,1 artışla 10,63 milyon doları bulacağı düşünülmektedir (Anonymous 2020b). Son yıllarda yapılan bilimsel araştırmalarda çok sayıda mikroorganizmanın organik tarımda başarılı bir şekilde kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmalar sayesinde kültür bitkilerinde ürün kaybına neden olan hastalık ve zararlılara karşı, doğada mevcut yararlı organizmaların kullanılmasının hem çevre hem de insan sağlığı açısından önemli olduğu ortaya koyulmuştur (Aksoy and Yılmaz 2008). Günümüzde kullanılan biyopestisitlerin en büyük grubunu mikrobiyal biyopestisitler oluşturmaktadır (Khachatourians 2009). Mikrobiyal büyopestisit türleri içinde ise bakteriler çok önemli bir yer tutmaktadır. Şekil 2'de de görüldüğü gibi dünyada bakteri kaynaklı biyopestisit pazarı, toplam pazarın %60'ını oluşturmaktadır (Kabaluk 2010).



Şekil 2. Dünyada kullanılan biyopestisit türlerinin oranları (Kabaluk 2010)

Tarımda en çok kullanılan mikroorganizmalar şüphesiz bakterilerdir. Bakteriler içerisinde de bitki kök rizosferinde bulunan Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakterilerin (Plant Growth Promoting Bacteria-PGPB) kullanılmasıyla, bitki hastalık ve zararlıları kontrol edilmekte, bitki büyümesi teşvik edilmekte, bitkinin stres koşullarına dirençli ve dayanıklı olabilmesi için bitki sistemik dayanıklılığı teşvik edilmekte, topraktaki organik ve inorganik maddeleri parçalayarak bitkinin almasını kolaylaştırabilmek gibi daha birçok özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir (Mohammadi ve Kotan 2014). Bu çalışmalar ışığında birçok biyoteknolojik ürünün geliştirilmesine olanak verilmiş, birçok biyoteknolojik ürünün mikroorganizma kaynaklı olarak üretilmesi sağlanmıştır. Bunlara en güzel örnek mikrobiyal gübre ve biyopestisit üretimleridir.

Özellikle toprak kaynaklı patojenlerin biyolojik mücadelesine yönelik ülkemizde yoğun çalışmalar yapılmış ve PGPB bakterileri kullanılarak pek çok hastalık önlenebildiği gibi bitki gelişim parametreleri ve verim üzerine de etkili olan başarılı sonuçlar alınmıştır (Liu *et al.* 1995; Altın 2004; Wang *et al.* 2005; Altın ve Bora 2015; Karagoz *et al.* 2018; Tozlu *et al.* 2019). Rhizoferik ve endofitik mikroorganizmaların kullanımı *Fusarium oxysporum* ile rekabete girmeleri sebebiyle etkili yöntemlerdir. Biyoajanların en iyi çalıştıkları ortamın bitki kök rizosferi olduğu düşünülünce, kök hastalıkları ile mücadelede geniş spektrumlu biyoajanların başarılı olabileceğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. *Pseudomonas* spp. ve *Bacillus* spp. bitki gelişimini teşvik eden kök bakterileri ile *Fusarium*'un inhibe edilmesini sağlamaktadır (Chung *et al.* 2010; Li *et al.* 2011; İncekara 2011; Ajilogba *et al.* 2013; Senol *et al.* 2014; Şahinoğlu ve Tozlu 2019; Çakar 2020).

Ülkemizde *F. oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*'un neden olduğu kök ve kök boğazı çürüklüğüne karşı henüz ruhsatlı bir biyopestisit bulunamamakta, hatta yerli izolatlarımızdan geliştirilmiş ve tescil almış bir biyopestisit henüz bulunmamaktadır. Yerli mikrobiyal gübre tescili ise çok az sayıdadır. Ancak, dışarıdan satın alınan çok sayıdaki biyopestisit ve biyolojik gübre yaygın bir şekilde üreticiler tarafından kullanılmaktadır (Kotan 2020). Ülkemizin ekonomik menfaati için, elimizdeki milli biyolojik zenginliği değerlendirerek bu konuda dışa bağımlılıktan kurtarmak ve topraklarımızı daha işlenebilir daha verimli hale getirebilmek adına, biyolojik ürünlerin geliştirilmesine yönelik biyoteknolojik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Nitekim dünyanın önde gelen hıyar üreticilerinden Türkiye'de, hıyar bitkisinde ciddi hastalık sebebi olan Fusarium kök ve gövde çürüklüğü hastalığına karşı, dünyada kullanımı giderek yaygınlaşan ancak ülkemizde kullanımı çok sınırlı olan mikrobiyal ürünlerin geliştirilebilmesi ve kullanılabilirliği sorusu bu tez çalışmasının temel hipotezini

oluşturmaktadır. Bu bağlamda çalışmanın amacı; ülkemizde ciddi verim kayıplarına sebep olan birçok hastalık ve zararlıya karşı biyopestisit özelliğine sahip olduğu belirlenmiş olan bakteri izolatları ile uygun bir katı taşıyıcı geliştirilerek, hıyarda Fusarium kök ve gövde çürüklüğü hastalığına karşı biyoajan olarak kullanılabilirliği ve bitki gelişimi üzerindeki etkisinin belirlenmesidir. Tez çalışması, tarımsal anlamda dışa bağımlılığı azaltmayı, sürdürülebilir tarımın devamlılığını sağlamayı, mevcut kaynakları korumayı-iyileştirmeyi ve gelecek kuşaklara temiz yaşanabilir bir çevre bırakmayı genel olarak amaçlamaktadır.

Ülkemizde biyolojik mücadele ile ilgili çalışmaların sayısı oldukça fazladır. Yapılan bu çalışmalarda değişik gruplardaki hastalık ve zararlılara karşı yüksek etkinliğe sahip çok sayıda bakteri ve fungus izolatı elde edilmiştir. Etkili bulunan izolatların laboratuvar, sera ve arazide etkinlikleri test edilmiştir. Bu çalışmada Dünyada olduğu gibi ülkemizde de ciddi sorun olan kök hastalığına karşı yerli bir biyoajanın geliştirilmesine yönelik kapsamlı bir çalışmanın yürütülmüş olması, ileride yurt dışında yapılacak toksikolojik ve ekotoksikolojik çalışmaların neticesinde ruhsatlandırılmaya yönelik önemli bir adım atılmış olacaktır.

Bu tür hastalıklara karşı kullanılan pestisitlere alternatif biyolojik bir ürünün ülkemizde ilk defa yapılacak olması, akademik boyutta yapılan çalışmalarda elde edilen ürünlerin, uygulamaya aktarılması ve katma değere dönüştürülmesi noktasına taşınabilir olması, ülkemizden elde edilen izolatlardan oluşturulmuş mikrobiyal ürünün, yurt dışından satın alınan mikrobiyal ürünlere göre rekabette önemli üstünlüklere sahip, daha avantajlı ve dışa bağımlılığı azaltmada önemli bir adım olması, bu tez çalışmasının özgün değerini oluşturmaktadır. Ülkemiz kaynaklı tescilli biyolojik ürünlerin yaygınlaşması ile pestisit tüketiminde belli bir oranda azalma sağlanabilecek ve tarım alanlarında bozulan toprak yapısı uzun bir süreçte düzelme eğilimine girmiş olacaktır.

KURAMSAL TEMELLER

Kabakgillerde Görüleren *F. oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*'un Neden Olduğu Kök ve Gövde Çürüklüğü ve İlgili Çalışmalar

Ülkemiz kendi sebze ve meyvesini yetiştirmede çok önemli bir yere sahiptir. Bu sınıflandırmanın içinde kabakgil yetiştiriciliğinde de ülkemiz diğer ülkelere göre üst sıralarda yer almaktadır. Kabakgil bitkileri, Plantae alemi, Magnoliophyta şubesi, Magnoliopsida sınıfı, Cucurbitales takımı, Cucurbitaceae familyası içindedir. Bu familya içinde yaklaşık olarak 119 cins ve 825 tür mevcuttur. Bu familyadaki önemli kültür bitkisi türleri; hıyar (*Cucumis sativus* L.), karpuz (*Citrullus vulgaris* L.), kavun (*Cucumis melo* L.), bal kabağı (*Cucurbita moschata* L.), sakız kabağı (*Cucurbita pepo* L.), kestane kabağı (*Cucurbita maxima* L.) ve acur (*Cucumis anguria* L.) olarak sıralanabilir (Andres, 2004). Kabakgiller familyasından tek yıllık bir bitki olan hıyar, 90 cins ve 750 türle sebzeler içinde önemli bir yere sahiptir. Hıyar bileşiminde bulundurduğu vitamin, enzim ve mineral maddeler yönüyle zengindir. Hıyar, taze tüketiminin yanı sıra turşu sanayisinde de kullanılmaktadır (Günay 1993).

Ülkemizde ve dünyada bu sebzenin yetiştirilmesini engelleyen pek çok faktör bulunmaktadır. Dünya hıyar üretiminde üçüncü sırada olan ülkemizde bu bitki, pek çok hastalık ve zararlı etmenlerin saldırısına maruz kalarak ciddi verim kayıplarının yaşandığı önemli bir bitkidir. Bu faktörlerin başında da patojen fungusların oluşturduğu hastalıklar gelmektedir (Kurt *et al.* 2002). *Fusarium* spp., *Phythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Alternaria* spp. ve *Sclerotinia* spp. cinsine dahil pek çok fungus türleri buğdaygiller ve bir çok sebze fidelerinde olduğu gibi hıyar fidelerinde de kök ve gövde çürüklüğü veya çökerten olarak da adlandırılan hastalığa veya solgunluğa sebep olmakta, daha fide dönemindeyken bitkinin ölmesine sebep olmaktadır. Hatta sağlıklı fideler dikilse bile sera ve tarla koşullarında bu patojenler hıyarda ve diğer birçok sebze türünde çok büyük boyutlarda zarara sebep olabilmektedirler (Mutlu vd 2015). Özellikle hıyarda bitkisinde *Fusarium*'un neden olduğu çok önemli hastalıklar bulunmaktadır.

Hıyar bitkisinde *F. oxysporum*'un neden olduğu iki önemli hastalık vardır. Bunlardan ilki *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*'un yol açtığı Fusarium solgunluğudur. Ülkemizde de görülen bu fungus bitkinin herhangi bir döneminde bitkiyi enfekte edebilmektedir. Toprak sıcaklığının 18-20ºC olduğu bölgelerde fide çökerten hastalığına neden olmaktadır. İkincisi ise *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*'un neden olduğu kök ve gövde çürüklüğüdür. Bu

fungus hıyar bitkisini bütün gelişme dönemlerinde etkileyebilmektedir (Vakalounakis 1996; Tok, 2010; İncekara 2011). Karaca ve Kahveci (2010), yaptıkları çalışmada bu fungusun ülkemizde bulunduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum'un* hıyar bitkisinin yanında kavun (*Cucumis melo*), karpuz (*Citrullus lanatus*) ve sünger kabağı (*Luffa aegyptiaca*) bitkilerininde hastalığa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Hıyarda görülen en önemli toprak kökenli hastalıklardan birisi olan *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum,* hıyar bitkisini bütün gelişme dönemlerinde etkileyebilmektedir. Hastalığın ilk belirtileri, yaklaşık 4-6 haftalık bitkilerin kök boğazı bölgesinde hipokotil ve kollarda açık yeşil, kahverengi çürüklük ve genel solgunluk şeklinde ortaya çıkmaktadır. Ana ve yan köklerle, kolların iletim dokularında kahverengileşme oluşur. Çürüyen dokuların üzerinde beyaz miselyum tabakası oluşturur. Hastalığın bulaştığı bitkiler sırasıyla; bodurlaşır, solar ve birkaç hafta içinde ölür. Genellikle hipokotilde kök sistemine kadar inen uzunlamasına kanser yaraları ve tek taraflı çürüklükler oluşur. Köklerde çürüklükler meydana gelir ve hipokotil lezyonları ile karşılaşılabilir (Vakalounakis 1996; Tok 2010; İncekara 2011). Toprak kaynaklı olan bu fungus hıyar bitkisini, gelişiminin her döneminde hastalandırabilmektedir. Fidelik döneminde çökertene neden olur. Çökerten hem çıkış öncesi hem de çıkış sonrası görülebilir. Özellikle serin havalarda çıkış öncesi çökerten daha yaygın olarak görülür. İleri dönemde alt yapraklarda tek taraflı sararmalar başladığı görülmektedir. Bunun nedeni o bölgedeki iletim demetinin etmen tarafından işlevsiz kılınmasıdır. Daha ileri devrede etmenin diğer iletim demetlerine de geçmesi nedeniyle sararma ve solma bitkinin her tarafında görülmektedir. Topraktaki esas inokulum kaynağı hastalıklı bitki artıklarıdır (Owen 1956; Martyn 1996; İncekara 2011).

F. oxysporum f.sp. *radicis-cucumerinum*, kendi ülkemizin de içinde bulunduğu birçok ülkede yaygın olarak görülmektedir (İncekara 2011). Bu ülkelerin bir kısmı Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Yunanistan, İsrail, Japonya, Çin, Almanya, Avustralya, ve Hollanda sayılabilir (Martyn 1996; Vakalounakis and Fragkiadakis 1999; Altın 2004). Bu patojenlerin Türkiye'deki yaygınlığı fungusların optimum çevresel istekleri farklı olduğu için, iklimsel koşullardan dolayı bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Ülkemizde çökerten, kök ve kök boğazı çürüklüğü ve solgunluk hastalıkları konusunda yapılan bir çalışmalarda; Ege bölgesinde, İç Anadolu bölgesinde Ankara yöresinde *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* tespit edilmiş , *Fusarium culmorum* , *Fusarium acuminatum* ve *Fusarium graminearum* yaygın patojenler olarak bulunmuştur (Muratçavuşoğlu ve Hancıoğlu 1995; Erdurmuş 2006).

Erzurum yöresinde yapılan sürveylerde *Fusarium oxysporum* %16,9, *F. acuminatum* %34,8, *Fusarium equiseti* %32,3, *F. tabacinum* %0,6, *Microdochium nivale* %15,0 ve *F. solani* %0.4 oranında bulunmuştur (Demirci ve Dane 2003; Erdurmuş ve Katırcıoğlu 2008).

Elazığ'da yöresinde yetiştirilen sebzelerde kök ve kökboğazı hastalıklarına *F. oxysporum, F. solani, R. solani, M. phaseolina, Verticillium dahliae, Pythium* sp., *F. culmorum, Fusarium equiseti, Phytopthora. capsici, Perenospora parasitca*'nın neden olduğu kaydedilmiştir (Kırbağ ve Parlak 1996).

Bu patojenin Türkiye'deki yaygınlığı fungusların optimum çevresel istekleri farklı olduğu için, iklimsel koşullardan dolayı bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Ülkemizde çökerten, kök ve kök boğazı çürüklüğü ve solgunluk hastalıkları konusunda yapılan çalışmalarda; Ege bölgesinde, Denizli, İzmir, Aydın, illerinde hastalık etmeni olarak *Fusarium* spp., *B. sorokiniana, Rhizoctonia cerealis* bulunmuş olup bölgenin bu etmenlerden bir veya bir kaçı ile tamamen bulaşık olduğu görülmüştür (Uçkun ve Yıldız 2004).

Tok (2010), Akdeniz Bölgesinde Adana, Antalya, Hatay ve Mersin, Güneydogu Anadolu Bölgesinde ise Diyarbakır, Adıyaman, Mardin, Batman ve Şanlıurfa illerine bağlı alanlarda 2007 ve 2008 yıllarında kavun ve hıyar yetiştiricilik dönemlerinde hastalık surveyi gerçekleştirmiştir. Örnekleme yapılan alanlardan alınan hasta bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu, kavun bitkisinden 114, hıyardan 47 *F. oxysporum* izolatı elde etmiştir. Kavundan elde edilen 114 *F. oxysporum* izolatının 89'u kavun fidelerinde hastalık belirtisi oluşturmuş ve *F. oxysporum* f.sp. *melonis* olarak tanılamıştır. Hıyar bitkilerinden elde edilen 47 *F. oxysporum* izolatının ise 40'ı hıyar fidelerinde hastalık belirtisi oluşturmuş ve bunlar *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* olarak tanılamıştır.

Biyolojik Mücadelede PGPB Bakterilerinin Kullanımı ve Hıyarda *F. oxysporum'la* Biyolojik Mücadele Çalışmaları

Tüm mikroorganizmaların sadece %2'lik bir kısmı zararlı mikroorganizmaları içerir. Geri kalan kısmı ise evren için yararlı işler başarmaktadır. Tarımda mikroorganizmalar biyolojik mücadelede ve bitki beslenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar ve/veya ürettikleri metabolitleri kullanılarak patojen mikroorganizmalara karşı gerçekleştirilen biyolojik savaşa biyolojik mücadele denir. Biyolojik mücadele; antibiyosis, besin elementleri ve yaşama yeri yönünden rekabet, hiperparazitizm ve konukçu bitkilerin sistemik dayanıklılık mekanizmalarının teşvik edilmesi olmak üzere dört temel prensibe sahiptir. Biyolojik mücadelede en çok yararlanılan mikroorganizma bakterilerdir (Kotan *et al*. 2009; Kotan 2020).

Serbest olarak yasayan, bitki gelişimini teşvik eden, biyolojik mücadele veya biyolojik gübreleme amacıyla kullanılan bakterilere "Bitki Gelisimini Tesvik Eden (Plant Growth Promoting Bacteria=PGPB) Bakteriler" adı verilmektedir. Biyolojik mücadelede PGPB'ler kullanılarak bitki besleme sorununun yanında bitki sistemik dayanıklılığının teşvik edilmesi, pek çok hastalık ve stres koşullarına karşı bitkilerin korunması önemli bir avantajdır. Bitkiler stres faktörlerine karşı aynı ya da benzer savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bitkiler stresi ya tolere eder ya da ondan kaçınırlar. Stres faktörleri metabolik ve yapısal hasarlara neden olmaktadırlar. Bu hasarlar geri dönüşümsüz ya da tersinir olabilir. Bu yüzden bitkiler sekonder metabolitlerin yanısıra başka savunma yolları geliştirmişlerdir. Bitkiler çevresel koşulların olumsuz etkilerine ve bakteri, fungus, nematod, virus, protozoa gibi patojenik organizmaların etkilerine maruz kalmaktadırlar. Bitkiler patojen saldırılarından korunabilmek için birçok savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Bu savunma esnasında patojenler toksin, hidrolitik enzim gibi kimyasal bileşikleri kullanırken bitkiler ise fiziksel bariyerlerin yanısıra sekonder metabolitler, antioksidanlar, savunma peptitleri ve antimikrobiyal özellikteki proteinler gibi birçok savunma maddesine sahiplerdir. Antioksidanların görevi hücresel hasarın engellenmesidir. Bu savunmada görevli bileşikler patojenlerin neden olacağı zararı minimum düzeye indirmektedirler. Stres koşullarında hücreleri korumak ve ROS düzeylerini kontrol altında tutabilmek için bitki dokuları ROS'u ortadan kaldıran süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz, peroksidaz gibi çeşitli enzimler ve düşük moleküler ağırlığa sahip antioksidanları (glutatyon, askorbat, tokoferoller, fenolik bileşikler vs.) içermektedirler (Blokhnina 2000).

PGPB etkinliği, başta toprak organik madde içeriği olmak üzere toprak özellikleri, bitki ve bakteri çeşidi, ele alınan bitki parametreleri ve yetiştirilme koşullarına göre değiştirmektedir (Çakmakçi *et al.* 2006). PGPB bakterilerinin oksin, giberallin, sitokinin, etilen gibi bitkisel hormon üretebildiği, simbiyotik veya asimbiyotik azotu fikse edebildiği, organik fosfatı ve diğer besin elementlerini minarelize ettiği, mineral fosfat ve demiri çözebildiği, bitki enzim aktivitesini arttırdığı (Timmusk *et al.* 1999; García de Salamone *et al.* 2001; Gutiérrez-Mañero *et al.* 2001; Sahin *et al.* 2004; Jeon *et al.* 2003; Canbolat *et al.* 2006; Çakmakçı *et al.* 2007; Karagöz *et al.* 2016a; Dadasoglu *et al.* 2017), toksik kimyasalları parçaladıkları (Karagöz *et al.* 2016b) belirtilmiştir. Ayrıca bakterilerin antibiyotik, siderofor, vitamin, enzim ve fungisit gibi bileşikler sentezleyerek veya rekabet gibi mekanizmalarla patojenlere karşı antagonistik etki gösterdiği de bilinmektedir (Karagöz 2009).

Bitki gelişimini teşvik eden bakteriler daha çok *Acinetobacter, Aereobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Artrobacter, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Beijerinckia, Burkholderia, Enterobacter, Erwinia, Flavobacterium, Micrococcus, Paenibacillus, Pseudomonas, Rhizobium, Rhodobacter, Rhodosprilum, Serratia* ve *Xanthomonas* cinslerine aittir (Dandurand *et al.* 1994; Daza *et al.* 2000; Dadaşoğlu vd 2013). 2004 yılında dünyada 104 bakteriyel biyopreparatın zararlılara karşı ticari amaçla kullanıldığı ve bunların çoğunluğunun *Bacillus* cinsi içerisinde yer aldığı (Dey *et al.* 2004), günümüzde her geçen gün artan bu sayıların gelecekte de artmaya devam edeceği beklenmektedir (Anonymous, 2020b).

Son yıllarda, dünyada olduğu gibi Türkiye'de de biyolojik mücadele ile ilgili çalışmaların sayısı her geçen gün artmakta olup (Dobbelaere *et al.* 2002); zararlıların (Ekinci *et al.* 2014), bakteriyel hastalıkların (Kotan *et al.* 1999; Huang *et al.* 2011; Knöbel *et al.* 2012; Kotan ve Çelik 2014), fungal hastalıkların (Kotan 1998; Kotan *et al.* 2009; Mancebo *et al.* 2011; Tozlu *et al.* 2018a; Tozlu *et al.* 2018b; Karagoz *et al.* 2018; Tozlu *et al.* 2019; Tekiner *et al.* 2020) ve virüs hastalıklarının (Maranho *et al.* 2014) kontrolüne yönelik pek çok biyolojik mücadele çalışması yapılmıştır. Ülkemizde en çok çalışılan PGPB türleri, *Bacillus, Paenibacillus, Pseudomonas* ve *Azospirillum* cinslerine aittir. (Çakmakçı *et al.* 2006; Sezen 2012) Bu cinsler arasında özellikle *Bacillus* ve *Pseudomonas* patojenler açısından çok iyi antagonistik özelliklere sahip olmaları yanı sıra bitki gelişimini uyarıcı etkilerinin nedeniyle de dikkat çekmektedirler (Altın ve Bora 2005). Tez çalışmasında kullandığımız *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas chlororaphis* bakterileri biyokontrol ajanı olarak biyolojik mücadele de kullanılmaktadır.

Bacillus subtilis bakterisi çubuk şekilli ve Gram-pozitif özelliktedir. Mezofilik bir yapıya sahip olan *B. subtilis* 25-35°C sıcaklık aralığında gelişir. Aerobik özelliktedir fakat yakın zamanda yapılan çalışmalarda aneorobik ortamda da büyüdükleri görülmüştür. Stres altında dayanıklı endospor üretmektedir. Yani asidik, alkali, oksidatif veya ozmotik durumlar oluştuğunda endospor üreterek kendini korumaya alır. Bu sayede zor şartlarla baş edebilecek ve uygun ortam oluştuğunda tekrar gelişimine devam edebilir (Perez 2000; Bandow 2002). *Bacillus* organizmalarının ana yaşam alanları topraktır ve bitki uygulamalarında kullanım alanı yaygındır. *B. subtilis* difficidin, mikobakilin, polimiksin, subilin gibi çok sayıda antibiyotik üretebilmektedir. Ayrıca protein, pektin ve nişasta gibi polimerleri parçalayarak karbon ve nitrojen döngülerine katkıda bulunmaktadır. *Bacillus subtilis* bakterileri kitinaz, lipaz, ksilanaz, pullulanaz amilaz, proteaz, gibi ticari öneme sahip, endüstride oldukça sık kullanılan önemli enzimler üretmektedir (Morikawa 2006; Anonymous 2018).

Şenol (2014), tarafından yapılan çalışmada petride *F. culmorum*'a karşı antifungal aktiviteleri test edilen toplam 158 izolattan 31'i antifungal etki göstermiştir. Antifungal etki gösteren bakterilerin %32'si *Bacillus megaterium,* %26'sı *B. subtilis*, %19'u ise *Bacillus pumilus*'a türlerine ait olduğu belirtilmiştir. Bu izolatların dışında antifungal sonuç verenlerin yaklaşık %7'si *Pseudomonas fluorescens*'e, %10'u *Pseudomonas putida*'ya ve %3'ü ise *Paenibacillus macerans* ve *Pantoea agglomerans*'a ait olduğu saptanmıştır. Antifungal aktiviteye sahip 31 izolata kitinaz enzimi aktivitesi testi yapılmış ve içlerinden en yüksek aktivite gösteren *B. subtilis* TV-125A ve *P. flourescens* MF-1 izolatı olduğu belirtilmiştir.

Jamil *et al.* (2007), topraktan izole ettikleri *Bacillus* türü bakterilerin antibiyotik üretimi yapıp yapmadıklarını test etmişlerdir. En yüksek antibakteriyel özelliğine sahip *B. subtilis* MH-4 için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Optimize kültür şartları için pH 8 de karbon kaynağı olarak gliserol ve nitrojen kaynağı olarak L-glutamik asiti kullanarak 96 saat inkübasyon işlemi gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak antibiyotik üretimi için optimum sıcaklığı 37°C ve optimum pH'yı 8 olarak bulmuşlardır.

Posada-Uribe *et al.* (2015) çalışmalarında ortam ve kültür koşullarını, bitki büyümesini teşvik eden rizobakter *B. subtilis*'in EACB0575 spor üretimini arttırmak için farklı istatistiksel metotlarla optimize etmişlerdir. Anahtar ortam bileşenleri Plackett–Burman (PB) tasarımı ile belirlenmiş ve iki bileşenin (Glucose, $MgSO_4.7H_2O$) optimum konsantrasyon seviyeleri optimize edilmiştir. Optimize ortam, biyoreaktör seviyesinde spor üretimi kültür şartlarının etkilerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Çalışma sonucunda pH kontrolünün önemli derecede spor üretimini etkilemediği, çalkalama ve havalandırma oranlarının spor hücre yoğunluğunu önemli derecede etkilediği bulunmuştur. Genel optimizasyon PB tasarımı ile karşılaştırıldığında, spor hücre yoğunluğunda 17.2 kat bir artış (8.78 x 10^9 CFU/mL) ve sporülasyon veriminde (%94.2) 1.9 kat artış sağladığı bulunmuştur. Çok düşük besin gereksinimi ve kısa inkübasyon süresi ile *B. subtilis*'in EA-CB0575 spor hücre yoğunlukları ve sporülasyon verimlerinin her ikisini de yüksek üretme potansiyeli göstermiştir.

Pseudomonas chlororaphis; çubuk şekilli, spor oluşturmayan bir veya birden fazla polar flagella içeren, gram negatif, aerobik hetetrof bir bakteridir (Todar, 2006). Bakterinin optimum geliştiği sıcaklık 20-28°C olan mezofilik bakterinin en iyi geliştiği pH 6,3-7,5 aralıklarının olduğu belirtilmiştir (Bodelier and Laanbroek 1997). *P. chlororaphis* bakterisi pyoverdin veya floresant içermesidir. Floresant, bakteri bitkiye bağlandığında bulunduğu bitkinin bulunduğu toprak demir açısından kısıtlı ise sarı-yeşil pigmentt olarak ortaya çıkmaktadır. Tarımda *P. chlororaphis* hıyar, biber, domates ve diğer birçok tarımsal üründe kök çürüklüğüne neden olan fungal patojenlere karşı antibiyotik ürettiği bilinmektedir. (Tombolini *et al.* 1999; Meyer *et al.*

2002). Fenazin-1-karboksilamid, 2-hidroksifenazin, pirrolnitrin, hidrojen siyanür, kitinazlar ve proteazlar dahil olmak üzere çeşitli antimikrobiyal ikincil metabolitler üretebilirler (Bloomberg *et al.* 2001; Selin *et al.* 2010; Deng *et al.* 2015). *P. chlororaphis* suşlarının, biyo gübreleme, fitostimülasyon ve biyo-kontrol için aşılayıcılar olarak kullanılabilen bitki büyümesini destekleyen etkili bakteriler olduğu bildirilmiştir (Bloomberg *et al.* 2001) Ayrıca, ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA)'ya göre *P. chlororaphis*'in insanlar, yaban hayatı veya çevre için patojenik olmadığı düşünülmektedir. Antimikrobiyal aktiviteler ve hayvanlar ve çevreler için düşük risk, bakteriyi *P. chlororaphis*'i tarımda yüksek potansiyele sahip biyolojik kontrol ajanları haline getirmiştir (Tombolini *et al.* 1999; Selin *et al.* 2010; Deng *et al.* 2015).

Anonymous (2016b), *B. subtilis* (WT 168) ve *P. fluorescens* (SBW25) bakterileri için optimum gelişme koşulları değerlendirilmiştir. Araştırmada *B. subtilis* (WT 168) bakterisinin 6,5-9 pH aralığı ve 29°C, 34°C, 37°C sıcaklık değerleri, *P. fluorescens* (SBW25) 5-9 pH aralığı ve 29°C, 34°C, 37°C sıcaklık değerleri araştırılmıştır. Sonuç olarak *B. subtilis* (WT 168) bakterisinin optimum gelişme koşulları pH 8 ve 34-37°C aralığında, *P. fluorescens* (SBW25) bakterisinin optimum gelişme koşulları pH 7,5 ve 29°C sıcaklığın altında bulunmuştur.

F. oxysporum ve *F. culmorum*'un kontrolünde *B. cepacia* OSU 7 straini (Liu *et al.* 1995; Kotan vd 2002; Küçük *et al*. 2007); *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *F. culmorum* ve *Fusarium moniliforme*'nin kontrolünde *Trichoderma harzianum* (Martyn and Gordon 1996); *F oxysporum* f. sp. *melonis*'in kontrolünde *P. putida*; *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*'in kontrolünde *B. subtilis* (Kotan 1998); pamukta Verticillium songunluğunun kontrolünde fluorescent *Pseudomonas* türleri (Melan 2004) başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Park *et al.* (1988) Hıyar Fusarium solgunluğuna karşı *P. putida* ve patojen olmayan *F. oxysporum* birlikte uygulanmıştır. Yapılan denemeler sonucunda bu iki antagonistin pH 6.7 olan toprağa birlikte uygulandığında hıyar Fusarium solgunluğuna karşı etkili olduğu saptanmıştır. Ancak ayrı ayrı uygulandıklarında etkili olmamışlardır.

Liu *et al.* (1995), PGPR strainleri (*P. putida* strain 89 B-27 ve *Serratia marcescens* 90-166) ve hıyar solgunluk etmeni *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'u aynı anda hıyar köklerine uyguladıklarında iki PGPR strainin de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'a karşı sistemik dayanıklılığı uyardığını saptamışlardır. PGPR strainleri 5 haftadan daha uzun süreyle hıyar bitkilerini solgunluktan koruyabildiğini bildirmişlerdir.

Singh *et al.* (1999) yaptıkları çalışmada, iki kitinolitik bakteri suşu, *Paenibacillus* sp. 300 ve *Streptomyces* sp. 385, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* neden olduğu hıyarda Fusarium solgunluğunu önlediğini bulmuşlardır. İki suşun 1:1 veya 4:1 oranında karışımı, hastalığın ayrı ayrı kullanılan suşların her birinden belirgin bir şekilde ($P < 0.05$) daha iyi kontrolünü

sağladığını belirtmişlerdir. Birkaç formülasyon test edilmiş ve hastalığa karşı en etkili formülasyonun zeolit esaslı kitosan ile düzeltilmiş (ZAC (zeolite-based, chitosan-amended)) formülasyon olduğu bulunmuştur.

San-Lang *et al.* (2002), topraktan iki *B. subtilis* suşu izole etmişlerdir. Deniz atıklarının kitinini içeren ortamda aerobik olarak büyüyen bu suşların, kültür ortamından elde edilen ham fungusitler, patojenik mantar *Fusarium oxysporum* üzerinde antifungal aktivite göstermiştir. *B. subtilis* W113 ve *B. subtilis* W118 suşları, büyüme ortamına sırasıyla %1,75 ve %0,75 kitin eklendiğinde maksimum antifungal aktivite göstermiştir. Bu iki suş tarafından üretilen ham fungusitlerin inhibitör etkileri, pH değişimi ile önemli ölçüde etkilenmemiştir. Bu ham fungusitlerin önemli ölçüde termostabil olduğu ve inhibitör aktivitelerinin, 100ºC'de 30 dakika ısıl işleme tabi tutulduğunda dahi bir kısmının korunduğu belirtilmiştir. Ayrıca, deniz atıklarındaki kitinin kullanımı, *B. subtilis* ile kitinolitik enzim üretimi ilk kez belirlenmiştir.

Altın (2004), *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 'un önlenmesinde özellikle besin elementi rekabeti ve uyarılmış dayanıklılığa dayanan biyolojik mücadele çalışmasında, çeşit dayanıklılığını ve fungusun duyarlılık gösterdiği farklı besin kombinasyonlarının hastalığa karşı çalışmıştır. Yüz altmış bir adet floresan Pseudomonas izolatını *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'a karşı in vitro ve in vivo koşullarda antagonistik yeteneklerine göre taramıştır. Denemeler sonucunda seçtiği 5 adet izolat ile çeşit denemeleri yapmıştır. *P. putida* straini olan 24/2 nolu floresan Pseudomonas Fusarium solgunluğuna karşı uyarılmış dayanıklılık mekanizmasıyla %55.48 etki gösterdiğini bulmuştur.

Wang *et al.* (2005), *P. fluorescens* K-188 fungal fitopatojenleri (*F. oxysporum, F. solani*, *T. harzianum* ve *P. ultimum*) inhibe eden antifungal maddeler ürettiği belirlenmiştir. Antifungal maddelerin konsantrasyonunda, etanol çökeltisinin amonyum sülfat çökeltisinden daha iyi olduğu bulunmuştur. 10 dakika 100ºC'de sıcaklık uygulaması sonrasında dahi orijinal antifungal aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Mikroskobik incelemede, antifungal maddeler ilave edildiği zaman *F. oxysporum*'un hifini inceltmeye başladığı ve sporlarının çimlenmesini engellediği görülmüştür.

Abeysinghe (2006), çalışmasında Sri Lanka'daki patojen olmayan üç *F. oxysporum* izolatının hıyarda kök ve gövde çürüklüğü etmeni *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*' a karşı biyolojik kontrolünü test etmiştir. *Fusarium* izolatları ilk olarak patojenik ve antagonistik potansiyel açısından in vitro olarak kontrol edilmiştir. Sera değerlendirmelerinde patojenik olmayan *F. oxysporum* izolatları, fidelere patojenle enfekte toprağa yeniden dikilmeden hemen önce kök sistemine eklenmiştir. Bitkiler, üç hafta sonra hastalık gelişimi açısından değerlendirilmiştir. Sera saksı deneylerinin sonuçları, patojenik olmayan iki *F. oxysporum*

izolatının Fusarium kök ve gövde çürüklüğü hastalığını önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur.

Chung *et al.* (2010), ucuz kitinolitik enzimlerin üretiminde kabuklu artıkların işlenmesinin önemli bir unsur olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada antifungal kitinaz üreten bakterilerin izolasyonu için substrat olarak kullanılmak üzere, yengeç ve karidesin işlenmesi sonrasında ortaya çıkan atıkları kaynatıp ezerek kabuk tozu elde etmişlerdir. Topraktan izole edilen *B. subtilis* NPU 001 suşu, kitinaz için ana karbon kaynaklarından olan karides ve yengeç kabuğu tozunun %2'sini ihtiva eden ortamda geliştirmişlerdir. Sıralı kromotografi ile saflaştırılan kitinazın (2 mg ml-1), *F. oxysporum'un* hif uzantısını inhibe ettiği bulunmuştur. Diğer bilinen bakteriyel kitinazlar ile karşılaştırıldığında 001 NPU'nun kitinazının, kolloidal kitinin enzimatik hidrolizi ile oluşan kitotriose'nin üretimi ve mantar bitki patojenlerine karşı antifungal aktivite içermesi gibi kendine özgü özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir.

Li *et al.* (2012), çalışmalarında seralar ve tarlalarda yetiştirilen salatalık bitkilerinde yüzey sterilize edilmiş köklerden toplam 400 *Bacillus* örneği izole edilmiştir. B068150 olarak adlandırılan bir suş, seracılık deneylerinde fide aşamasında %50.68'e kadar biyolojik kontrol etkinliği ile Fusarium solgunluğunun kontrolünde yüksek bir potansiyel göstermiştir. B068150 izolatı, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testler, hücresel yağ asitleri analizi ve BİOLOG testi kullanılarak *B. subtilis* olarak tanılamışlardır. Sera denemelerinde, *B. subtilis* B068150'nin, salatalık Fusarium solgunluğunun biyolojik kontrolünde umut verici bir ajan olabileceğini ve *F. oxysporum*'un sebep olduğu salatalık verim kaybını en aza indirmeye yardımcı olabileceğini bildirmişlerdir.

Selvaraj *et al.* (2014), yaptıkları çalışmada çoklu muz tarlalarında *P. fluorescens* formülasyonunun, *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ve *Helicotylenchus multicinctus*'a karşı etkinliğini değerlendirmişlerdir. Üç saha denemesi ile sıvı *P. fluorescens* formülasyonu ile toprağın bakteriyle muamelesi, nematod populasyonu ve solgunluk vakası değerlendirilmiştir. Denemede, sıvı *P. fluorescens* formülasyonu damla sulama yöntemiyle 2,0; 3,0 ve 4.0 l ha^{-1} dozları ekimden 60, 120, 180 ve 240 gün sonra uygulanmıştır. Sonuç olarak, 4.0 l ha^{-1}'de muamele, solgunluk oranını %60 azaltmıştır. *H. multicinctus*'un toplam popülasyonunu muamele edilen alanlarda %41,3-89,0 oranında azalttığı belirtilmiştir. İşlenmiş toprakta hasat sırasında *P. fluorescens* varlığı $5,6x10^6$ cfu g^{-1} olarak bulunmuştur. Biyokontrol ajanı *P. fluorescens*'in muamelesi aynı zamanda muz üretiminde kontrole kıyasla genel verimi %36,6-46,5 oranında arttırdığı belirtilmiştir.

Altın ve Bora (2015), seçtikleri 20 adet floresan Pseudomonas izolatının in vitro denemelerde genelde siderofor etkiye dayandığı belirlenmiştir. Bu izolatlar ile in vivoda yapılan değerlendirmede ise etkinin %7,69 ile %38,4 arasında değiştiği görülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda hıyarda Fusarium solgunluğuna karşı floresan Pseudomonas izolatlarıyla biyolojik savaşın umut vaat ettiği görülmektedir.

Javid *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada *T. harzianum* T-22 izolatının *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*' a sera koşullarında salatalığın kök ve gövde hastalığın önlenmesinde etkili olduğu ve biyolojik kontrolü için başarılı bir ajan olabileceği kanısına varmışlardır.

Dünyadaki Ticari *B. subtilis* ve *Pseudomonas* sp. Kaynaklı Geliştirilen Ticari Mikrobiyal Biyopestisitler ve Mikrobiyal Kaynaklı Formülasyonlar ile İlgili Çalışmalar

Biyopestisitler en genel ifade ile organik materyaller kullanılarak bir hastalığa, zararlıya ya da yabani otlara karşı geliştirilen doğal içerikli (mikoorganizma, böcek, bitkisel materyal gibi) ürünlerdir. EPA'ya göre biyopestisitler; mikrobiyal pestisitler, biyokimyasal pestisitler, ve genetiği değiştirilmiş bitkiler olarak sınıflandırır (Hassan and Gökçe 2004). Bununla birlikte, tarımda en yaygın kullanılan biyopestisit olan mikrobiyal biyopestisitlerin üretiminde bakteri, bakteriyofaj, mantar, virüs ve nematodlar kullanılır (Thakur *et al.* 2020). Dünyada üretilen bakteriyel kaynaklı biyopestisitlerin bir kısmı aşağıdaki Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Dünyada üretilen *B. subtilis* kaynaklı ticari biyopestisitler (Koul 2011; Anonymous 2016c; Anonymous 2016d)

İçerikteki Mikroorganizma	Hedef hastalık / Zararlı	Ticari Adı	Üretici Firma / Menşei
B. subtilis	Kök çürüklüğüne neden *olan Rhizoctonia, Fusarium, Alternaria*'ya karşı etkili	Serenade	Agra Quest, Inc.
B. subtilis FZB24	Sebze ve süs bitkilerinde *Rhizoctonia, Fusarium, Alternaria, Verticillium*'a karşı etkili	Rhizo-Plus, Rhizo-Plus Konz	FZB Biotechnik, GmbH
B. subtilis GB03	*Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*	Companion Kodak	USA
B. subtilis subsp. *amyloliquefaciens* FZB24	*Fusarium* ve *Rhizoctonia* solgunluk hastalığı	FZB24 Taegro	USA
Bacillus subtilis MB1600. 9.9%	Fungus	Subtilex	Becker Underwood
Bacillus subtilis QST713, 1.34%	Fungus	Rhapsody	AgraQuest
Bacillus subtilis QST713, 1.34%	Fungus	Serenade Soil	AgraQuest
Bacillus subtilis QST713, 1.34%	Fungus	Cease	BioWorks
Bacillus subtilis QST713, 14.6%	Fungus	Serenade Max	AgraQuest
Bacillus subtilis, GB03, 2.75%	Fungus	Kodiak	Bayer
B. subtilis QST713	Bakteriyel ve fungal yaprak hastalığı	Serenade	USA
B. subtilis 101	Kök ve yaprak hastalığı	Shelter	Afrika
B. subtilis 102	Kök ve yaprak hastalığı	Artemis	Afrika
B. subtilis 246	Kök ve yaprak hastalığı	Avogreen	Afrika

Tablo 2. Dünyada üretilen *Pseudomonas* sp. kaynaklı ticari biyopestisitler (Koul 2011; Anonymous 2016c; Anonymous 2016d; Anderson and Kim 2018)

İçerikteki Mikroorganizma	Hedef hastalık / Zararlı/Etkileri	Ticari Adı	Üretici Firma / Menşei
Pseudomonas chlororaphis 63–28	Sebzelerde kök ve gövde çürüklüğü	At-Eze	ABD
P. chlororaphis MA342	*Pyrenophora teres, P. graminea, Tilletia caries, Septoria nodorum, Fusarium* spp.	Cedomon, Cerall	İsveç
P. chlororaphis TX-1	Pythium, Çimde pembe kar küfü	BioJect	ABD
P. chlororaphis O6	Mikrobiyal gübre/Hastalık direnç arttırıcı	Biohelper	Güney Kore
P. chlororaphis O6 ve *Bacillus* sp.	Sebzelerde mikrobiyal gübre	Helper Plus	Güney Kore
Pseudomonas sp. DSMZ 13134	Kök çürüklüğü	Proradix	Avrupa
Pseudomonas fluorescens. 71%	Fungus	Blightban A506	Nufarm
Pseudomonas syringae ESC-10, 29.8%	Fungus	Bio-Save	Jet Harvest
P. solanacearum	Sebzelerde bakteriyel kontrol	PSSOL Bio-Save	NPP, Korea Jet Harvest Solutions
P. agglomerans C9-1	Ateş yanıklığı	BlightBan C9-1	USA
P. agglomerans E325	Ateş yanıklığı	Bloomtime	USA

Biyolojik ürün geliştirilirken ana taşıyıcı olarak gözenekli birçok ürün kullanılmaktadır. Taşıyıcılar genel olarak toprak kaynaklı (torf, kömür, kil ve inorganik toprak), bitkisel kaynaklı (kompost, hayvan gübresi, soya küspesi, buğday kepeği, şeker fabrikası çamuru, şlempe, tarım artığı materyaller), cansız materyaller (vermikülit, perlit, kaya fosfat, kalsiyum sulfat ve alginat) ve liyofilize mikrobiyal kültürler olarak sınıflandırılabilmektedir (Bashan 1998). Dünya üzerindeki yapılan çalışmalarda PGPB bakterileri kullanılarak geliştirilen üç çeşit mikrobiyal içerikli formülasyon bulunmaktadır. Bu formülasyonlar sıvı, yarı katı ve katı formülasyonlar olarak sınıflandırılabilir. Düşük su içeriğine sahip katı formülasyonlar sıvı formlasyonlara göre hayatta kalma süreleri daha uzun ve yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmalarından dolayı pazarlamada en önemli hususlardan olan düşük maliyet ve soğutma işleminin gerekli olmaması nedeniyle oldukça avantajlıdır (Melin *et al.* 2006). Katı formülasyonların sıvılara göre tek farkı tekrardan rehidre edilmeleridir. Bunun aksine sıvı formülasyonların herzaman sulandırılmasına gerek yoktur (Malusa *et al.* 2012; Beringer *et al.* 2017; Lobo *et al.* 2019). Katı Formülasyonlar organik ve inorganik taşıyıcılara dayalı olarak granül veya toz halinde hazırlanabilmektedir

(Lee *et al.* 2016; Lobo *et al.* 2019). Her iki durumda da organik ve inorganik taşıyıcı çok önemli bir konudur.

Formülasyonda kullanılacak taşıyıcının düşük maliyetli, çevreye zararsız, kolay steril edilebilen, üretim esnası ve uygulamada kullanılabilir, kolay ulaşılabilir ve uzun süre depolanabilme özelliğine sahip olması gerekmektedir (Bashan 1998; Lobo *et al.* 2016). Seçilen taşıyıcı madde fazla sayıda hedef organizmanın gelişmesini sağlamalıdır. Uygun taşıyıcı optimum azot ve yüksek organik madde içermelidir. Taşıyıcı materyal içine karıştırılacak organizmanın; kolay erişilebilir, uzun süre depolanma ve yüksek biyolojik gübre etkinliği sağlamalıdır. Farklı killer, hayvan gübreleri, kompostlanmış bitkisel materyal ve diğer organik maddeler taşıyıcı olarak kullanılabilmektedir. Ancak özellikle gübreler patojen ve antibiyotik içermemelidir (Rivera-Cruz *et al.* 2008). Formülasyonlar için taşıyıcı olarak zenginleştirilmiş kompost kullanılabilmekte (Ahmad *et al.* 2008) ve yüksek bakteri canlılığı bakımından, özellikle talaş tabanlı taşıyıcılar etkin olmaktadır (Singh *et al.* 2008).

Mikrobiyal ürün süspansiyonları için kullanılan taşıyıcılar, bakterileri hücre ölümlerinden korurlar ve yaşam oranlarını yüksek tutarlar. Bakterilerin raf ömürleri, bakteri cinsine, taşıyıcıya ve tane büyüklüğüne göre değişim göstermektedir. *P. fluorescens* izolatının lignit, torf, vermikülit, çiftlik gübresi ve artıkları ve kaolinite esaslı formülasyonlarının sırasıyla 4, 8, 8, 8 ve 4 aylık raf ömrü olduğunu (Vidhyasekaran and Muthamilan,1995) ve bu bakterinin talk taşıyıcısı ile 12 aylık raf ömrü olduğu (Caesar and Burr 1991) belirlenmiştir. Amer ve Utkhede (2000), *B. subtilis* ve *P. putida* bakterilerinin talk ve vermikülit içinde 45 gün yeterli sayıda saklanabildiği ayrıca *B. subtilis* izolatının kitin ilaveli ve ilavesiz torf içinde 6 ay raf ömrü olduğu belirlenmiştir (Manjula and Podile, 2001). Farklı taşıyıcıların kullanılmasında farklı metod ve işlemler gerekmektedir. Örneğin çapı 0,6 μm'dan daha küçük olan doğal ve sentetik zeolit kullanılmadan önce 2 gün süre ile 1 gramı 10 ml saf su ile sulandırılmakta, vermikülit esaslı inorganik taşıyıcıda gliserol kullanılmaktadır (Sarma *et al.* 2009). Nitekim *P. flourescens* ile yapılan araştırmalarda daha küçük partiküllü taşıyıcıların, bakteriyel hücreleri daha iyi kaplamak suretiyle kurumalara karşı bakterileri daha iyi korudukları tespit edilmiştir (Dandurand *et al.* 1994). Doğal taşıyıcı talk pudrası kullanılarak çeşitli toz formülasyonlar üretilmiştir (Martinez-Alvarez *et al.* 2016).

Öte yandan, tuzak / mikrokapsülleme ile hareketsizleştirilmiş kuru PGPB sistemleri aljinat veya zeolitte başarıyla geliştirilmiştir (Campos *et al.* 2014; Berninger *et al.* 2016.). Bakterilerin biyopestisit veya biyogübre olarak kullanılabilmeleri sürecinde mikrokapsülasyon tekniği önemli bir biyoformülasyon metodudur. Mikrokapsülasyon işlemi, asidik pH'da yağ içinde süspanse olmuş azotobakterilerle jelatin fosfat polimer çiftinin karışımını içermektedir

(Charpenter *et al.* 1999). Çeşitli granüler ve toz formdaki katı formülasyonlarda taşıyıcı malzemeler karboksimetil selüloz (Martinez-Alvarez *et al.* 2016; Prasad and Babu 2017; Basheer *et al.* 2019), jelatin (Berninger *et al* 2017), arap sakızı (Berninger *et al.* 2016), maltodekstrin (Campos *et al.* 2014), laktoz ve sukroz gibi disakkaritler (Cabrefiga *et al.* 2014; Molina-Romero *et al.* 2017) ve sütten elde edilen bileşikler (Berninger *et al.* 2017) gibi yapışkan / koruyucu maddelerle birleştirilmiştir. Koruyucuların kullanımı kurutma ve saklama sırasında bakteriyel hayatta kalma oranlarını artırmanın uygun bir yoludur (Schoebitz *et al.* 2012). Bununla birlikte, koruyucu etkinliği büyük ölçüde ilgili mikrobiyal türlere ve suşlara bağlıdır, bu nedenle her suş belirli bir optimizasyon gerektirir (Morgan *et al.* 2006).

Mikrobiyal ürünlerin başarılı biyoformülasyonları geliştirilirken ulaşılması gereken özellikler içinde; yüksek rizosfer etkinliği, küme oluşturma kolaylığı, geniş etkinlik kapasitesi, diğer bakterilerle uyum, kuruma, ısı, oksitleyici ajanlar ve UV radyasyonuna tolerans başta gelmektedir. Gerek biyolojik gübre gerekse biyokontrol ajanları olarak yapılan araştırmalar bakterilerin hücre süspansiyonları şeklinde direkt olarak kullanımlarına yönelik gerçekleştirilir. Dolayısıyla bakteri hücre süspansiyonları bazı taşıyıcılarda immobilize edilerek kolay uygulama, depolama, ticarileştirme ve tarla kullanımına uygun hale getirilir. Bu safha formülasyon aşamasıdır. Formülasyon geliştirmede raf ömrü uzun, bitkiler için fitotoksik olmayan, suda çözünme kabiliyeti yüksek, olumsuz çevre koşullarında dahi etkinliğini sürdürebilen, maliyeti düşük, diğer tarım girdileriyle uyumlu, ucuz ve bulunabilir taşıyıcı kullanma gibi amaçlar hedeflenmektedir (Jeyarajan and Nakkeeran, 2000). Taşıyıcı formülasyonlardaki en önemli problemlerden biri bakteri canlılığının uzatılması için formülasyondaki nemi azaltmaktır. Tamamen kuru formülasyonlarda, bakteriler hareketsiz bir formda kaldığından çevresel streslere karşı dirençli ve gübre uygulamalarına daha uyumludur (Bashan 2014). Daha yavaş kuruyan bir formülasyonda, saklama sırasında suşun hayatta kalma şansı artmaktadır (Moënne-Loccoz *et al.* 1999).

Pesenti-Barili *et al.* (1991), *Agrobacterium radiobacter* K84 hücrelerini içeren bir formülasyon bulmak için dokuz taşıyıcı üzerinde tarama yapılmıştır. 1 g taşıyıcı için 0,15 ml hacimden az olmamak koşulu ile $4x10^9$ kob/g *A. radiobacter* K84 içeren inokülasyon için, 4°C depolama sıcaklığında *A. radiobacter* hücrelerinin kuru katı taşıyıcılar üzerinde uzun süre muhafaza edilmesinin mümkün olduğunu ve oda sıcaklığında depolama için su içeriğinin daha yüksek oranda olması gerektiğini belirtmişlerdir. Birçok malzemenin mikrobiyal taşıyıcı olarak kullanılabileceğini ve bazı durumlarda vermikülit, daha önce bazı ticari *A. Radiobacter* K84 ürünlerinde kullanılan turf veya karboksimetil selüloz ile karşılaştırıldığında daha uzun

depolama sürelerine izin verdiği belirtilmiştir. Ayrıca, vermikülit, kök kanseri önlenmesinde önemli bir biyolojik aktivite göstermektedir.

Martınez-Alvarez *et al.* (2016), mısırda *Fusarium verticillioides*'e karşı içerisinde *Bacillus cereus* B25 sporları bulunan toz formülasyon geliştirmişler ve bu toz formülasyonun, in vitro ve mısır bitkilerinde *F. verticillioides*'e karşı etkinliği ve raf ömrünü değerlendirmişlerdir. $1x10^9$ kob/g bakteri sporu içeren talk bazlı toz formülasyon, tohuma yapışma kabiliyeti, tohum çimlenme etkisi, raf ömrü *ve F. verticillioides*'e karşı antagonizmi in vitro ve bitkide değerlendirilmiştir. Canlı bakteriyel sporların tohuma yapışması 1,0 ile $1,41x10^7$ kob/g aralığında bulunmuştur. Bakteriler tohum çimlenmesine olumsuz etki göstermemiştir. Toz formülasyonu için spor canlılığı zaman içinde yavaşça azalmış ve oda sıcaklığında 360 gün saklamanın sonunda %53 spor canlılığı bulunmuştur. *Bacillus cereus* B25 sporlarının talk bazlı bir toz formülasyonunun, *F. verticillioides*'in neden olduğu mısır kulağı ve kök çürüklerinin biyo-kontrolü için yeterli olabileceğini göstermektedir.

Anith *et al.* (2016), çalışmalarında hindistan cevizi suyu bazlı *P. fluorescens* AMB-8 bakterisi içeren bir sıvı formülasyonda, Nutrient Broth (NB) ve King's Broth (KB) ile birlikte farklı koruyucular varlığında popülasyon canlılığını ve bunların biber ve domates fidelerinin büyümesi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Altı aylık depolama süresince popülasyondaki düşüş oranının, hacimce %2 PVP ve %2 gliserol eklenen hindistan cevizi suyunda daha az olduğu görülmüştür. Bakteri popülasyonun korunması, tüm sentetik ortamlara göre %2 hacimdeki gliserol eklenmiş NB ortamında çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. Formülasyonlardaki yüksek bakteri popülasyon yoğunluğu, biber ve domates fideleri üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Prasad and Babu (2017), *Azospirillum brasilense* ve *P. fluorescens* bakterilerini NH_4Cl ve King's B broth malik asit suyu içerisinde 4 gün çalkalayıcılı inkübatörede 200 rpm de hücre popülasyonu 10^{10}-10^{11} kob/ml aralığında geliştirmişlerdir. Talk, kalsiyum karbonat ve karboksi metil selüloz içeren bazlı taşıyıcıya elde ettikleri bakteri kültürlerini ayrı ayrı ve karışık kültür şeklinde inoküle edip karıştırmışlardır. Hazırlanan talk bazlı formülasyonlar, kültür odasında hava ile kurutulmuş ve aseptik olarak steril polietilen torbalarda paketlenmiştir. Bu formülasyonlar, yer fıstığı ekiminde *in vitro* çimlenme koşullarında tohum muamelesi, toprak uygulaması, fide kökü daldırma ve yaprak spreyi olarak kullanılmıştır. *A. brasilense* musluk kök dokunun büyümesini ve *P. fluorescens*'in yanal kök büyümesini arttırdığı bulunmuştur. Tek tek formülasyonlarına göre her iki bakterinin kombinasyonu sürgün büyümesi, yaprak sayısı gibi diğer büyüme parametrelerini daha çok arttırdığı belirtilmiştir.

Zhang *et al.* (2018), iki fosfat çözündürücü *B. subtilis* suşunu, biyo-gübre taşıyıcısı ve ortamda birincil besin kaynağı olan yarı katı fermantasyon için kullanılan mısır kepeği kalıntısına (MBR) inoküle edilmiştir. Su tutma kapasitesi, şişme kapasitesi, taramalı elektron mikroskobu ve raf ömrü deneyleri, öğütülmüş MBR'nin bir biyo-gübre taşıyıcı için tatmin edici özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. MBR tarafından üretilen biyo-gübre saksı denemelerinde, buğday (*Triticum aestivum L.*) ve Çin lahanasının (*Brassica rapa pekinensis*) büyümesini bitki boyuna (%18,36'ya kadar) ve köklerin uzunluğunu (ayrı ayrı %34.03'e ve %27,22'ye kadar) arttırdığı belirlenmiştir. Bu çalışma ile MBR kullanarak bir katı biyo-gübrenin tek adımda üretimini gerçekleştirmek için bir biyo-gübrenin üretimini ve depolanmasını entegre edilmiştir.

Basheer *et al.* (2019), yaptıkları çalışmada süs biberinden izole edilen *Bacillus* spp. CaB5 bakterisinin talk bazlı formülasyon içerisindeki performansı araştırılmıştır. Bunun için CaB5, steril talk, kalsiyum karbonat ve karboksimetil selüloz ile formülasyon haline getirilmiştir. Formülasyonun yaşanabilirlik analizleri 45 güne kadar mikrobiyal sayımlarla doğrulanmıştır. Hazırlanan formülasonun bitki probiyotik performası, börülce (*Vigna unguiculata*) ve bamyada (*Abelmoschus esculentus*) belirlenmiştir. Formülasyon işleminin, seçilen her iki bitkide de tohum çimlenmesinin yanı sıra bitki büyümesi üzerinde arttırıcı etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak CaB5 bazlı formülasyonun, ekonomik açıdan bitkilerin büyümesini arttırdığı ve saha uygulamasında kullanılabilirliği potansiyelinin olduğu vurgulanmıştır.

Chakraborty *et al.* (2020), pirinçte patlama hastalığının tedavisi için talk, bentonit, hurma yağı ve hindistancevizi yağı içinde Floresan Pseudomonaslar (*P. fluorescens* ve *P. putida*) kullanılarak formüle etmişlerdir. Formüle edilen ürünler, pirinç fidelerinin kök daldırma ve yaprak spreyi ve ardından saksıda *M. oryzae* ile aşılama yoluyla değerlendirilmiştir. Tüm büyüme parametreleri, verim parametreleri, patlama veya pirincin sıklığı ve şiddeti, pirincin her büyüme aşamasında önemli ölçüde etkilendi. Verime katkıda bulunan parametreler, formülasyon uygulanmamış kontrole kıyasla en yüksek fayda maliyet oranını vererek önemli ölçüde arttırmıştır. *P. fluorescens* (BdPf-8), patlama veya pirincin kontrol edilmesi için ticari üretim için potansiyel bir aday olabileceği düşünülmektedir. Formüle edilen ürünlerde ümit verici raf ömrü sonuçlar olduğu belirtilmiştir. 8. ay sonunda bakteri miktarı 10^5-10^7 kob/ml olarak bulunmuştur.

MATERYAL ve METOD

Materyal

Çalışmada kullanılan patojen fungus

Çalışmada kullanılan *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* ET 46 fungusu Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Kültür Koleksiyonunda Doç. Dr. Elif TOZLU tarafından muhafaze edilmektedir.

Çalışmada kullanılan biyoajan bakteriler

Bu çalışma kapsamında kullanılarak katı taşıyıcılı biyoformülasyon haline getirilmesi düşünülen hem bitki gelişiminde etkili hem de Fusarium kök çürüklüğünü önleyen 4 bakteri izolatı (*Pseudomonas* spp. MF-1, *Bacillus* spp. TV-6F, *Bacillus* spp. TV-17C, *Pseudomonas* spp. C-37A) 1995 yılından başlayarak bugüne kadar yapılan çok sayıda araştırma sonucunda ülkemizdeki çeşitli kültür ve yabani bitkilerin toprak üstü aksamı veya kök rizosferinden izole edilmiş biyolojik mücadele ve bitki büyüme ajanı özelliğine sahip 7 bine yakın bakteri içerisinden seçilmiştir (Kotan vd 1999; Kotan, 2002; Kotan ve Sahin 2002; Kotan vd 2004; Kotan and Sahin 2006; Şenol 2014; Senol vd 2014). Bu bakteri izolatları moleküler sistemlerden yağ asidi methil esterlerini esas alan MIS ve BIOLOG sistemi kullanılarak tanılanmış ve Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde Mikroorganizma Kültür Koleksiyonunda Prof. Dr. Recep KOTAN tarafından muhafaza edilmektedirler.

Araştırma yerinin tanımı ve çalışmada kullanılan hıyar çeşidi

Saksı çalışmaları Atatürk Üniversitesi Bitkisel Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Araştırmada Poltar-Beith Alpha MR hıyar tohumu kullanılmıştır. Bu çeşidin verimi oldukça yüksek ve üreticiler tarafından tercih edilir, bunun yanı sıra kök hastalıklarına karşı duyarlı bir çeşit olduğu belirtilmiştir.

Çalışmada kullanılan yetiştirme ortamı

Çalışma kapsamında yer alan sera çalışmalarında; yetiştirme ortamı olarak 2:1:1 oranında elenmiş toprak, kum ve torf karışımları (Şekil 3) ile 3,5 litre hacimli 3 numara saksılar kullanılmıştır.



Şekil 3. Denemede kullanılan yetiştirme ortamının karıştırılmadan önceki görüntüsü

Çalışmada kullanılan yetiştirme ortamına herhangi bir uygulama yapılmamış durumdaki besin elementi değerleri Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Yetiştirme ortamı besin elementi değerleri

Besin Elementleri	Değerler
Toplam N (%)	0,05
P (%)	4,88
K (%)	244,06
Ca (%)	1939,11
Mg (%)	107,69
Na (ppm)	23,27
Zn (ppm)	0,24
Fe (ppm)	5,33
Mn (ppm)	0,26

Çalışmada kullanılan besi ortamları

NA (Nutrient Agar): 23 gr Nutrient Agar (Merck) 1 L dH_2O içinde çözülerek pH 7,0'a ayarlanmış, 121°C'de 15 dk steril edilmiş ve 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Lelliot and Stead 1987).

NB (Nutrient Broth): Hassas terazide 8 g nutrient broth besiyeri tartılarak (Merck) 1 L dH_2O içerisine ilave edilmişve hazırlanan besi yeri otoklavda 121ºC'de 15 dk steril edildikten sonra soğumaya bırakılmıştır (Lelliot and Stead 1987).

Patates Dekstroz (PDA) Agar: Hassas terazide 40 g PDA (Difco) tartılarak 1 L dH2O içinde çözülmüş ardından 121ºC'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir. Steril edilen besi yeri 45ºC'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Burgess *et al.* 1994). Patojen fungus izolatının geliştirilmesinde ve bakterilerin antifungal özelliklerinin test edildiği petri çalışmalarında kullanılmıştır.

TSA (Triyptic Soy Agar): 40 gr Triyptic Soy Agar (Difco) 1 L dH_2O içinde çözülerek pH 7,0'a ayarlanmış, 121°C'de 15 dk steril edilmiş ve 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Lelliot and Stead 1987).

TSB (Triyptic Soy Broth): Hassas terazide 8 g nutrient broth besiyeri tartılarak (Difco) 1 L dH_2O içerisine ilave edilmiş ve hazırlanan besi yeri otoklavda 121ºC'de 15 dk steril edildikten sonra soğumaya bırakılmıştır (Lelliot and Stead 1987). Bu besiyeri genel besi yeri olup bakterilerin geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

DSM (Difco sporülasyon ortamı)

500 ml'lik erlen içerisine 100 ml Difco sporülasyon ortamı (DSM; 5 g pepton, 3 g yeast extract, 1 g KCL, 0,12 g $MgSO_47H_2O$) hazırlanmış ve 121ºC'de 1,5 psi basınçta 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanan DSM içerisine; 1M $Ca(NO_3)_2$, 10 mM $MnCl_2.4H_2O$ ve 1mM $FeSO_4$ hazırlanmış, her biri ayrı ayrı filtre edilip otoklavlanmış ve 1'er ml eklenmiştir. Önceden 1 x 10^8 kob/ml olarakayarlanan bakteri kültürleri DSM ortamına 10^6 kob/ml olacak şekilde eklenmiştir. 30ºC'de 200 rpm çalkalayıcılı inkübatörde 96 saat inkübasyona bırakılmıştır (Martınez-Alvarez *et al.* 2016).

BSM (Bacillus sporülasyon ortamı)

500 ml'lik erlen içerisine 100 ml *Bacillus* sporülasyon ortamı (BSM; 0.104 g Glikoz, 0,3 g pepton, 0.5 g yeast extract, 0.6 g KH_2PO_4, 0.059 g $MgSO_47H_2O$, 0.001 g NaCl) hazırlanmış ve 121ºC'de 1.5 psi basınçta 15 dakika sterilize edilmiştir. Stok Tuz Solüsyonu (STS) için; 1 litrelik erlene, 0.1 M $FeSO_4.7H_2O$'dan 1.136 ml, 0.1 M $ZnSO_4.7H_2O$'dan 300 µl, 0,1 M $CaCL_2$'den 9.9 ml, 0.1 M $MnCL_2$'den 30 ml ilave edilmiş ve saf suyla bir litreye tamamlanmıştır. STS çözeltisi önce filtre edilmiş ardından 121ºC'de 1.5 psi basınçta 15 dakika sterilize edilmiştir. 250 mL'lik steril erlene steril kabin içerisinde 40 mL BSM besiyeri aktarılmıştır (Posada-Uribe, 2015). İçerisine hazırlanıp steril edilmiş STS çözeltisi ve Önceden 1 x 10^8 kob/ml olarak ayarlanan bakteri kültürleri konsantrasyonu 1 x 10^6 kob/ml olacak şekilde BSM ortamına eklenmiştir. 30ºC'de 200 rpm çalkalayıcılı inkübatörde 96 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Stok Besi Yeri: 0,65 g NB karışımına 36 ml gliserol eklendikten sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanıp, otoklavda steril edildikten sonra aseptik şartlarda 2 ml'lik eppendorf tüplerine, herbir çözeltiden 0,6 ml olacak şekilde toplamda 1,2 ml koyulmuştur. Bu stok besi yeri bakterilerden stok kültür hazırlarken kullanılmıştır.

Enzim aktiviteleri ölçümünde kullanılan çözeltiler

Fitaz enzimi aktivitesi için kullanılan çözeltiler

Substratın hazırlanışı

100 mL 0,1 M asetat tamponu (pH 5,5) içerisine 2 mM Na-fitat ilave edilerek hazırlanmıştır (Raghavendra ve Halami 2009).

0,1 M Sodyum asetat tamponu: 0,82 g sodyum asetat 100 mL distile suda çözündükten sonra HCl ile pH 5,5'e ayarlanmıştır

2 mM Na-fitat çözeltisi: 0,132 g Na-fitat, Sodyum asetat tamponu üzerine eklenmiş ve 100 mL'ye ayarlanmıştır.

Reaksiyonu durdurucu çözeltinin hazırlanışı

Reaksiyonu durdurmak için %10'luk TCA (Trikloroasetik asit) kullanılmıştır. Distile suda 10 g TCA çözülerek 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Raghavendra and Halami 2009).

Renklendirme çözeltisinin hazırlanışı

Çözelti A: 93,7 mL distile su içerisine 5,73 mL sülfirik asit (%96' lık) ilave edilerek %5,5 (v/v) sülfirik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

Çözelti B: 2,5 g amonyum molibdat, uygun oranda çözelti A' da çözünüp ve son hacim çözelti A ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Çözelti C: 2,5 g demir sülfat, uygun oranda distile suda çözünüp son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve içerisine 1-2 damla sülfirik asit ilave edilmiştir.

Renklendirme çözeltisi: Dört hacim çözelti B, bir hacim çözelti C ile karıştırılarak renklendirme çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti uzun süre bekletilmemelidir (Choi *et al.* 2001; De Angelis *et al.* 2003).

Kitinaz enzimi aktivitesi için kullanılan çözeltiler

Substratın hazırlanışı

Substrat 0,02 M Sodyum sitrat çözeltisine %0,05'lik kitin ilave edilerek hazırlanmıştır. Çözelti içerisinde yer alan 0,02 M Sodyum sitrat tamponu ise; 5,88 g Sodyum sitrat tartılıp, distile su ile 100 mL'ye tamamlandıktan sonra pH 6,0'a ayarlanarak hazırlanmıştır.

Renklendirme çözeltisinin hazırlanışı

0,01 M DNSA çözeltisi için 3,5-dinitrosalisilik asit 100 ml saf su içerisinde 0,22 g çözülerek hazırlanmıştır.

Antioksidan enzim aktiviteleri için kullanılan çözeltirler

103,5 mM KH_2PO_4, pH: 7,5 (Katalaz aktivitesi ölçüm tamponu): 3,504 g KH_2PO_4, 150 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7,5'e ayarlanmış ve hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.

40 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümü için substrat çözeltisi): 860 µl %35'lik H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

0,1 M NaH2PO4, pH: 5.5 (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3,9 gr Na_2HPO_4 alınarak 200 ml saf suda çözülmüş ve pH: 5,5'e ayarlanmıştır. Son hacmi saf suyla 250 ml'ye tamamlanmıştır.

5 mM guaiakol + 5mM H_2O_2 (Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 138 µl quaiakol ve 38 µl H2O2 (d=1,13 g/mol) alınmış ve 250 ml 0,1 M fosfat tamponu (0,1 M NaH_2PO_4, pH: 5,5) içinde çözülerek hazırlanmıştır.

50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,8) (SOD için tampon çözelti): 2,041 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, pH: 7,8'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 300 ml'ye tamamlanmıştır.

13 mM Methionine çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0,581 g Methionine alınmış ve 300 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.

75 µM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0,0183 gNBT alınmış, 300 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.

0,1 mM EDTA (SOD reaksiyon karışımı için): 0,0111 g EDTA alınmış, 300 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.

2 µM riboflavin (SOD aktivitesi için 2. Çözelti): 0,005 g riboflavin, 15 ml saf suda çözülmüş, 3 ml'lik reaksiyon karışımının 2 µM riboflavin içermesi için 60 µl riboflavin alınmıştır.

0,2 M KH_2PO_4 (pH: 7) (Polifenoloksidaz aktivitesi için tampon çözelti): 2,72 g KH_2PO_4 tartılıp 75 ml saf suda çözüldü, pH: 7'ye ayarlandıktan sonra 100 ml' ye saf su ile tamamlanıp 0,55 gr katekol eklenerek çözülmüştür.

Metod

ET 46 fungusunun patojenite testi

Patojen fungusun belirlenmesi için ön çalışma olarak patojenite testi yapılmıştır. Yetiştirilen hıyar fideleri kullanılarak gövdelerinde bitkiye zarar vermeyecek kadar steril şartlarda yarıklar açılıp petride geliştirilmiş çeşitli *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* fungusularından 6 mm çapında diskler alınarak yarıklara koyulumuş ve parafilmle kapatılarak bitki gelişimleri 14 gün boyunca gözlemlenmiştir. Oluşturulan hastalık skalası Şekil 4'de oluştrulan hastalık skalasına göre değerlendirilmiştir. Hastalık değerlendirmesi 0-5 skalasına göre yapılmıştır (Liu *et al.* 1995). (Skala: 0: Bitkilerde hiçbir solgunluk belirtisi yok; 1: Bitkilerde %25'den daha az simptomlu yapraklar mevcut; 2: Bitkilerde %25-50 arasında simptomlu yapraklar mevcut; 3: Bitkilerde %51-75 arasında simptomlu yapraklar mevcut; 4: Bitkilerde %76-100 arasında simptomlu yapraklar mevcut ve 5: Bitkiler tamamen ölmüş).



Şekil 4. Hastalık skalası

Petride antifungal deneme

Taşıyıcılarda kullanılacak bakteriler petride 48 saat geliştirildikten sonra steril swap ile alınarak, ET 46'ya karşı antifungal özelliklerinin belirlenmesi için, Potato Dextrose Agar (PDA-Oxoid) ve Nutrient Agar (NA) besi yerlerini içeren Petrilerde uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Patojen fungusun PDA da gelişen kültüründen alınan 6 mm çapındaki diskler PDA ve NA besi ortamı içeren petrilerin tam ortasına yerleştirilmiştir. Ortasına patojen inoküle edilen bu petrilerin etrafına ise bakteriler eklenmiştir. Kültürler parafilmle kaplanarak 24ºC'de, 15 saat aydınlık ve 9 saat karanlık şartlarda, 7 gün geliştirilmiştir. Kontrol uygulamasında ise sadece fungal disk koyulmuştur. Kontrol uygulamasında gelişen fungal diskin tüm petri yüzeyini kapladığı gün değerlendirmeler yapılmış ve patojen fungusun gelişen koloni çapı mm olarak ölçülmüştür.

Her uygulama 3 kez tekrar edilmiştir. Besiyerinde fungal diskin büyüme çapı (FDBÇ) ve Yüzde engelleme oranı (YEO) hesaplanmıştır (Kotan *et al.* 2009). Yüzde engelleme oranı (YEO) aşağıdaki formülden bulunmuştur.

YEO = (R1-R2/R1) x 100

YEO : Biyoajan bakterilerin fungal diskin büyümesine engelleme oranı (%)

R1 : Kontroldeki patojen fungusun büyüme çapı (mm)

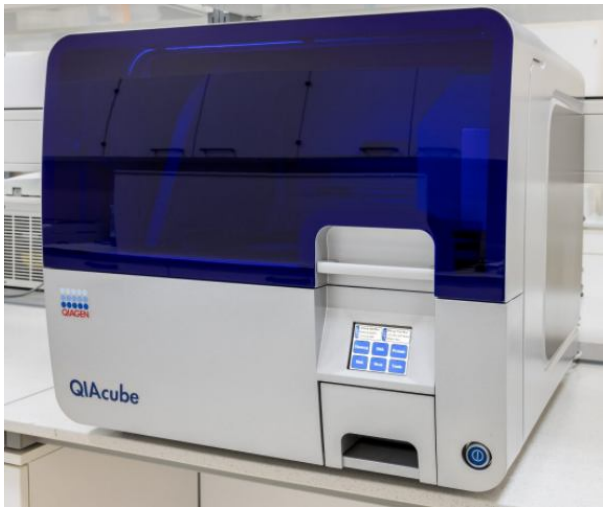
R2 : Biyoajan uygulamasındaki patojen fungusun büyüme çapı (mm)

ET 46 Fungusunun Kabakgillerde Patojenitesinin Test Edilmesi

Üçer adet hıyar, kabak, karpuz fidelerine gövdelerinde bitkiye zarar vermeyecek şekilde steril şartlarda yarıklar açılıp petride geliştirilmiş *Fusarium oxsporum* ET-46 fungusundan 6 mm çapında diskler alınarak bu yarıklara koyulumuş ve parafilmle kapatılarak bitki gelişimleri 7 gün boyunca gözlemlenmiştir.

Bakterilerde DNA izolasyonu

Öncelikle -80ºC'de saklanan bakteriler NA (Nutrient Agar) bulunan katı besiyerine dört fazlı olarak ekilmiştir. Mikroorganizmalar 24-48 saat geliştikten sonra saflık kontrolü yapılıp izolasyon aşamasına geçilmiştir. DNA izolasyonu laboratuvarda bulunan Qiacube DNA-RNA izolasyon robotunda (Şekil 5), QIAamp DNA Mini Kit (cat. No.51326) kullanılarak yapılmıştır. Bakteri kültüründen 1 loop kültür alınarak 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmış ve üzerine 200 µl lysozim içeren Tris-HCl çözeltisi koyulmuştur. 37ºC'de 60 dakika inkübe edilmiş ve 1200 rpm de santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemimden sonra üst faz dökülmüş ve cihaza yerleştirilmiştir. Cihaz sonrası elde edilen genomik DNA'lar 4ºC de kaldırılarak muhafaza edilerek ve PCR işlemine geçilmiştir.



Şekil 5. Qiacube DNA- RNA izolasyon robotu (Anonim 2020c)

PCR İşlemi

16S rDNAbölgesi 27F (forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') ve 1492R (reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3') primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır.

Reaksiyonun hazırlanması: PCR işlemi yapılacak her bir örnek için 30 µl'lik reaksiyon hazırlanmıştır. Bir örnek için; 3 µl 10 x PCR tamponu, 0,6 µl dNTPs, 1 µl 50 µM primer 27F, 1 µl 50 µM primer 1492R, 1,2 µl DMSO, 0,3 µl 5 unit/µl *Taq* DNA polimeraz ($MgCl_2$ içeren) ve 21,9 µl steril saf su ile 29 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmış ve karışıma son olarak 1 µl kalıp DNA eklenerek son hacim 30 µl' ye tamamlanmıştır.

PCR programı: Hazırlanan örnekler öncelikle 95ºC'de 2 dakika denetürasyon, bu işlemi takiben 40 döngü olacak şekilde 94ºC'de 1 dakika denatürasyon, 56ºC'de 1 dakika bağlanma ve 72ºC'de 2 dakika uzama basamakları ve son olarak 72ºC'de 5 dakika uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termal döngü cihazına yerleştirilmiştir. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapılmış ve elde edilen DNA'ların saflığı nanodrop cihazı kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boylarında kontrol edilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi: 0,6 gr agaroz ve 50 ml 1XTAE tamponu ilave edilmiş, karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatılmıştır. 50ºC'ye kadar soğutulan agaroz jele 2 µl GelRed® Nucleic Acid Gel Stain eklenerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine dökülmüştür.. 15-20 dakika beklenerek jelin donması sağlanmıştır. Donan jelden taraklar çok dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve 1XTAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. Jelde bulunan en soldaki kuyucuğa, DNA markırından 7 µl yüklenmiştir. Her bir örnek için 2 µl 6X yükleme tamponu, 7 µl PCR ürünü karıştırılarak diğer kuyucuklara sırasıyla yüklenmiştir. Elektroforez jel düzeneği 80 volta ayarlanmış ve örnekler 75 dakika yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra jel, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenmiştir.

DNA dizi analizi

16S rDNA PCR ürünleri Biogen firmasınında sekans edilmiştir.

Dizi analizi sonuçları BioEdit programı ile analiz edilip, FASTA formatına çevrilmiştir. Primerler bulunup öncesindeki kısımlar çıkarılmış ve daha sonra aradaki kısım kontrol edilerek düzenlenmiştir.

Bütünleştirilip kontrol edilen dizi analizi http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome üzerinden blastlanmışve sonuçlar kaydedilmiştir.

Bakterilerde fitaz ve kitinaz aktivitesinin ölçülmesi

Fitaz enzimi aktivitesinin ölçülmesi

Fitaz enzimi aktivitesi ölçümü için öncelikle 100 µL enzim çözeltisiyle 250 µL substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda koyularak reaksiyonun gerçekleştirilmesi sağlanmıştır. Su banyosundan çıkarılan tüplere reaksiyonu durdurmak için 500 µL %10'luk TCA eklenmiştir. Daha sonra 500 µL renklendirme çözeltisi eklenip 15 dakika inkübe edilmiş ve 5 dakika 4000 rpm'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj işleminden sonra kör (enzim hariç diğer maddelerin bulunduğu) kullanılarak örnekler 700 nm'de spektrofotometrede (UV-VIS T80 Spektrofotometre) ölçülm yapılmıştır (Sarıbuğa 2013).

Kitinaz enzim aktivitesinin ölçülmesi

Kitinaz enzim aktivitesi için;

1. 500 µL enzim çözeltisi ile 500 µL substrat karıştırıldıktan sonra 30 dakika 50ºC'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde reaksiyona başlatılmıştır.
2. Su banyosundan tüpler çıkarılıp 750 µL renklendirme çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika 95ºC'ye ayarlı su banyosunda bekletilip reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır.
3. Örnekler kör kullanılarak (500 µL substrat +750 µL renklendirme çözeltisi + 500 µL saf su) 540 nm'de spektrofotometre cihazında ölçülmüştür (Şenol 2014).

Amonyum Sülfat ((NH4)2SO4) çöktürmesi ve diyaliz

Nutrient Agarda gelişen bakteriler, hazırlanmış olan Nutrient Broth (Oxoid) besiyerine inoküle edilerek bakterilerin sıvı kültür ortamına aktarılmıştır. 28ºC'de 48 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılıp daha sonra da +4ºC'de 48 saat tutulmuştur. 9000 rpm'de +4ºC'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant (üst faz) ve çökelti ayrılmıştır. Santrifüjleme sonrası çökelti ayrılıp süpernatant kısmı ile işleme devam edilmiştir. Enzimin çöktürüldüğü amonyum sülfat doygunluk aralığı için gerekli olan amonyum sülfat miktarı aşağıda verilen formül ile hesaplanarak bulunmuştur. Kitinaz ve fitaz enzimi için tüm amonyum sülfat doygunluk aralığında çökelek ve süpernatantta enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzim aktivitelerinin yüksek olduğu aralık kitinaz ve fitaz enzimlerinin amonyum sülfat doygunluk aralığı olarak kabul edilmiştir.

$G\ (NH_4)_2SO_4 = 1.77 \times V \times (S2 - S1) / (3.54 - S2)$

$G\ (NH_4)_2SO_4$: Eklenmesi gereken katı amonyum sülfat tuzunun gram miktarı

V : Enzim çözeltisinin (süpernatant) hacmi

S1 : Başlangıçtaki amonyum sülfat doygunluğu (1' in kesri olarak)

S2 : İstenen amonyum sülfat doygunluğu (1' in kesri olarak)

%0-20 aralığı için, öncelikle yukardaki formülden gerekli olan amonyum sülfat miktarı hesaplanıp tartılmış ve +4ºC'de manyetik karıştırıcı üzerinde enzim çözeltisine yavaş yavaş ilave edilerek karışması sağlanacaktır. Ardından karışım +4ºC'de 10 dakika 9000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen çökelek, 0,1 M Tris (pH 7,0) tamponunda çözülmüş ve aktivite analizlerinde kullanılmak üzere +4ºC'de saklanmıştır.

Elde edilen süpernatant ile %20-40 aralığı için gerekli olan amonyum sülfat hesaplanıp tartılarak yavaş yavaş ilave edilmiştir. Karışım +4ºC'de 10 dakika 9000 rpm'de santrifüj edilip yine çökelek 0.1 M Tris (pH 7,0) tamponunda çözülüp saklanmıştır. Aynı işlemler %40-60 ve %60-80 aralığı için de yapılamıştır. Son çöktürme işleminin ardından elde edilen süpernatantta ve çökeleklere de aktivite tayini yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra elde edilen yüksek aktivite gösteren çökelekler ve süpernatantlar diyaliz membranına doldurularak +4ºC' de kitinaz enzimi için; pH'sı 6,0 ve molaritesi 0,05 olan sodyum sitrat tamponuna karşı, fitaz enzimi için; pH'sı 5,5 ve molaritesi 0,05 olan sodyum asetat tamponuna karşı 3 saat diyaliz işlemine tabi tutulmuştur.

Amonyum sülfat çöktürmesi çok uzun zamandır birçok araştırmacı tarafından kullanılan bir kısmi saflaştırma metodudur. Bu metot sayesinde numune içerisindeki birçok safsızlıklar uzaklaştırılır ve proteinler konsatrasyonu daha derişik halde elde edilir. Ortamda bulunan amonyum sülfat ve enzim aktivitesini etkileyen diğer iyonların uzaklaştırılması açısından diyaliz işleminin yapılması çok önemlidir (Çiftçi vd 2004).

Canlı bakteri sayılarının hesaplanması

Öncelikle NA'dan petri kaplarına besiyerleri hazırlanmış ve petriler kapak aşağı gelecek şekilde 26°C'de 1 gün inkübasyona bırakılarak kurutulmuştur. Yeteri kadar 15 ml'lik cam tüplere 9'ar ml saf su konularak otoklav edilmiştir. Her bir bakteri için 10 adet tüp deney tüplüğüne konularak 1'den 10'a kadar numaralandırılmıştır. Sayım yapılacak bakteri kültüründen otomatik pipetle alınan 1 ml/gr örnek 1 nolu tüpe aktarılmıştır. Bu tüp iyice karıştırılmış ve tekrar pipetle alınan 1 ml örnek 2 nolu tüpe aktarılmıştır. Bu işleme 10 nolu tüpe kadar devam edilmiş ve her bir dilisyondan ayrı ayrı 100 µl örnek alınarak NA içeren petrilere aktarılmıştır. Steril cam baget yardımı ile besiyeri üzerine iyice yayılmış ve her bir bakteriye ait her bir dilisyondan 3 petriye ekim yapılmıştır. Kültürler 27°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve tek tek kolonilerin sayılabildiği en uygun dilisyondan sayım yapılmıştır. Burada sayım yapılacak petrilerde ortalama olarak en az 30-40 en çok 200-250

koloni olmasına dikkat edilmiştir. Bakteri sayımları üç tekrarlı yapılıp ortalaması alınarak belirlenmiştir. Sayımın yapıldığı dilisyon katsayısı ile çarpılarak toplam sayı (koloni oluşturan birim: kob) bulunmuştur.

Bakteri gelişimi için optimum ortamın belirlenmesi

Biyoformülasyonda kullanılacak saf bakteriler dondurucudan çıkarılıp NA besi ortamı içeren petrilere ekilerek 27°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen taze kültürlerde saflık kontrolü yapıldıktan sonra her bir bakterinin saf kolonisine öze ile dokundurularak alınan bakteri hücreleri 250 ml'lik Triptic Soy Broth (TSB) içeren besi ortamına aktarılmış ve üzerine bakterilerin izolat numaraları yazılmıştır. Yatay çalkalayıcılı inkübatörde 24 saat gelişen kültürlerden biyolog türbidimetre ile ölçüm yapılarak 10^8 kob\ml'ye ayarlanmış bakteri solüsyonları Nutrient Broth (NB) ve Triptic Soy Broth (TSB) içeren besi ortamına aktarılmıştır. Yatay çalkalayıcılı inkübatörde 24 saat geliştirilmiş ve gelişen kültürlerin 1 ml'sindeki koloni oluşturan bakteri (kob) sayıları hesaplanmıştır.

Bakteri gelişimi için optimum pH'nın belirlenmesi

En iyi geliştikleri sıvı besi yerlerinde literatür bilgileri de kullanılarak belirlenen 7 farklı pH değerleri ile çalışılarak optimum koşullar belirlenmiştir. Yatay çalkalayıcılı inkübatörde 24 saat gelişen kültürlerden biyolog türbidimetre ile ölçüm yapılarak bakteri solüsyonları 10^8 kob/ml'ye ayarlanmıştır. Absorbansları eşitlenen kültürlerden 1'er ml alınarak, MF-1 ve C-37A için 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5 pH değerlerinde, TV-6F ve TV-17C için 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5;10 pH değerlerinde 250 ml'lik Nutrient Broth (NB) içeren besi ortamlarına aktarılmış standart inkübasyon sıcaklığı olarak belirlenen 27°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kültürlerin 1 ml'sindeki koloni oluşturan bakteri (kob) sayıları yukarda izah edildiği gibi hesaplanmıştır. Bütün bakteriler için yedi farklı pH değerlerinde koloni oluşturan bakteri sayıları kayıt edilerek, hangi pH değerinde daha hızlı üredikleri tespit edilip optimum pH değerleri her bir izolat için ayrı ayrı belirlenmiştir.

Bakteri gelişimi için optimum sıcaklık koşullarının belirlenmesi

Biyoformülasyonda kullanılacak saf bakteriler dondurucudan çıkarılarak NA besi ortamı içeren petrilere ekilerek 27°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen taze kültürlerde saflık kontrolü yapıldıktan sonra her bir bakterinin saf kolonisine öze ile dokundurularak alınan bakteri hücreleri 250 ml'lik Nutrient Broth NB içeren besi ortamına aktarılmış ve üzerine bakterilerin izolat numaraları yazılmıştır. Yatay çalkalayıcılı inkübatörde 24 saat gelişen kültürlerden biyolog türbidimetre ile ölçüm yapılarak bakteri solüsyonları 10^8 kob/ml'ye ayarlanmıştır. Absorbansları eşitlenen bakteri kültürleri her bir izolat için optimum

pH sınırlarında hazırlanan 250 ml'lik Nutrient Broth (NB) içeren besi ortamlarına 1'er ml aktarılarak, MF-1 ve C-37A için 25, 27, 29 31, 33 ºC sıcaklıklarında, TV-6F ve TV-17C için 31, 33, 35, 37, 39 ºC sıcaklıklarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kültürlerin 1 ml'sindeki koloni oluşturan bakteri (kob) sayıları hesaplanmıştır. Bütün bakteriler için beş farklı sıcaklık değerlerinde koloni oluşturan bakteri sayıları kayıt edilerek, hangi sıcaklık değerinde daha hızlı üredikleri tespit edilmiştir.

Katı taşıyıcılı formülasyon çalışmaları

Katı taşıyıcılı formülasyonda kullanılacak koruyucu maddelerin test edilmesi

Öncelikle formülasyon çalışmalarında Tablo 4'de belirtilmiş olan koruyucu maddelerin, formülasyon oluşturulmasında kullanılacak bakteri izolatlarına etkisi test edilmiştir. Test edilecek bakteri izolatları NA bulunan petri ortamlarında 1 gün 27ºC'de geliştirilmiştir. Gelişen kültürler her uygulama için 12 adet NA bulunan petri ortamının tüm yüzeyine steril swap ile yayılmıştır. Her uygulama için; 3 adet 6 mm genişliğinde yuvarlak çukur açılmış, 3 adet 6 mm steril blank disc kullanılmış ve 3'er adet de kontrol olacak şekilde toplamda 12 adet petri kullanılmıştır. Koruyucu maddeler Tablo 4'de belirtilen oranlara göre saf su ile sulandırılmış ve 121ºC'de 15 dakika otoklavda steril hale getirilmiştir. Koruyucu maddelerden sitrik asit ve tüm koruyucular (sitrik asit, potasyum sorbat, sorbik asit) kullanılarak iki farklı uygulama yapılmıştır. Hazırlanan koruyucu maddeler diske emdirilip tam ortaya yerleştirilmiş ve çukurun içine 10 µl koruyucu madde doldurulmuştur. Kontrol uygulamasında steril saf su kullanılmıştır.

Ön deneme katı taşıyıcılı formülasyon oluşturulması

Tablo 4. Ön denemede kullanılan katı taşıyıcılı formülasyonların içerikleri

Taşıyıcıda Kullanılan Maddeler	**Formülasyonlar**			
	A	**B**	**C**	**D**
Ana Taşıyıcılar				
Pomza (gr)	84	84	84	84
Besin Maddeleri (gr)	12	12	12	12
Yardımcı Maddeler	-	-	-	-
Tween 20 (ml)	3	3	3	3
Ayçiçek yağı (ml)	9.2	8.4	8.4	8.4
Polyvinylalcohol (gr)	1	1	1	1
Citric acid (gr)	0,6	0,6	0,6	0,6
Potassium sorbate (gr)	0,2	0,2	0,2	0,2
Sorbik asit (gr)	0,2	0,2	0,2	0,2
Bakteri inokulasyonu (ml)	32	40	36	36

Tablo 4'de gösterilen formülasyonları oluşturmadan önce sadece ana taşıyıcı olarak pomza kullanılarak denemeler yapılmıştır. Bu denemeler bize formülasyonların oluşturulmasında yol gösterici olmuştur.

Formülason A ve B'nin hazırlanması:

1. -80ºC'de LB ortamında bulunan MF-1 bakteri kültürü oda sıcaklığında çözüldükten sonra NA ortamı bulunan petriye üç fazlı çizim tekniği kullanılarak aktarılmış ve 27ºC'de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır.
2. İnkübason sonrası NB (Nutrient Broth) sıvı besiyerine bir öze dolusu inokülasyon yapılmış ve 1 gün 27ºC'de çalkalayıcılı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.
3. Gelişen bakteri kültürünün konsatrasyonu türbidimetrede $1x10^8$ kob/ml'ye ayarlanmıştır.
4. 84 gr pomza ve besin maddeleri (kalsiyum karbonat, magnezyum sülfat, demir sülfat) tartılmış otoklavda 121ºC'de 20 dakika steril edilmiştir. Bu taşıyıcıdan 2 adet hazırlanmıştır.
5. Steril katı taşıyıcıların birine 32 (A) diğerine 40 ml (B) konsantrasyonu ayarlanan bakteri solüsyonu ilave edilmiştir.
6. Son olarak A formülasyonuna 9,2 ml B formülasyonuna 8,4 ml ayçiçeği yağı ve 3'er ml Tween 20 ilave edilmiş tekrar iyice karıştırılarak tüm partükül yüzeylerinin yağ ile kaplanması gerçekleştirilmiştir.
7. Homojen şekilde karışan formülasyonlar 35ºC'de 2 gün kurumaya bırakılmıştır.
8. Formülasyonların 1 gr'daki koloni oluşturan bakteri (kob) sayıları yukarıda izah edildiği gibi hesaplanmıştır.

Formülason C ve D'nin hazırlanması:

1. -80ºC'de LB ortamında bulunan bakteri kültürü oda sıcaklığında çözüldükten sonra NA ortamı bulunan petriye MF-1 ve TV-17C izolatları üç fazlı çizim tekniği kullanılarak aktarılmış ve sırasıyla 27ºC ve 35ºC'de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır.
2. İnkübasyon sonrası optimum pH'ları ayarlanmış NB (Nutrient Broth) sıvı besiyerine bir öze dolusu aktarımı yapılmış ve 1 gün optimum geliştikleri sıcaklıklarda çalkalayıcılı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.
3. Gelişen bakteri kültürünün konsatrasyonu türbidimetrede $1x10^8$ kob/ml'ye ayarlanmıştır.

4. 84 gr pomza ve besin maddeleri (kalsiyum karbonat, magnezyum sülfat, demir sülfat) otoklavda 121ºC'de 20 dakika steril edilmiştir. Bu taşıyıcıdan 2 adet hazırlanmıştır.
5. Her iki taşıyıcıyada 36 ml konsantrasyonu ayarlanan bakteri solüsyonu ilave edilmiştir.
6. İki gün optimum geliştikleri sıcaklıklarda inkübasona bırakılmıştır.
7. Formülasyonlara 3'er ml Tween 20, 8,4'er ml ayçiçeği yağı ilave edilmiş tekrar iyice karıştırılarak tüm partükül yüzeylerinin yağ ile kaplanması gerçekleştirilmiştir.
8. Koruyucu maddeler (Polivinilalkol, Sitrik asit, Sorbik asit ve Potasyum sorbat) suda çözülüp 121ºC'de 15 dakika steril edilip katı formülasyona ilave edilmiş ve homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır.
9. Bakterilerin optimum geliştikleri sıcaklıklar ayarlanarak kurutma işlemine tabi tutulmuştur (MF-1 27 ºC'de, TV-17C 35 ºC'de).
10. Formülasyonlardan her 24 saate bir 1 gr örnek alınmış ve koloni oluşturan bakteri (kob) sayıları yukarıda izah edildiği gibi hesaplanmıştır.

Pseudomonas fluorescens MF-1 ve Bacillus subtilis TV-17C'nin 96 saat boyunca gelişimlerinin izlenmesi

-80ºC'de LB ortamında bulunan bakteri kültürleri oda sıcaklığında çözüldükten sonra NA ortamı bulunan petriye üç fazlı çizim tekniği kullanılarak aktarılmış ve 27ºC'de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası optimum pH'ları ayarlanmış NB sıvı besiyerine bir öze dolusu aktarımı yapılmış ve 4 gün boyunca optimum geliştikleri sıcaklıklarda çalkalayıcılı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Her 24 saate 1 ml örnek alınmış ve koloni oluşturan bakteri (kob) sayıları yukarıda izah edildiği gibi hesaplanmıştır.

Bacillus subtilis TV-6F ve Bacillus subtilis TV-17C'den endospor üretimi

Bakterilerin endospor formları aşırı sıcak, kuruma ve besin yokluğu gibi zorlu şartlara karşı dayanıklı yapılara sahiptir. Bu da formülasyonun kurutma aşaması ve sonrası için istediğimiz sonuçları alabilmemizi sağlayacağı düşünülmüştür. Bu nedenle çalışmalara endospor üretimi ile devam edilmiştir. Bu amaçla DSM ve BSM ortamları kullanılarak bakteriler geliştirilmiştir.

Difco sporülasyon ortamı ve Bacillus sporülasyon ortamında da bakteri geliştirilmesi

Önceden 1 x 10^8 kob/ml konsantrasyonu ayarlanan bakteri kültürleri DSM ve BSM ortamlarında 1 x 10^6 kob/ml konsantrasyonu olacak şekilde bakteri süspansiyonları eklenmiştir. 30ºC'de 200 rpm çalkalayıcılı inkübatörde 96 saat inkübasyona bırakılmıştır.

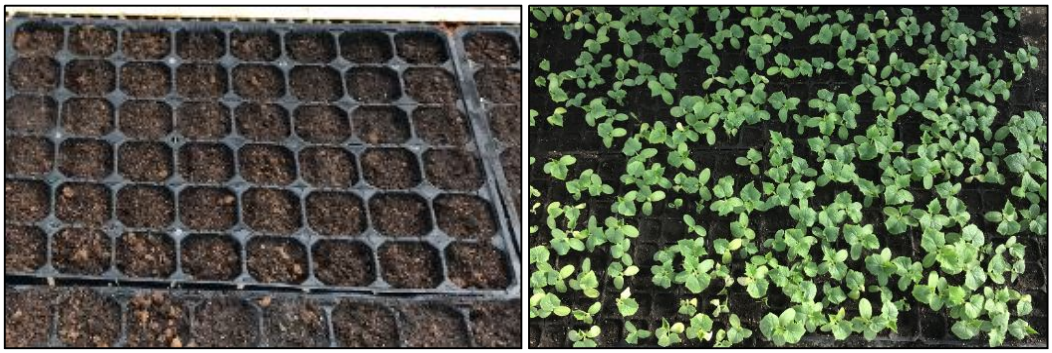
Endoporun tanılanması ve miktarının belirlenmesi

Endosporun tanılanması Schaeffer ve Fulton (1933) metoduna dayanmaktadır. %5 malachite yeşili ve %0,5 safranin kullanılarak diferansiyel boyama yapılmış ve mikroskopta incelenmiştir.

Endosporun miktarı için üretilen spor süspansiyonu 80ºC'de 10 dakika su banyosunda bekletilmiş ve hızlıca akan suyun altında oda sıcaklığına getirilmiştir. Bu işlemin sonrasında bakteri sayımı yukarda izah edildiği gibi yapılmış, 1 ml'deki endosporların miktarı belirlenmiştir.

Hıyar (*Cucumis sativus*) bitkisinin ekimi ve yetiştirlmesi

Hıyar (*Cucumis sativus*) tohumu (Poltar-Beith Alpha MR) öncelikle %5'lik sodyum hipoklorit ile 10 dakika dezenfekte edilmiştir. Sonrasında 10 kez su ile yıkanarak kurutma kağıdı üzerinde kurutulmuştur. Dezenfekte edilen tohumlar kullanılarak viyollere ekim yapılmış ve fide haline getirilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Hıyar tohumunun viyollere ekimi ve sonrası

ET- 46 fungusunun kepeğe sardırılması

İnokulum hazırlamak amacıyla daha önceden PDA üzerinde geliştirilen taze *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-cucumerinum* ET 46 ile, içerisinde steril hıyar daneleri ve buğday kepeği (1/4 oranında doldurulmuş) olan steril cam kavanozlara fungus inokule edilp karıştırılmış ve 4 hafta 23ºC sıcaklıkta konidi gelişimine bırakılmıştır. Fungusun kepeğe sardırılma işlemi ve 4 hafta sonrasına ait görüntüler Şekil 7'de sunulmuştur.



Şekil 7. ET 46 Fungusunun kepeğe sardırılma işlemi ve sonuç görüntüsü

Katı taşıyıcılı formülasyonların oluşturulması

Biyoajan bakteriler için Pesenti-Barili *et al.* (1991)'in yaptığı çalışmada *Agrobacterim radiobacter* K84'ün taşıyıcısı ile ilgili yaptığı çalışmanın sonuçları ve ayrıca literatür özeti kısmında bahsedilen tüm taşıyıcı çalışmalarının sonuçları dikkate alınarak 12 farklı katı taşıyıcılı formülasyon oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu katı formülasyonların içeriği Tablo 5'de verilmiştir.

Katı formülasyonların yapılışı:

- -80ºC'de LB ortamında bulunan bakteri kültürü oda sıcaklığında çözüldükten sonra NA ortamı bulunan petriye üç fazlı çizim tekniği kullanılarak aktarılmış ve 27ºC'de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrası NB (Nutrient Broth) sıvı besiyerine bakteri kültürlerinden bir öze dolusu aktarımı yapılmış ve 1 gün inkübasyona bırakılmıştır.
- Ana taşıyıcı maddeler 50-60 mesh çapında öğütülüp kullanıma hazırlanmıştır. Önce 12 farklı karışımın her birisinden ayrı ayrı 40'ar gramlık taşıyıcılar ve besin maddeleri (kalsiyum karbonat, magnezyum sülfat, demir sülfat) 2'şer adet cam kavanozlara koyularak toplamda 24 adet cam kavanoz olacak şekilde otoklavda 121ºC'de 40 dakika süre ile steril edilmiştir. Daha sonra bu numuneler 40ºC'ye ayarlı etüvde 24 saat süreyle bekletilerek kurutulmuştur.
- Gelişen bakteri kültürünün konsatrasyonu türbidimetrede $1x10^8$ kob/ml'ye ayarlanmıştır.
- İnkübasyon sonrası optimum pH'ları ayarlanmış NB sıvı besiyerine 1 ml bakteri kültürlerinden aktarım yapılmış ve MF-1 ve C-37A gün, TV-6F ve TV-17C 1 gün optimum geliştikleri sıcaklıklarda çalkalayıcılı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

- MF-1 ve C-37A bakterileri türbidimetrede $1x10^8$ kob/ml'ye ayarlanıp katı taşıyıcılı formülasyonlarına eşit miktarda ilave edilmiştir. Sonrasında 48 saat 28ºC'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası bakteri sayımı (kob/gr) yapılmıştır.
- TV-6F ve TV-17C bakterileri türbidimetrede $1x10^8$ kob/ml'ye ayarlanıp BSM besiyeri ortamına inoküle edilmiş ve 5 gün inkübasona bırakılmıştır. Sonrasında eşit miktarlarda geri kalan cam kavanozlara ilave edilip 50ºC'de 1 gün kurutmaya bırakılmıştır. Kurutma sonrası bakteri sayımı (kob/gr) yapılmıştır.
- İçeriğinde aynı taşıyıcı olan kavanozlar karıştırılıp tek bir kavanoza indirgenmiş ve 12 farklı katı formülasyon elde edilmiştir.
- Tween 20 ve ayçiçeği yağı karıştırılarak ilave edilmiş tekrar iyice karıştırılarak tüm partükül yüzeylerinin yağ ile kaplanması gerçekleştirilmiştir.
- Koruyucu maddeler suda çözülerek otoklavda steril edilmiş katı formülasyona homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır.
- Daha sonra bu numuneler yeniden 30ºC'ye ayarlı etüvde 24 saat süreyle bekletilerek kurutulmuştur (Nem minimum:%10) (pH:8) (Şekil 8). Kurutma sonrası bakteri sayımı (kob/gr) yapılmıştır.

MF-1 ve C-37A bakteri formunda, TV-6F ve TV-17C endospor formunda katı taşıyıcılı formülasyona uygulanmıştır. Oluşturulan katı taşıyıcılı formülasyonlar Şekil 8'de sunulmuştur.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan katı taşıyıcılı formülasyonları

Taşıyıcıda Kullanılan Maddeler	**Formülasyon No**											
	K-1	**K-2**	**K-3**	**K-4**	**K-5**	**K-6**	**K-7**	**K-8**	**K-9**	**K-10**	**K-11**	**K-12**
Ana Taşıyıcılar												
Pomza (gr)	25	35	26	42	25	35	26	42	25	35	26	42
Perlit (gr)	25	35	26	42	25	35	26	42	15	8	26	0
Bentonit (gr)	15	8	26	0	15	8	26	0	0	0	0	0
Kaolin (gr)	10	4	0	0	10	4	0	0	10	4	0	0
Zeolit (gr)	5	2	0	0	5	2	0	0	5	2	0	0
Diatomit (gr)	0	0	0	0	0	0	0	0	25	35	26	42
Besin Maddeleri (gr)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Yardımcı Maddeler												
Tween 20 (ml)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Ayçiçek yağı (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Polivinilalkol (gr)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sitrik asit (gr)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Potasyum sorbat (gr)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Bakteri Süspansionu (ml)	95	95	101	99	101	99	101	101	85	85	85	85



Şekil 8. Katı taşıyıcılı formülasyonlar

Sera çalışmaları

Formülasyonların dört dozda bitkiye uygulanması

Yukarıda izah edildiği gibi, hazırlanan katı taşıyıcılı formülasyonların sayım sonuçlarına göre 4 farklı formülasyon dozu (1/1000, 1/500, 1/330 ve 1/250) uygulanarak, saksıda hastalık şiddeti üzerine etkinliği için test edilmiştir. Saksı çalışmaları Atatürk Üniversitesi Bitkisel Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi Seralarında yürütülmüştür. Saksı denemelerinde 3 numara saksılar (3,5 L), elenmiş toprak, kum ve torf karışımları sırasıyla 2:1:1 oranında karıştırılarak bitki yetiştirme ortamı olarak kullanılmıştır. Saksılar tesadüf blokları deneme desenine göre dağıtılmış, her uygulama için 3 saksı kullanılmıştır. Pozitif kontrol ilaç uygulamasından ve negatif kontrol ise ilaç ya da bakteri uygulaması yapılmayan uygulamalardan oluşmuştur.

Yetiştirme ortamı saksılara doldurulmuştur. Yukarda izah edildiği gibi hazırlanan patojen inokulumu steril poşetlere 30'ar gram (30 gr inokulum / 3 kg yetiştirme ortamı) tartılıp bitki sayısı kadar hazırlanmış ve saksının ortasına fidenin ekileceği yerin alıtına koyulmuştur. Bir aylık fideler yukarıda izah edildiği dozda hazırlanan bakteri biyoformülasyonuna daldırılıp 20 dakika beklendikten sonra patojen inokülümü koyulan saksılara dikilmiştir (Şekil 9). İlaç uygulaması Fungusit ilacı (Signum®) kullanılarak önerilen dozda (1L'ye 1,5 gr ilaç), negatif kontrol uygulamasında ise sadece patojen bulaştırılmıştır. Bitkilere su ihtiyacına göre 2-3 günde bir eşit miktarda su verilmiştir.



Şekil 9. Formülasyonların dört dozda uygulaması aşamaları ve son halinin görüntüsü

Kontrol uygulamasındaki bitkiler tamamen öldükten sonra hastalık değerlendirilmesi yapılmıştır. Hastalık değerlendirmesi için 0-5 skalası oluşturulmuş ve bu skalaya göre yapılmıştır. Elde edilen verilerden hastalık şiddeti ve uygulamaların hastalık gelişimi üzerine etkinliği hesaplanmıştır (Liu *et al.* 1995). (Skala: 0: Bitkilerde hiçbir solgunluk belirtisi yok; 1: Bitkilerde %25'den daha az simptomlu yapraklar mevcut; 2: Bitkilerde %25-50 arasında simptomlu yapraklar mevcut; 3: Bitkilerde %51-75 arasında simptomlu yapraklar mevcut; 4: Bitkilerde %76-100 arasında simptomlu yapraklar mevcut ve 5: Bitkiler tamamen ölmüş).

Formülasyonların dört dozda bitkiye uygulanması sonucu seçilen formülasyonların dozları ile çalışamaya devam edilmiştir.

Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması

Yukarıda izah edildiği gibi hazırlanan katı taşıyıcılı formülasyonların en etkili iki dozu (K-1 4. doz, K-11 1. doz) saksıda bitki gelişimi ve hastalık şiddeti üzerine etkinliği için test edilmiştir. Saksı çalışmaları Atatürk Üniversitesi Bitkisel Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi Seralarında yürütülmüştür. Formülasyonların dört dozda bitkiye uygulanmaları ile

aynı uygulamalar yapılmıştır. Uygulamalar devam ederken ve son aşamada yapılan analizlerin zamanına göre bitki büyüme parametreleri, bitki analizlari ve toprak analizlari yapılmıştır.

Bitki ve yetiştirme ortamı analizleri

Bitki büyüme parametrelerinin belirlenmesi

Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması hastalık şiddeti değerlendime sonrası her uygulamadan rastgele alınan 3 bitki örneği üzerinde bitki büyüme parametre ölçümleri yapılmıştır.

Bitki gövde özelliklerinin belirlenmesi

Bitki boyu (cm): Saksı yüzeyinden itibaren bitkinin ulaşabildiği en yüksek noktanın cetvelle ölçülmesiyle belirlenmiştir.

Gövde çapı (mm): Her bir uygulamadaki (ve tekerrürdeki) ana bitkilerin kök boğazı kısımları kumpas (F± 0.1 mm) hassasiyetle ölçülerek mm cinsinden belirlenip ortalamaları alınmıştır.

Yaprak sayısı (adet): Her bir uygulamadaki (ve tekerrürdeki) bitkinin sahip olduğu yaprak sayısı adet olarak belirlenip, dalbaşına düşen yaprak sayısı olarak hesaplanmıştır.

Yaprak alanı (eni ve boyu) (cm^2): Çiçeklenen bitkilerde yaprak alanı Leaf Area Meter cihazı yardımıyla cm^2 olarak belirlenmiştir.

Yaprak örneklerinin yaş ve kuru ağırlığı (g): Vejetasyon süresi ortasında yapraklar maksimum büyüklüğüne ulaştığında, her uygulamada tekerrürler dikkate alınarak tesadüfi olarak seçilen yaprak örnekleri alınacak ve 0,01g duyarlılığa sahip hassas terazi kullanılarak bitki örneklerinin yaş ağırlığı hesaplanıp ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir.

Bitkilerin yaprak kısımları kese kâğıtlarına yerleştirilecek 80˚C' ye ayarlı etüvde 48 saat kurutulmuştur. Kurumasını tamamlamamış örnekler ara ara tekrar tartılmış ve ağırlıklarında bir değişim olmadığı görülene kadar kurutma işlemine devam etmiştir. Örneklerin tam olarak kuruduğu anlaşılınca, kuru ağırlıkları 0,001 grama duyarlı hassas terazi kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, alınan yaprak örneklerinde, besin elementleri tayini yapılmıştır (Karagoz 2018).

Çiçeklenme süresi (gün): Köklü çeliklerin yetiştirme ortamına dikilmesinden itibaren ilk çiçeklerin saksıdaki ortam yüzeyine çıkış yaptığı tarih esas alınarak ve arada geçen zaman hesaplanarak uygulamalara göre çiçeklenme süreleri belirlenmiştir.

Bitki kök özelliklerinin belirlenmesi

Ortalama kök uzunluğu (cm): Her bir uygulamada, üçer adet bitkinin yıkanan en uzun köklerinin, kök boğazı ile birleşme yerinin hemen altından başlamak üzere, köklerin uç kısımlarına kadar olan uzunluğu cetvelle ölçülmüş ve ortalama değer olarak ifade edilmiştir.

Ortalama kök çapı (mm): Her bir uygulamada, üçer adet bitkinin yıkanan köklerindeki en kalın kök çapları (ana kökler) kök boğazı ile birleşme yerinin 0,5 cm altından dijital kumpas yardımıyla ölçülüp, ortalamaları alınmış ve ortalama kök çapı olarak ifade edilmiştir.

Ortalama kök gövde çapı (mm): Her bir uygulamada, kökleri yıkanan üçer adet bitkinin toprak altında kalan kök boğazı kısmının (köklerinin oluştuğu bölgenin hemen üst kısmının) çapları kumpasla ölçülerek ortalamaları alınmış ve ortalama kök çapı olarak ifade edilmiştir.

Kök örneklerinin yaş ve kuru ağırlığı (g): Denemeler sonunda meyveler hasat edildikten sonra her uygulamada tekerrürler dikkate alınarak rastgele seçilen bitki kökleri yıkanıp 0,01g duyarlılığa sahip hassas terazi ile kök örneklerinin yaş ağırlığı belirlenmiş ve ortalamaları dikkate alınarak alınarak değerlendirilmiştir.

Bitkilerin kese kâğıtlarına yerleştirilen kök kısımları 80˚C'ye ayarlı etüvde 48 saat kurutulmuştur. Kurumasını tamamlamamış örnekler ara ara tekrar tartılmış ve ağırlıklarında bir değişim olmadığı görülene kadar kurutma işlemine devam etmiştir. Örneklerin tam olarak kuruduğu anlaşılınca kuru ağırlıkları 0,001 grama duyarlı hassas terazi kullanılarak belirlenmiştir.

Bitki besin elementi analizleri

Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması hastalık şiddeti değerlendime sonrası her uygulamadan rastgele alınan 3 bitki örneği üzerinde bitki büyüme parametre ölçümleri yapılmıştır.

Toplam azot tayini: bitki örneklerinin azot içeriği mikrokjheldahl yöntemiyle belirlenmiştir (Bremner 1996).

Bitkide besin elementleri (P, K, Ca, Mg, Na, Zn, Fe, Ma) tayini ICP OES spektofotometresinde (Inductively Couple Plasma spectrophotometer) (Perkin-Elmer, Optima 2100 DV, ICP/OES, Shelton, CT 06484-4794, USA) okunmak suretiyle belirlenmişir (Mertens 2005).

Bitkide antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Antioksidan enzimlerin çoğu bitkileri oksidatif zarardan korumaya yardımcı olmaktadır. Sera denemelerinde formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulaması sonrası bitkilerin en tepe noktalarından alınan taze yaprak örneklerinde çalışma yürütülmüştür. Her bir uygulamaya ait her bitkiden birer yaprak örneği alınarak karıştırılmış ve her uygulamadan 3 örnek enzim okumasına tabi tutulmuştur. Yaklaşık 1 g ağırlığında yaprak örnekleri sıvı azot içerisinde parçalandıktan sonra 10 ml 10 mM fosfat tamponu (pH 6,8) içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenat soğutmalı santrifüj kullanılarak 17.000 *x g*'de, 15 dakika 2°C'de santrifüjlenmiş ve berrak supernatant enzim kaynağı olarak alınmıştır.

Katalazın (CAT) aktivite tayini: Katalazın (CAT) aktivite tayini için Gong *et al.* (2001) tarafından önerilen metot kullanılmıştır. Bu metot, katalazın ortamdaki H_2O_2'nin oksijen ve suya dönüşümü esnasında meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için 3 ml'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM KH_2PO_4 tamponundan 1,475 ml ve 40 mM'lık H_2O_2 substrat çözeltisinden 1,5 ml konulduktan sonra, 25 µl enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okunmuş ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. 25°C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 µmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilip, sonuçlar mg protein başına düşen enzim ünitesi (EU/mg protein) olarak sunulmuştur.

Guaiakol Peroksidaz (POX) aktivite tayini: 5 mM guaicol ve 15 mM H_20_2 içeren 3 ml 0,1 M NaH_2P0_4 (pH: 7) bir spektrofotometre küvetine yerleştirilir. Enzim ekstresi 10 µl eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. (Eğer reaksiyon çok hızlı gerçekleşirse enzim miktarı azaltılmalı aksi takdirde arttırılmalıdır). Reaksiyonun absorbansı, 1 dakika ile 5 dakika boyunca 470 nm'de bir spektrofotometre üzerinde izlenmiştir. 5 dakika boyunca absorbans artışı kaydedilmiştir. Hesaplamak için, doğrusal artışın gerçekleştirildiği aralık kullanılmıştır. 1 dakika boyunca 25°C'de absorbans seviyesini 0,01 arttıran enzim miktarı 1 birim enzim olarak kabul edilip elde edilen sonuç EU/mg proteini olarak verilmiştir (Ye *et al.* 2002).

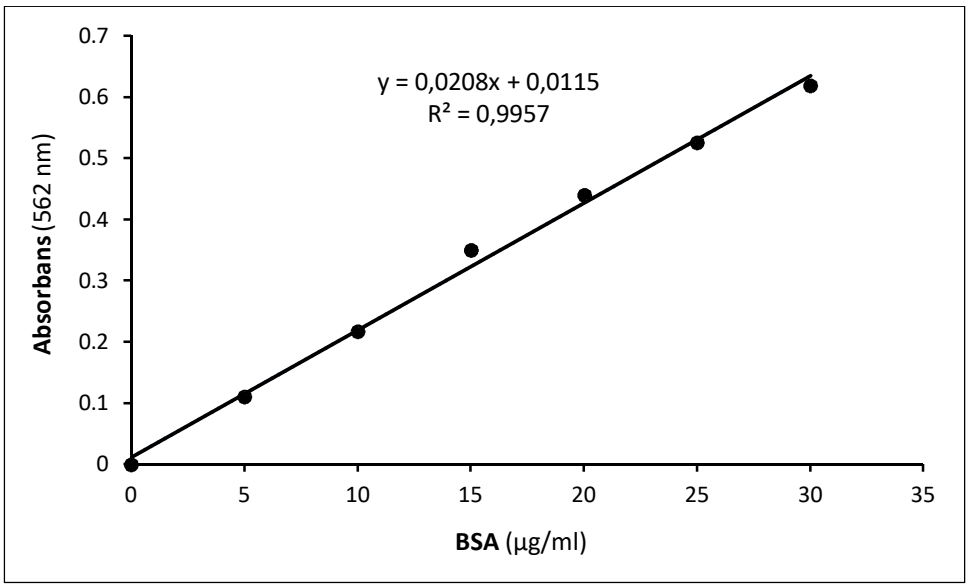
Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi: Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme temeline dayanmaktadır. (Yordanova *et al.* 2004). Reaksiyon karışımında (3 ml); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,8), 13 mM metiyonin, 75 µM NBT, 2 µM riboflavin ve 0,1 mM EDTA bulunmaktadır.

Aktivite ölçümü için 3 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımdan 2,58 ml alınıp üzerine 30 µl enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımına 100 µM'lık riboflavin çözeltisinden 60 µl pipetlenip karıştırıldıktan sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk bekletilmiş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşturulmuştur. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EU/mg protein olarak verilmiştir.

Polifenol oksidaz (PPO) aktivitesi: Aktivite ölçümü, bir α-fenol olan katekolün oksijen mevcudiyetinde oldukça dayanıklı bir form olan kahverengi-sarı renkli bir kinona dönüşürken meydana gelen renk değişiminin sebep olduğu absorbans artışının 420 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır (Zhang *et al.* 2000). Aktivite ölçümü için 3 mL'lik spektrofotometre küvetine; 0,2 M fosfat tampon içerisinde hazırlanan katekol substrat çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra inkübasyon ortamına 100 µL enzim homojenatı ilave edilerek ve 420 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilmiştir. Ölçümlerde absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmış ve gram başına absorbans değeri belirlenmiştir.

Çözünebilir protein miktarının belirlenmesi

Dokulardan rastgele alınan 0,5 gr doku örneği soğutulmuş bir havan içerisine alınmış ve sıvı azot içinde toz haline gelinceye kadar homojenize edilmiştir. Daha sonra üzerine on katı kadar homojenizasyon tamponundan (100 mM KH_2PO_4, pH: 7,0) konularak doku örneklerinin iyice parçalanması sağlanamıştır. Tüpler, +4°C'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantları alınmıştır. Süpernatanttan 20 µl alınarak mikropleytlere yerleştirilmiş ve üzerine BCA reaktifinden 200 µl ilave edilmiştir. Pleytler içeriğiyle beraber kısa bir müddet çalkalandıktan sonra 60ºC'de 15 dk bekletilmiştir. Örneklerin absorbansı 562 nm'de bir spektrofotometrede okunacaktır. 200 µl BCA reaktifi kör numune olarak kullanılmıştır. Standart grafiğin hazırlanmasında stok BSA (bovine serum albumin) çözeltisi kullanılmıştır (Şekil 10).



Şekil 10. Protein tayininde kullanılan standart grafik

Yetiştirme ortamı besin elementi analizleri

Toplam azot tayini: yetiştirme ortamı örneklerinin azot içeriği mikrokjheldahl yöntemiyle belirlenecektir (Bremner 1996).

Deneme sonunda topraklardan her bir uygulamayı temsil edebilecek şekilde, rizosfer bölgesinden her bir uygulamadan 3 yetiştirme ortamı örneği alınmıştır. Bu toprak örneklerinde, besin elementi (P, K, Ca, Mg, Na, Zn, Fe, Ma) tayini yapılmıştır. ICP OES spektofotometresinde (Inductively Couple Plasma spectrophotometer) (Perkin-Elmer, Optima 2100 DV, ICP/OES, Shelton, CT 06484-4794, USA) okunmak suretiyle belirlenmişir (Mertens 2005).

İstatistik A**naliz**

Formülasyonların dört dozda bitkiye uygulanması, formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması, bitki ve yetiştirme ortamı analiz sonuçları, JMP 5.0.1 bilgisayar yazılımı kullanılarak istatistiksel çoklu karşılaştırma analizine tabi tutulmuş ve önem derecesi 0,01 seviyede ortaya koyulmuştur (Limanska *et al.* 2015).

Katı taşıyıcılı Formülason Raf Ömrü Tayini

12 katı taşıyıcılı formülasyonların üretimi sonrası her bir formülasyon ikiye bölünmüş ve iki ayrı kavanoza koyularak 24 kavanoz elde edilmiştir. Kavanozların 12'si oda sıcaklığında diğer 12'si ise buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilmiş ve aylık sayımları yapılarak raf ömürleri belirlenmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI

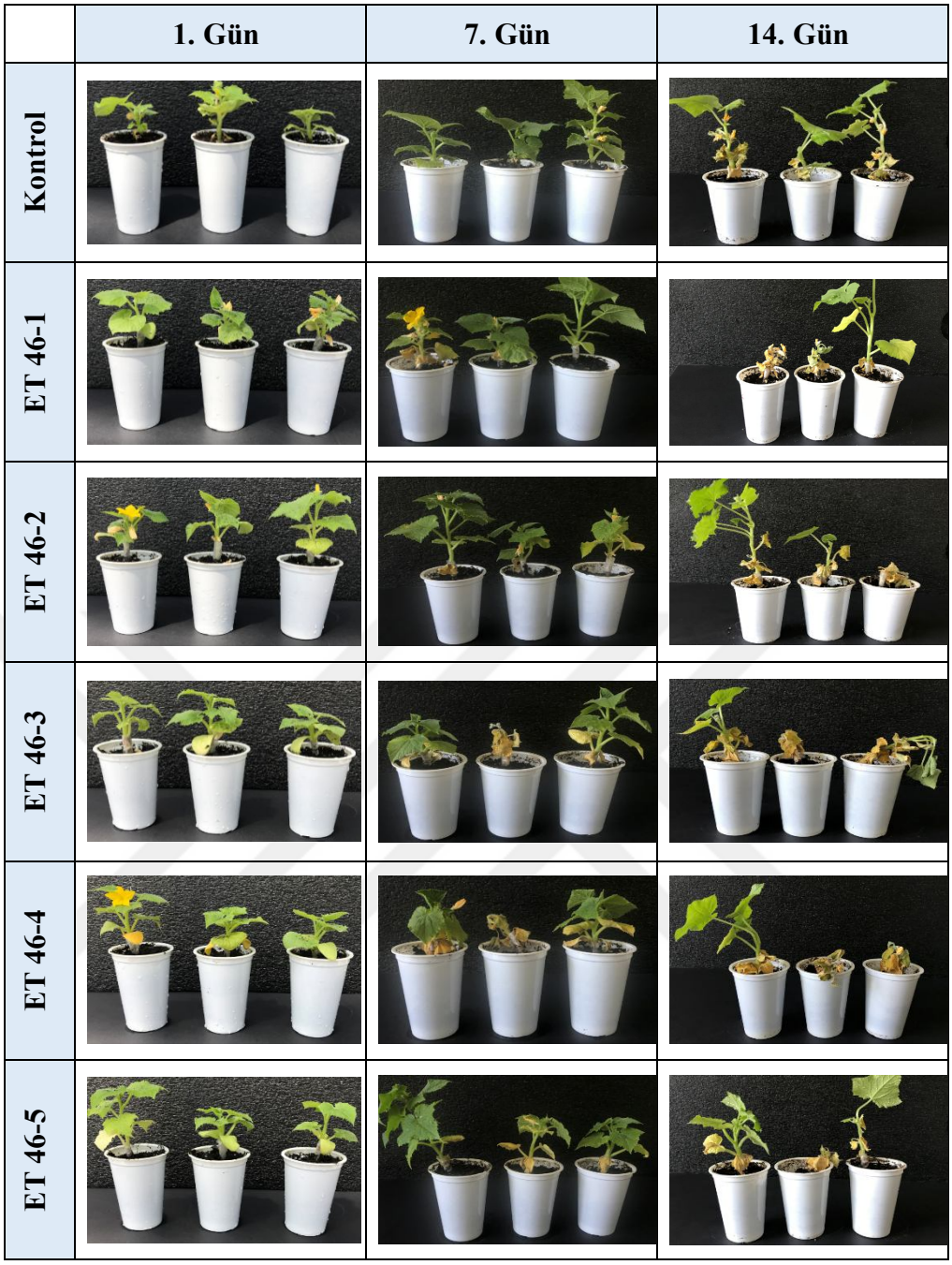
Patojen Fungusun Virülanslık Test Sonuçları

Patojen fungus olarak; daha önce hıyarda (*Cucumis sativus* L. var. Kros F1) yapılan çalışmalarda solgunluk simptomu görülen aynı hıyar bitkisinin kök örneğinden izole edilen toplam 10 fungus izolatının Koch postulatlarına göre patojenite test sonuçları Tablo 6'da verilmiştir. ET 46-6 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*) izolatı, virülanslığı en yüksek izolat olarak belirlenmiştir. Bu izolat Koch postulatlarına göre tekrar bitkiye bulaştırılarak hastalıklı bitki dokusundan yeniden elde edilmiş ve morfolojik olarak tanılanmıştır. Çalışma devamında fungus ET 46 olarak adlandırılmıştır.

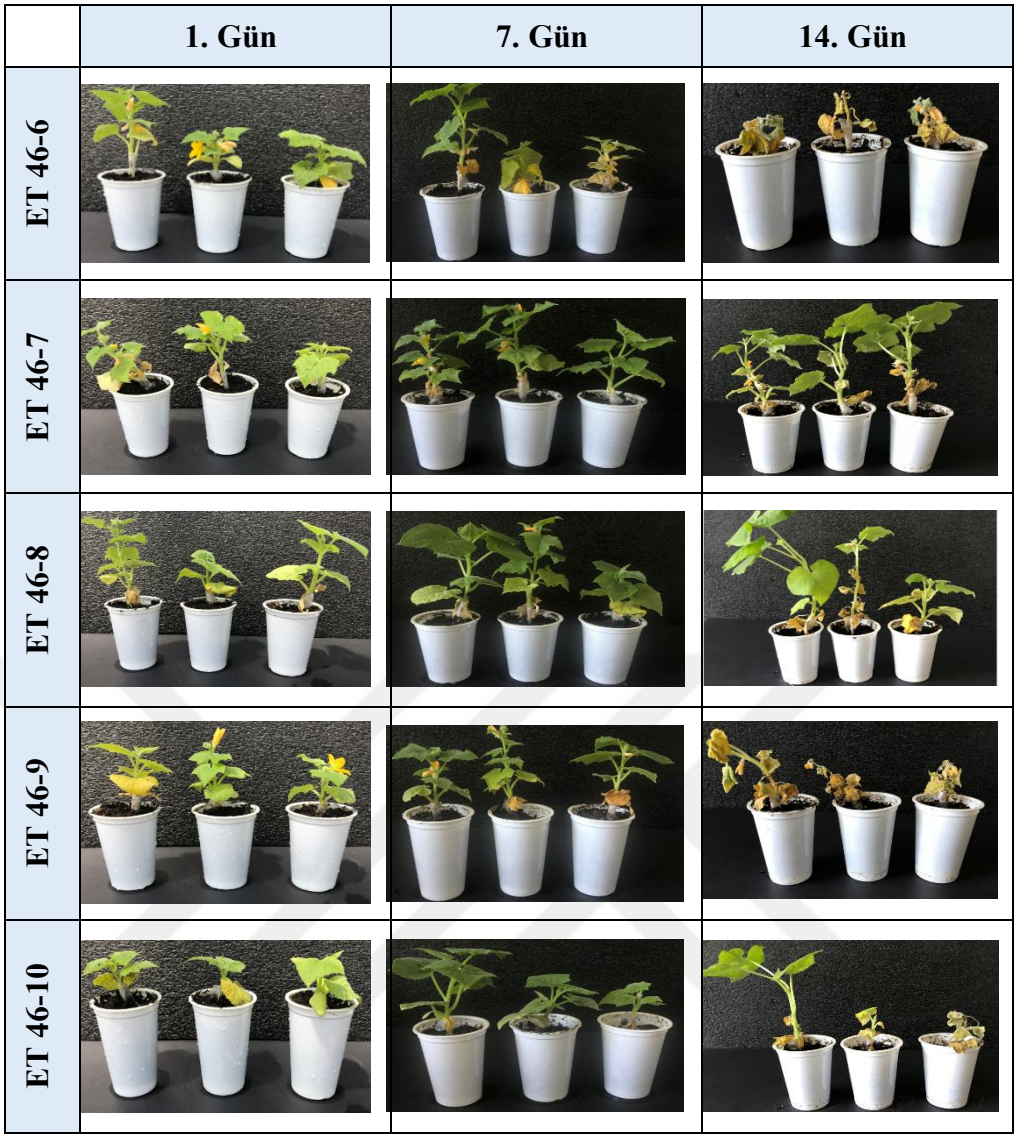
Tablo 6. Farklı ET 46 funguslarının hıyar bitkisinde neden olduğu hastalık skalasına göre değerlendirilmesi

Fungus Kodu	1. Bitki	2. Bitki	3. Bitki	Ortalama
ET 46-1	0	5	4	**3**
ET 46-2	0	5	2	**2**
ET 46-3	5	4	3	**4**
ET 46-4	5	5	1	**4**
ET 46-5	1	5	2	**3**
ET 46-6	5	5	5	**5**
ET 46-7	0	1	1	**1**
ET 46-8	0	1	1	**1**
ET 46-9	3	5	5	**4**
ET 46-10	5	1	4	**3**

Tablo 6'da görüldüğü gibi ET 46 *Fusarium oxysporum radicis-cucumerinum* fungusunun tüm bitkileri öldürdüğü, skalada da en yüksek puana ulaştığı görülmüştür ve çalışmalarda bu fungus kullanılmıştır (Şekil 11).

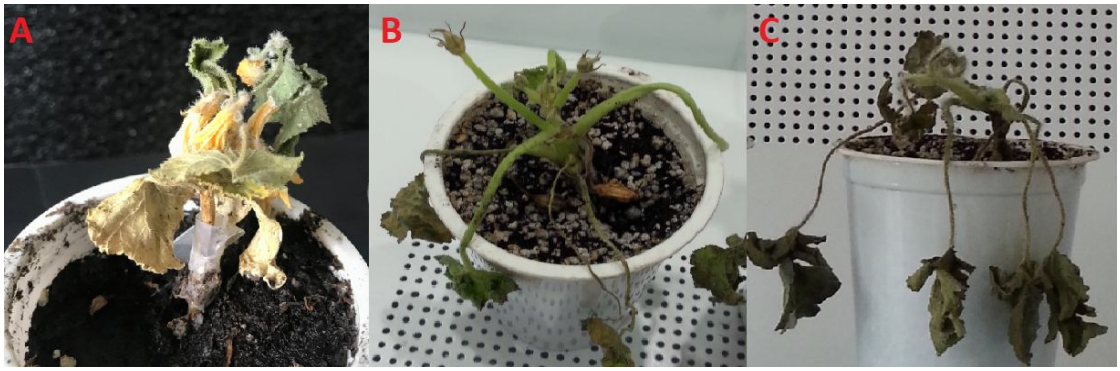


Şekil 11. Farklı ET 46 fungusunun uygulandığı hıyar bitkileri



Şekil 11. Farklı ET 46 fungusunun uygulandığı hıyar bitkileri (devamı)

ET 46 fungusunun patojenite testi kabakgillerde hıyar (*Cucumis sativus*), sakız kabağı (*Cucurbita pepo)* ve karpuza (*Citrullus lanatus*) karşı uygulanmış ve uygulanan türlerde ET 46 fungusunun test edilen bütün konukçularda patojen ve yüksek derecede virülans etkiye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 12).



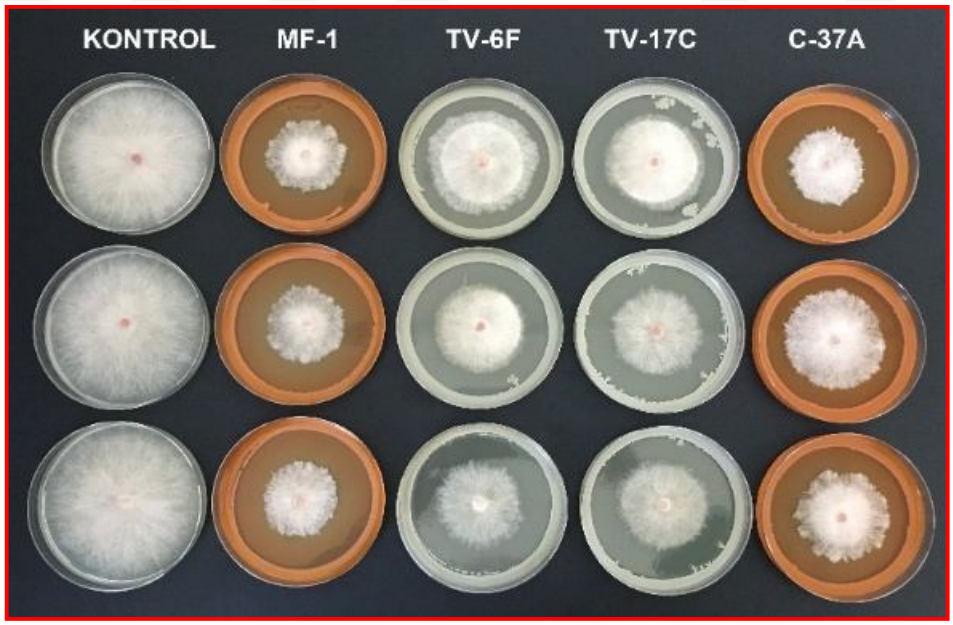
Şekil 12. ET 46 *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*'un neden olduğu kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığının kabakgillerde görüntüsü (A: Hıyar, B: Kabak, C: Karpuz)

Petride Antifungal Denemenin Sonuçları

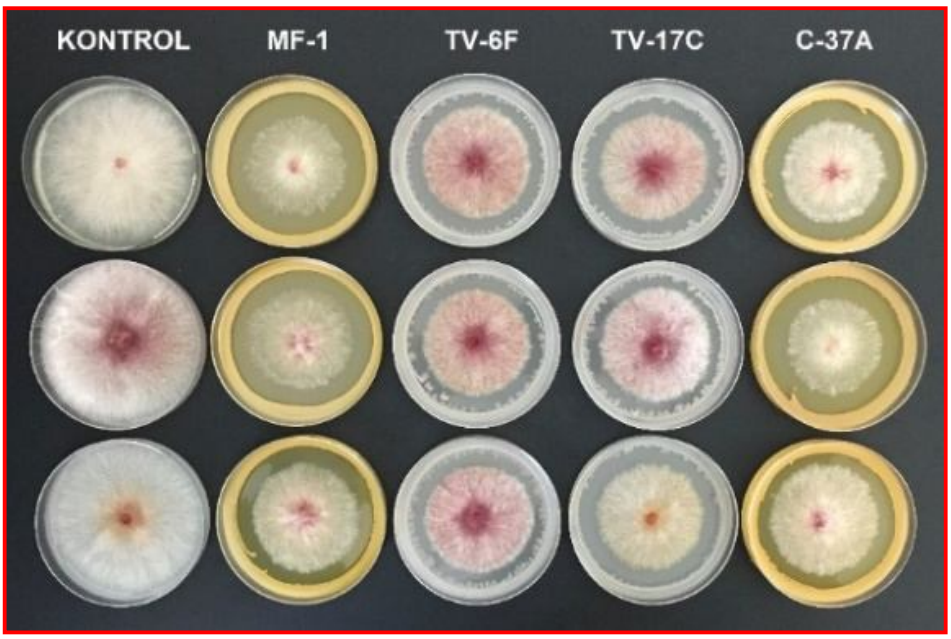
Biyoajan bakterilerin ET 46 fungus izolatının NA ve PDA besiyerinde fungal diskin büyüme çapına (FDBÇ) olan etkisi (mm) ve yüzde engelleme oranı (YEO) Tablo 7'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; test edilen bütün potansiyel biyoajanların patojen fungusun gelişimini önlediği görülmüştür. NA ve PDA besiyerinde kontrol uygulamasında fungal diskin ortalama büyüme çapı 85 mm iken NA besiyerinde potansiyel biyoajan uygulamalarında fungal diskin büyüme çapı 42 ile 53 mm arasında, yüzde etkinlik oranı ise %37,6 ile %50,5 arasında ve PDA besiyerinde ise fungal diskin büyüme çapı 55 ile 58 mm, yüzde etkinlik oranı ise %31,7 ile %35,2 arasında olmuştur. Bütün biyoajan bakterilerin patojen fungusa karşı NA besiyerindeki etkinliği PDA besiyerindeki etkinlikten daha yüksek çıkmıştır (Şekil 13, 14).

Tablo 7. Biyoajan bakterilerin NA ve PDA besiyerinde patojen fungusun gelişimine etkisi

Uygulamalar	NA Besiyeri		PDA Besiyeri	
	FDBÇ (mm)	YEO (%)	FDBÇ (mm)	YEO (%)
MF-1 + ET 46	42	%50,5	56	%34,1
TV-6F + ET 46	53	%37,6	58	%31,7
TV-17C + ET 46	50	%41,1	58	%31,7
C-37A + ET 46	48	%43,5	55	%35,2
ET 46 (Kontrol)	85	%00,0	85	%00,0



Şekil 13. Biyoajan bakterilerin NA besiyerinde patojen fungusun gelişimine etkisi



Şekil 14. Biyoajan bakterilerin PDA besiyerinde patojen fungusun gelişimine etkisi

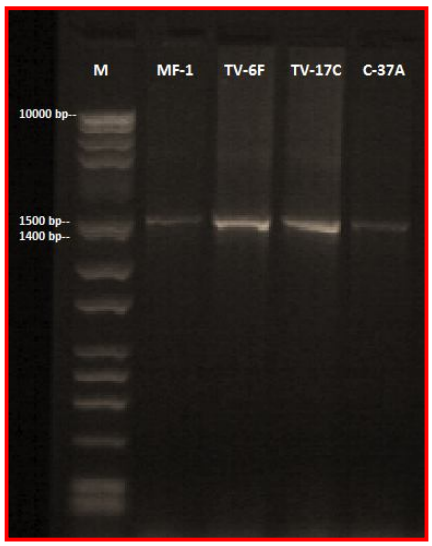
Bakterilerin 16s rDNA Dizi Analizi Sonuçları

Biyoajan bakterilerin 16s rDNA bölgesi dizi analizi sonuçları Tablo 8'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; MF-1 izolatı %99,71 ve C-37A izolatı ise %99,28 benzerlik oranı ile *Pseudomonas chlororaphis*; TV-6F ve TV-17C izolatı ise %99,86 oranı ile *Bacillus subtilis* olarak tanılanmıştır.

Tablo 8. Bakteri izolatlarına ait 16S rDNA bölgesinin tarama sonucu

Bakteri Kodu	Bakteri Tanı Sonucu	Tür Bazında Benzerlik Oranı
MF-1	*Pseudomonas chlororaphis*	%99,71
TV-6F	*Bacillus subtilis*	%99,86
TV-17C	*Bacillus subtilis*	%99,86
C-37A	*Pseudomonas chlororaphis*	%99,28

Bakterilerden elde edilen 16S rDNA bölgesi PCR işlemi ile çoğaltılmış ve PCR ürünlerinin jel elektroforezinde görüntüleri Şekil 15'de verilmiştir. Kullanılan markıra göre tüm bakterilerin baz çifti uzunluğu 1500 bp civarında yer aldığı görülmektedir.



Şekil 15. Bakterilerin 16S rDNA PCR ürünlerinin jel elektroforezinde görüntüleri (M:Markır)

Bakterilerde Kitinaz ve Fitaz Enzimi Aktivitesi Sonuçları

Biyoajan bakterilerin sıvı kültüründe $(NH_4)_2SO_4$ çöktürme aralıkları ve bu aralıklarda belirlenen fitaz ve kitinaz enzim aktivite değerleri Tablo 9'da verilmiştir. Verilen sonuçlarda da görüldüğü gibi çöktürme işleminde birkaç deneme yapılmasına rağmen çok başarılı olunamamıştır. Çoğu aralıkta çökelek elde edilememiştir. Çökeleğin elde edildiği aralıklarda ise çökelek çok az miktarda elde edilmiştir. Aktivite sonuçlarında da çöktürme işlemi yapılmadan önceki aktivitelerinin tüm bakterilerde en yüksek değer olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple kısmi saflaştırılmış solüsyonların kullanılmamasına, yalnız bakterilerin kendi sıvı kültürlerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 9. Bakterilerin (NH4)2SO4 çöktürme aralıkları ve bu aralıklarda belirlenen fitaz ve kitinaz enzim aktivite değerleri

Bakteri Kodu	$(NH_4)_2SO_4$ Çöktürme Aralığı	Fitaz Enzimi						Kitinaz Enzimi					
		Çökelek			Süpernatant			Çökelek			Süpernatant		
		Toplam Hacim (mL)	Enzim (EU/mL.dak)	Toplam Aktivite	Toplam Hacim (mL)	Enzim (EU/mL.dak)	Toplam Aktivite	Toplam Hacim (mL)	Enzim (EU/mL.dak)	Toplam Aktivite	Toplam Hacim (mL)	Enzim (EU/mL.dak)	Toplam Aktivite
MF-1	**Homojenat**	-	-	-	20	**413**	8258	-	-	-	20	**0,277**	5,534
	%0-20	-	-	-	20	403	8062	1	0,011	0,011	20	0,042	0,842
	%20-40	-	-	-	20	367	7348	-	-	-	21	0,068	1,419
	%40-60	1	135	135	21	352	7396	-	-	-	21	0,017	0,348
	%60-80	-	-	-	21	336	7059	-	-	-	21,5	0,026	0,548
TV-6F	**Homojenat**	-	-	-	20	**424**	8482	-	-	-	20	**0,173**	3,468
	%0-20	-	-	-	20	416	8325	-	-	-	20	0,028	0,561
	%20-40	-	-	-	20	401	8017	-	-	-	22	0,006	0,140
	%40-60	1	131	131	21	375	7865	1	0,006	0,006	22	0,048	1,066
	%60-80	1	128	128	20,5	366	7495	1	0,018	0,018	22	0,006	0,140
TV-17C	**Homojenat**	-	-	-	20	**446**	8928	-	-		20	**0,159**	3,188
	%0-20	-	-	-	20	437	8736	-	-		20	0,010	0,204
	%20-40	-	-	-	20	434	8687	-	-		20,5	0,009	0,183
	%40-60	1	141	141	21	395	8301	1	0,003	0,003	21	0,010	0,214
	%60-80	1	134	134	22	355	7812	1	0,014	0,014	21,5	0,008	0,164
C-37A	**Homojenat**	-	-	-	20	**458**	9151	-	-	-	20	**0,265**	5,304
	%0-20	-	-	-	20	448	8950	1	0,048	0,048	20	0,060	1,199
	%20-40	-	-	-	20,5	409	8382	-	-	-	20,5	0,014	0,288
	%40-60	-	-	-	21	375	7879	1	0,031	0,031	21	0,032	0,669
	%60-80	1	126	126	23	352	8085	-	-	-	21,5	0,013	0,274

Bakterilerin Optimum Geliştiği Besiyeri Sonuçları

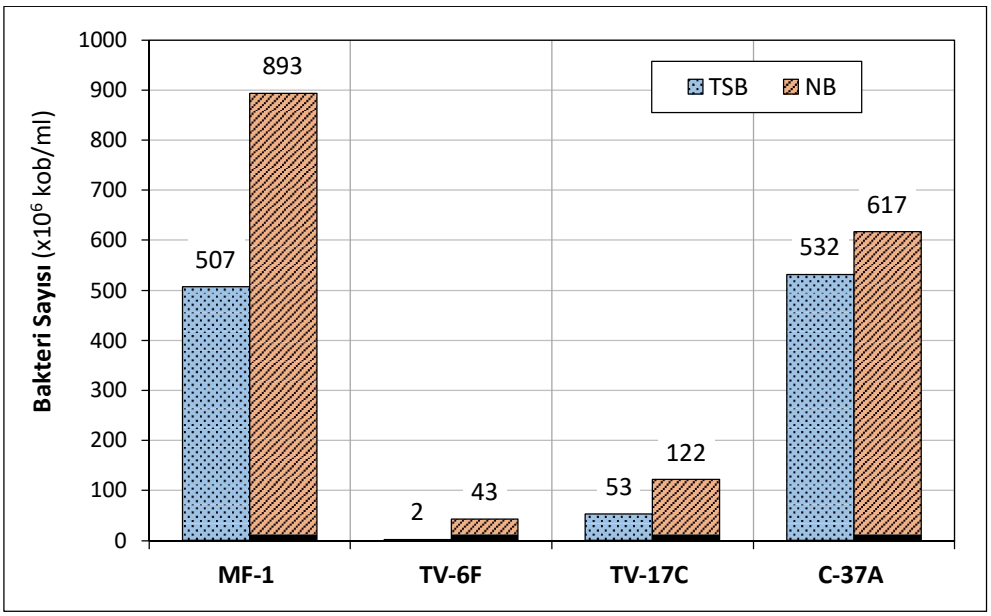
Çalışmada kullanılan biyoajan bakterilerin NB ve TSB besiyerlerinde mililitredeki koloni oluşturan bakteri sayıları Tablo 10'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre; MF-1 bakteri izolatı NB besiyerinde 893×10^6 kob/ml gelişme gösterirken bu değer TSB besiyerinde 507×10^6 kob/ml olmuştur. TV-6F için NB besiyerinde gelişme 43×10^6 kob/ml ve TSB besiyerinde gelişme 2×10^6 kob/ml, TV-17C için NB besiyerinde gelişme 122×10^6 kob/ml ve TSB besiyerinde gelişme 53×10^6 kob/ml, C-37A için NB besiyerinde gelişme 617×10^6 kob/ml ve TSB besiyerinde gelişme 532×10^6 kob/ml olmuştur. Çalışmada kullanılan biyoajan bakterilerin tamamı NB besi ortamında daha iyi geliştiğinden, ileride kullanılacak bakteri çoğaltımı için kullanılacak besiyeri olarak NB belirlenmiştir.

Tablo 10. Bakterilerin farklı besiyerlerindeki gelişme sonuçları

Bakteri Kodu	Besiyeri Adı	Mililitredeki Koloni Oluşturan Bakteri Sayıları ($\times10^6$ kob/ml)			
		1. Petri	2. Petri	3. Petri	Ortalama
MF-1	**NB**	860	800	1020	893
	TSB	400	520	600	507
TV-6F	**NB**	33	53	43	43
	TSB	2,0	2,6	2,1	2,0
TV-17C	**NB**	133	105	127	122
	TSB	50	67	43	53
C-37A	**NB**	480	710	660	617
	TSB	440	424	732	532

(NB: Nurtient Broth **TSB:** Tyriptic Soy Broth **)**

Şekil 16'da da görüldüğü gibi aynı besi ortamlarında en hızlı gelişen bakteri MF-1 izolatı olurken, bunu sırasıyla C-37A, TV-17C ve TV-6F izolatları takip etmektedir.



Şekil 16. Bakterilerin farklı besiyeri ortamlarındaki gelişme grafiği

Bakterilerin Optimum Geliştiği pH Sonuçları

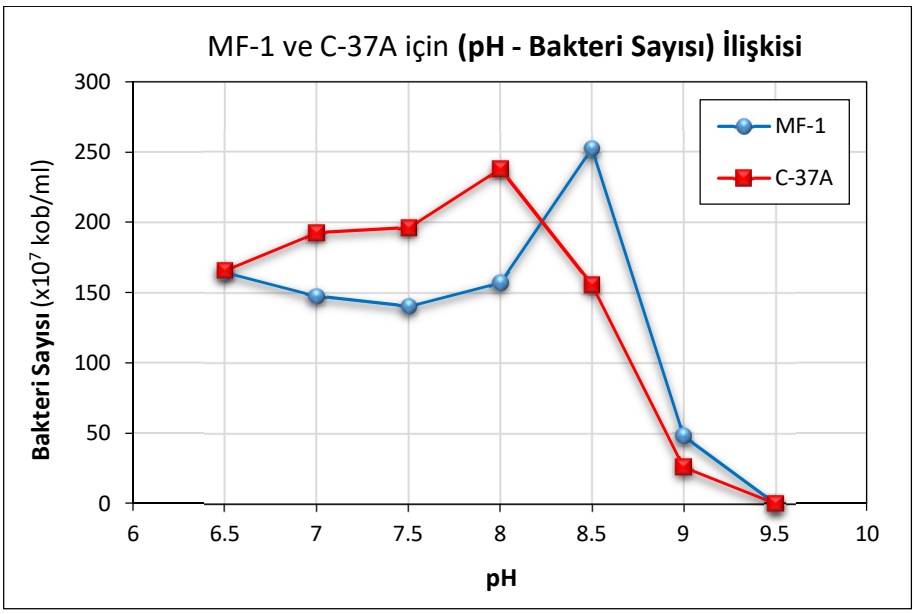
Çalışmada kullanılan biyoajan bakterilerin farklı pH'larda mililitredeki koloni oluşturan bakteri sayıları Tablo 11'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; MF-1 ve TV-17C izolatlarının pH=8,5, C-37A izolatının pH=8 ve TV-6F izolatının ise pH=7,5'da en yüksek gelişmeyi gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 11. Bakteri izolatlarının pH bakteri sayısı arasındaki ilişkisi

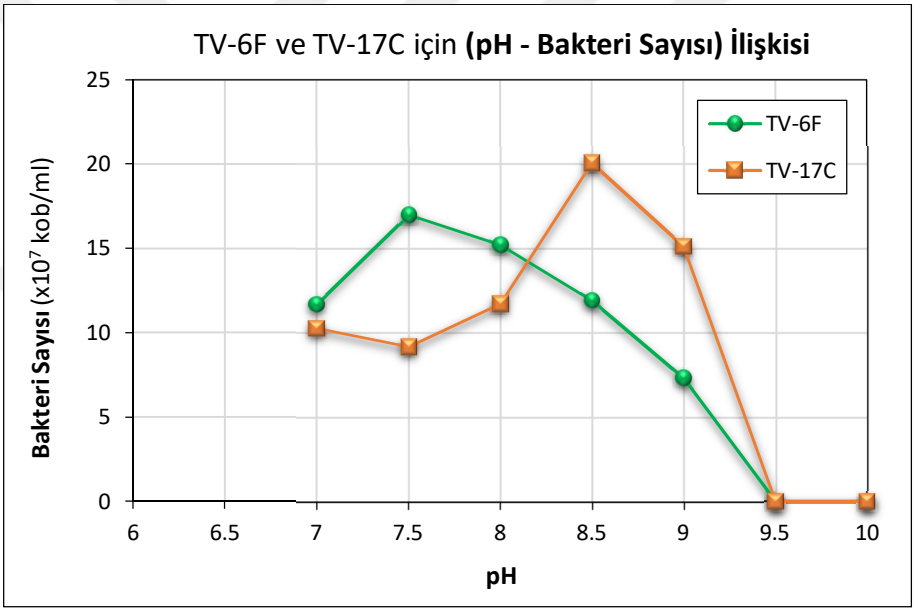
pH	Mililitredeki Koloni Oluşturan Bakteri Sayıları (×10^7 kob/ml)			
	MF-1	**C-37A**	**TV-6F**	**TV-17C**
6,5	164 ± 23	166 ± 63	-	-
7	147 ± 16	193 ± 84	12 ± 1	10 ± 2
7,5	140 ± 17	196 ± 18	**17 ± 2**	9 ± 1
8	157 ± 57	**238 ± 16**	15 ± 1	12 ± 1
8,5	**253 ± 30**	156 ± 28	12 ± 2	**20 ± 2**
9	48 ± 2	26 ± 3	7 ± 1	15 ± 1
9,5	0,05	0,006633	0,000045	0,004
10	-	-	0,000049	0,00006

Tablodaki değerler, (ortalama ± standart sapma) olarak verilmiştir.

Çalışmada kullanılan biyoajan bakterilerin farklı pH'larda mililitredeki koloni oluşturan bakteri sayıları ile ilgili oluşturulan grafikler MF-1 ve C-37A bakterileri için Şekil 17'de, TV-6F ve TV-17C için ise Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 17. MF-1 ve C-37A için (pH – bakteri sayısı) ilişkisi



Şekil 18. TV-6F ve TV-17C için (sıcaklık – bakteri sayısı) ilişkisi

Bakterilerin Optimum Geliştiği Sıcaklık Sonuçları

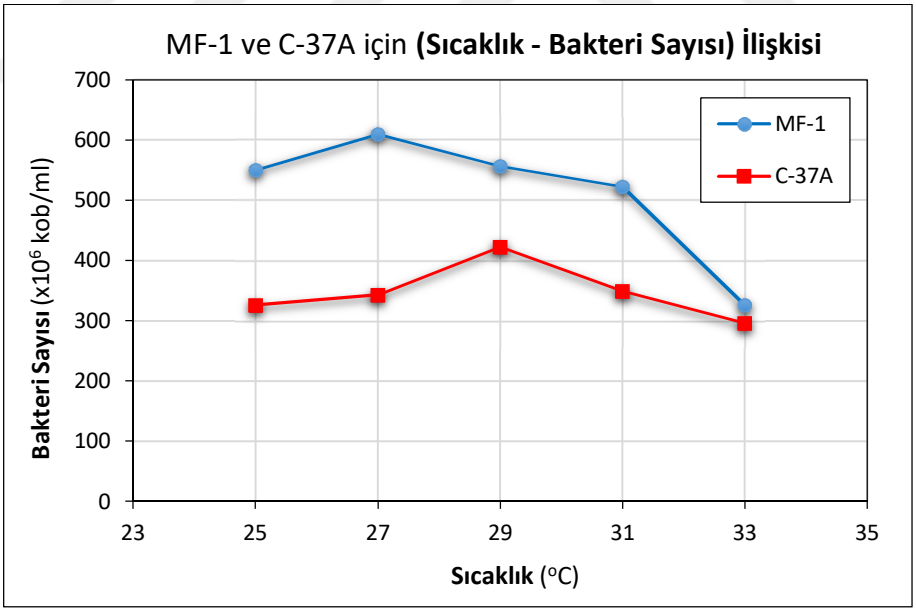
Çalışmada kullanılan biyoajan bakterilerin farklı sıcaklıklarda mililitredeki koloni oluşturan bakteri sayıları Tablo 12'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; MF-1 ve TV-17C izolatlarının pH = 8,5, C-37A izolatının pH = 8 ve TV-6F izolatının ise pH = 7,5'da en yüksek gelişmeyi gösterdiği tespit edilmiştir. MF-1 bakterisinin 27ºC, C-37A bakterisinin 29ºC, TV-6F ve TV-17C bakterilerinin ise 35ºC'de en yüksek gelişmeyi gösterdiği görülmüştür. MF-1 ve C-37A izolatları 35ºC'nin üzerinde, TV-6F ve TV-17ºC izolatları ise 29ºC'nin altında gelişme göstermemişlerdir.

Tablo 12. Bakteri izolatlarının farklı sıcaklıklarda gelişme durumları

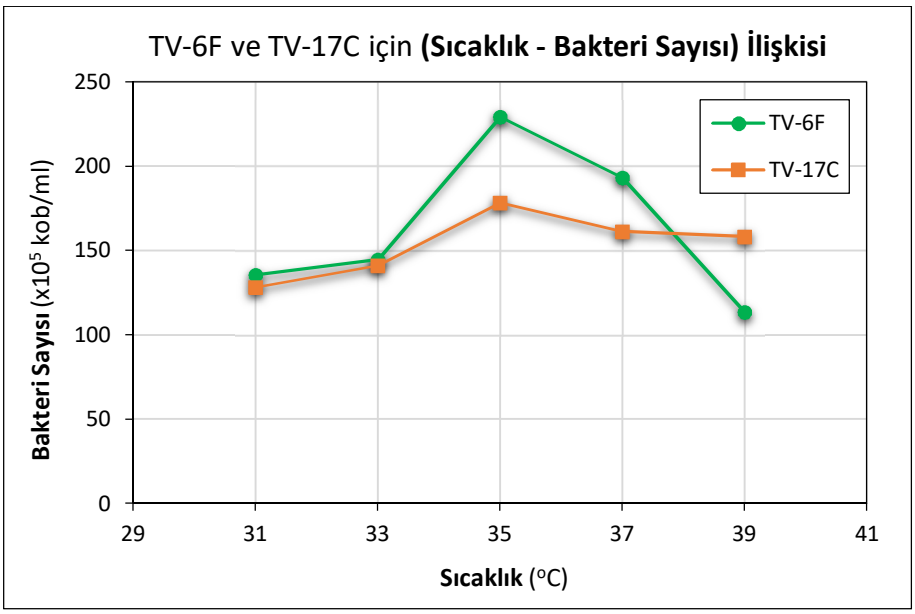
Sıcaklık (°C)	Mililitredeki Koloni Oluşturan Bakteri Sayıları (×10⁶ kob/ml)			
	MF-1	C-37A	TV-6F	TV-17C
25	550 ± 132	327 ± 105	-	-
27	**610 ± 30**	343 ± 75	-	-
29	557 ± 202	**423 ± 58**	-	-
31	523 ± 145	350 ± 29	13,6 ± 5,3	12,8 ±1
33	327 ± 50	297 ± 64	14,5 ± 3	14,1 ± 5,6
35	-	-	**22,9 ± 9,4**	**17,8 ± 2,8**
37	-	-	19,3 ± 8,1	16,1 ± 1,8
39	-	-	11,3 ± 4,9	15,8 ± 1

Tablodaki değerler, (ortalama ± standart sapma) olarak verilmiştir.

Çalışmada kullanılan biyoajan bakterilerin farklı sıcaklıklarda mililitredeki koloni oluşturan bakteri sayıları ile ilgili oluşturulan grafikler MF-1 ve C-37A bakterileri için Şekil 19'da, TV-6F ve TV-17C için ise Şekil 20'de gösterilmiştir. Bu grafiklerde de MF-1 bakterisinin 27°C, C-37A bakterisinin 29°C, TV-6F ve TV-17C bakterilerinin ise 35°C'de en yüksek gelişim gösterdiği anlaşılmaktadır.



Şekil 19. MF-1 ve C-37A bakterileri için (sıcaklık – bakteri sayısı) ilişkisi



Şekil 20. TV-6F ve TV-17C bakterileri için (sıcaklık – bakteri sayısı) ilişkisi

Katı Taşıyıcılı Formülasyon Çalışma Sonuçları

Katı taşıyıcılı formülasyon ön deneme sonuçları

Katı taşıyıcılar oluşturulmadan önce birçok araştırma ve ön deneme çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalarda sona yaklaşırken ön deneme çalışmaları yapılmış ve Formülasyon A, B, C ve D olarak isimlendirilmiştir. Sonuçlar aşağıda ilgili başlıklar altında sunulmuştur.

Formülasyon-A ve Formülasyon-B'nin sonuçları

Formülasyon-A ve Formülasyon-B için kullanılan MF-1 bakterisinin sayım sonucu 47×10^6 kob/ml olarak bulunmuş ve bu sıvı kültür formülasyona aktarılmıştır. Kurutma işlemi sonrası Formülasyon-A 32×10^2 kob/ml ve Formülasyon-B 19×10^2 kob/ml olarak bulunmuştur. Elde edilen sayım sonuçlarına göre; formülasyonlarda bakteri sayıları çok az bulunmuş ve çalışmada bakteri sayısını artırmaya yönelik metod değiştirilerek, Formülasyon-C ve Formülasyon-D çalışması planlanıp uygulamaya aktarılmıştır.

Formülasyon-C ve Formülasyon-D'nin sonuçları

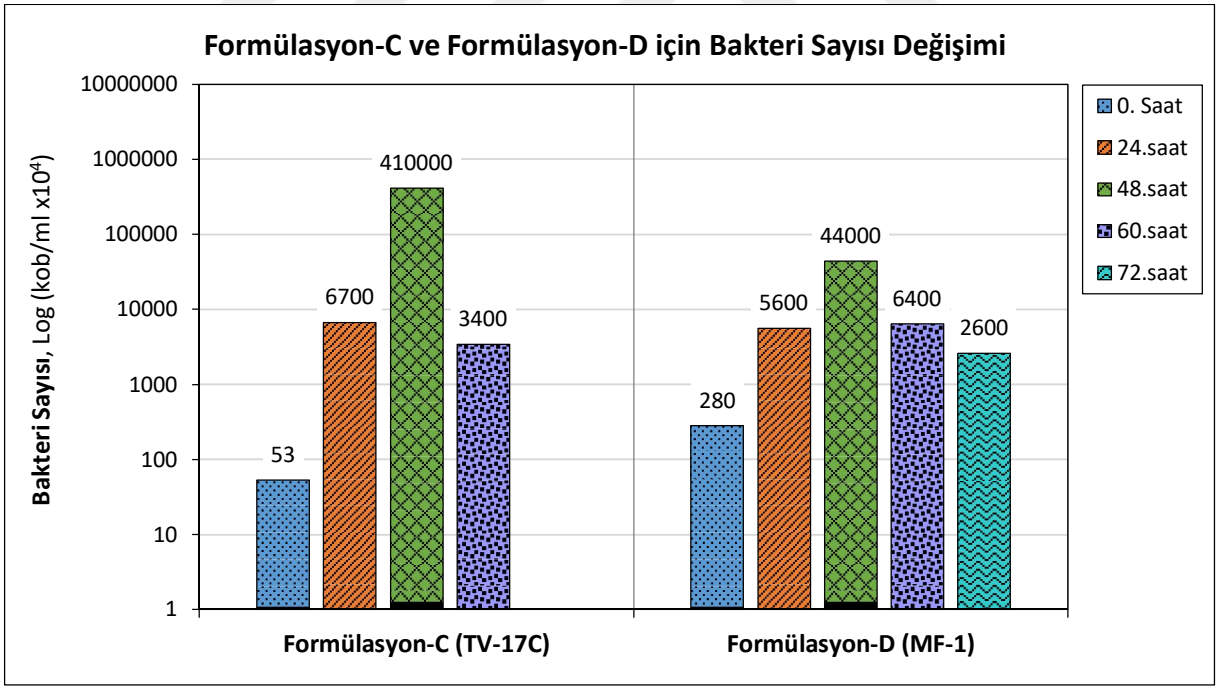
MF-1 izolatı ile hazırlanan Formülasyon-C ve TV-17C izolatı ile hazırlanan Formülasyon-D için, inkübasyon ve kurutma işlemleri yapıldıktan sonraki bakteri sayım sonuçları Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 13. Formülasyon-C ve Formülasyon-D'nin bakteri sayım sonuçları

Uygulanan İşlem	Saat	Mililitredeki Koloni Oluşturan Bakteri Sayıları (kob/ml)	
		Formülasyon C (MF-1 için)	Formülasyon D (TV-17C için)
İnkübasyon	**0**	53×10^4	28×10^5
	24	67×10^6	56×10^6
	48	$\mathbf{41\times10^8}$	44×10^7
Kurutma	**60**	34×10^6	$\mathbf{64\times10^6}$
	72	-	26×10^6

- : Formülasyon-C 60. saatte yeterli kuruma miktarına ulaştığı için kurutma işlemi sonlandırılmıştır.

Formülasyon çalışmalarında inkübasyon sırasında bakteri miktarı artmıştır. Formülasyon-C'de başlangıç sayımı 53×10^4 kob/ml iken inkübasyon sonrası 41×10^8 kob/ml olarak, Formülasyon-D'de başlangıç sayımı 28×10^5 kob/ml iken, inkübasyon sonrası sayımı 44×10^7 kob/ml olarak bulunmuştur. Formülasyon-C ve Formülasyon-D için, kurutma sonrası 60. ve 72. saat bakteri sayın sonuçları sırasyla 34×10^6 kob/m ve 26×10^6 kob/m olarak bulunmuştur. Formülasyon-C ve Formülasyon-D'nin bakteri sayısı değişim grafiği Şekil 21'de verilmiştir.



Şekil 21. Formülasyon-C ve Formülasyon-D için süreçteki bakteri sayısı değişimi

Şekil 21'de görüldüğü gibi inkübasyon sonrası giderek azalan bakteri sayımları elde edilmiştir. Özellikle Formülasyon-C'de azalış miktarının 4×10^3 kob/m olarak daha büyük miktarda olduğu gözlenmiştir.

MF-1 ve TV-17 Bakterilerinin 96 saatlik gelişimlerinin izlenmesi

Formülasyonları oluşturulurken daha yoğun bakteri uygulaması yapılabilmesi için MF-1 ve TV-17C bakterilerin 96 saat boyunca her 24 saate bir sayım sonuçları yapılmış ve sonuçları Tablo 14'de verilmiştir. MF-1 bakterisinde 4 günlük sayım sonucunda artış bulurken, TV-17C bakterisinin sayım sonucunda azalışı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre 96 saatlik bakterilerin en yüksek sayım sonuçlarına ulaştığı değerler ve saatleri; MF-1 bakterisi için 230×10^7 kob/ml ile 96. saat, C-37A bakterisi 176 x 10^7 kob/ml ile 24. saat olarak bulunmuştur.

Tablo 14. MF-1 ve TV-17C bakteri izolatlarının zamana göre sayım sonuçları

Saat	Mililitredeki Koloni Oluşturan Bakteri Sayıları ($\times10^7$ kob/ml)	
	MF-1	**TV-17C**
24	119 ± 7	**176 ± 5**
48	166 ± 4	16 ± 1
72	191 ± 35	15,6 ± 1,8
96	**230 ± 7**	13,7 ± 1,1

Tablodaki değerler, (ortalama ± standart sapma) olarak verilmiştir.

TV-6F ve TV-17C Bakterilerinden Endospor Üretim Sonuçları

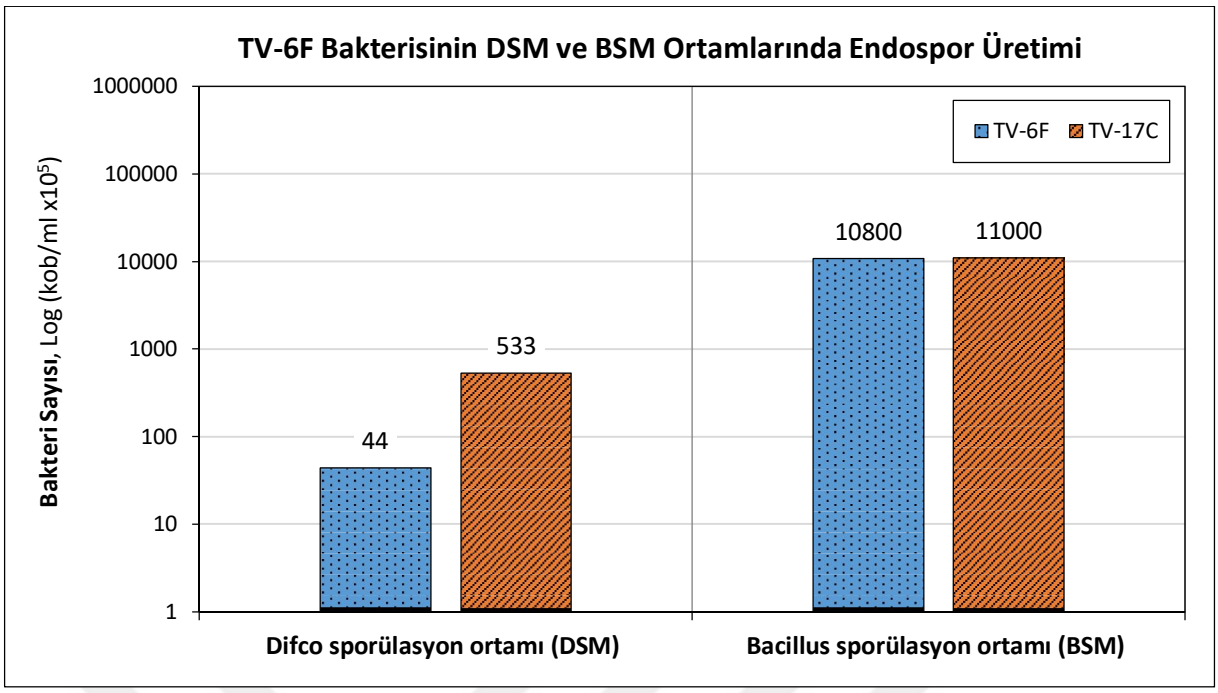
TV-6F ve TV-17C bakterileri DSM ve BSM ortamlarında üretilen endospor miktarları sayım sonuçları petrilerde ayrı ayrı ve ortalama olarak Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 15. TV-6F ve TV-17C bakterilerinin DSM ve BSM ortamında endospor üretim sonuçları

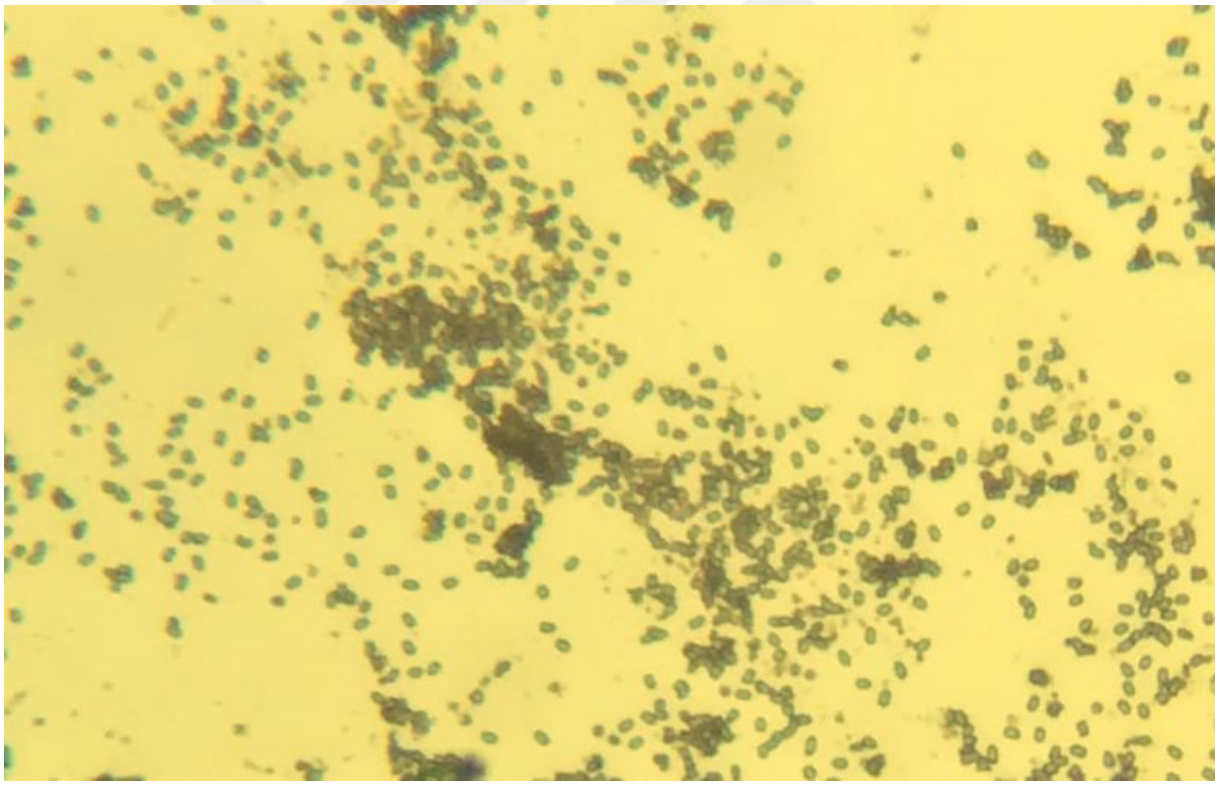
Bakteri kodu	Besiyeri Adı	Mililitredeki Koloni Oluşturan Bakteri Sayıları ($\times10^5$ kob/ml)			
		1. Petri	**2. Petri**	**3. Petri**	**Ortalama**
TV-6F	**DSM**	52	41	40	44
	BSM	10000	11300	11100	10800
TV-17C	**DSM**	540	420	640	533
	BSM	14300	9900	8900	11000

DSM: Difco sporülasyon ortamı, **BSM:** Bacillus sporülasyon ortamı

Tablo 15'de görüldüğü gibi BSM ortamında TV-6F ve TV-17C bakterileri yaklaşık olarak 1×10^9 kob/ml bakteri sayısına sahipken DSM ortamında bu sayı TV-6F için $4{,}4\times10^6$ TV-17C $5{,}3\times10^7$ olarak bulunmuştur. Sonuçlara göre TV-6F ve TV-17C bakterileri için en iyi endospor üretim ortamı BSM olmuştur. TV-6F ve TV-17C için DSM ve BSM ortamındaki endospor miktarı değişimleri Şekil 22'de verilmiştir.



Şekil 22. TV-6F ve TV-17C bakterilerinin DSM ve BSM ortamında endospor üretimi



Şekil 23. TV-6F ve TV-17C bakterilerinin DSM ve BSM ortamında endospor üretimi

Şekil 23'de spor boyama sonrası TV-17C'nin mikroskobik görüntüsünde vejetatif hücrelerin kırmızı spor hücrelerinin yeşil olduğu gözlenmiştir.

Katı taşıyıcılı formülasyonda kullanılacak koruyucu maddelerin bakteriler üzerine antibakteriyel etkisi

Katı taşıyıcılı formülasyonda kullanılacak koruyucu maddelerin belirlenen miktarlarının bakteriler üzerine etkisine bakılmıştır. Sitrik asit (%0,6) ve tüm koruyucular (sitrik asit (%0,6), potasyum sorbat (%0,2), sorbik asit (%0,2)) petride çukur ve disk yöntemi kullanılarak biyoajan bakterilerin üzerine etkisini gösteren test sonuçları Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. Koruyucu maddelerin bakteriler üzerine etkisi

Bakteri Adı	Metod	İnhibisyon Zonu (mm)							
		Sitrik Asit*			Ortalama	Karma**			Ortalama
MF-1	Çukur	8	8	6	7	11	10	10	10
	Disk	9	10	11	10	9	10	11	10
TV-6F	Çukur	9	8	8	8	14	11	12	12
	Disk	10	11	9	10	11	10	10	10
TV-17C	Çukur	10	8	12	10	9	11	12	11
	Disk	10	10	10	10	10	11	7	09
C-37A	Çukur	11	9	8	9	11	11	12	11
	Disk	10	11	8	10	10	10	10	10

*Sitrik asit (%0,6), ** Sitrik asit (%0,6) + potasyum sorbat (%0,2) + sorbik asit (%0,2)

Tablo 16'da görüldüğü gibi koruyucu maddeler formülasyonlarda kullanılacak biyoajan bakteriler üzerine engelleyici etkiye neden olmuş ve petrilerde zon oluşmuştur. Sorbik asit suda zor çözündüğü için kullanılmaktan vazgeçilmiş ve potasyum sorbatın miktarı iki katına çıkarılarak uygulamalar yapılmıştır. Potasyum sorbat için %0,4; %0,3; %0,2; %0,1 ve sitrik asit için %0,5; %0,4; %0,3; %0,2; %0,1 olacak şekilde biyoajan bakterilerde etkinliği test edilmiştir. Ayrıca potasyum sorbat ve sitrik asitin bakteriler üzerine etkisiz olduğu doz karma olarak da uygulanmıştır. Sonuç olarak katı formülasyon için kullanılacak koruyucu maddelerin oranı %0,1 sitrik asit, %0,1 potasyum sorbat olarak belirlenmiştir.

Katı Taşıyıcılı Formülasyonların Üretimi Aşaması Sonuçları

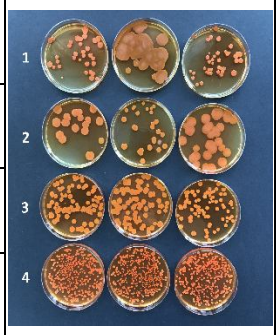
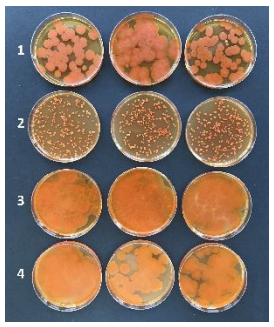
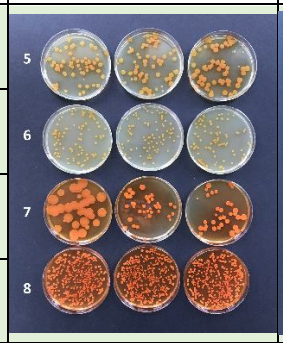
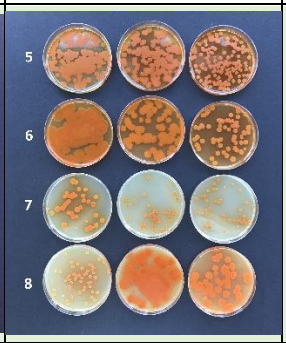
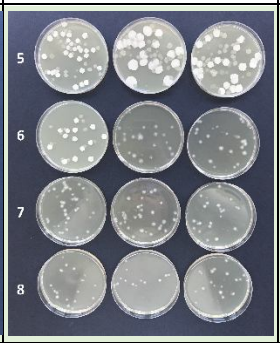
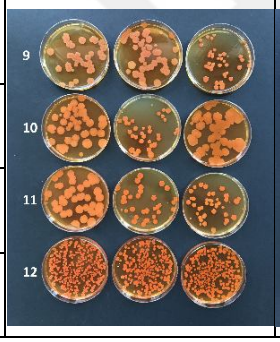
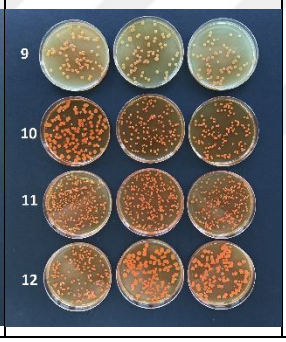
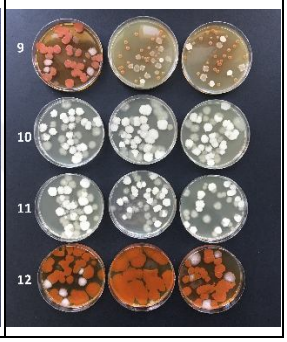
Tüm optimizasyon çalışmaları sonrası katı taşıyıcılı formülasyonların oluşturulmasına geçilmiştir. Formülasyonların üretim aşamalarındaki sayım sonuçları Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 17. Katı taşıyıcılı formülasyonların farklı üretim aşamalarındaki sayım sonuçları

Formülasyon No	Formülasyonların Farklı Üretim Aşamalarındaki Bakteri Sayım Sonuçları (kob/gr)			
	I	II	III	IV
K-1	$(36\pm3)\times10^6$	$(51\pm2)\times10^7$	$(28\pm1)\times10^5$	$(95\pm2)\times10^7$
K-2	$(25\pm4)\times10^6$	$(3\pm0)\times10^7$	$(146\pm42)\times10^5$	$(33\pm7)\times10^7$
K-3	$(88\pm2)\times10^6$	$(54\pm13)\times10^7$	$(41\pm1)\times10^5$	$(46\pm7)\times10^7$
K-4	$(43\pm4)\times10^6$	$(4\pm1)\times10^7$	$(28\pm6)\times10^5$	$(22\pm14)\times10^7$
K-5	$(69\pm 5)\times10^6$	$(151\pm32)\times10^7$	$(63\pm2)\times10^5$	$(105\pm3)\times10^7$
K-6	$(41\pm2)\times10^6$	$(75\pm8)\times10^7$	$(35\pm13)\times10^5$	$(161\pm27)\times10^7$
K-7	$(377\pm42)\times10^6$	$(4\pm1)\times10^7$	$(52\pm15)\times10^5$	$(19\pm7)\times10^7$
K-8	$(46\pm5)\times10^6$	$(6\pm1)\times10^7$	$(44\pm4)\times10^5$	$(49\pm4)\times10^7$
K-9	$(44\pm2)\times10^6$	$(8\pm1)\times10^7$	$(36\pm10)\times10^5$	$(42\pm3)\times10^7$
K-10	$(41\pm4)\times10^6$	$(1\pm1)\times10^7$	$(31\pm6)\times10^5$	$(4\pm0)\times10^7$
K-11	$(41\pm6)\times10^6$	$(3\pm0)\times10^7$	$(46\pm2)\times10^5$	$(4\pm1)\times10^7$
K-12	$(35\pm5)\times10^6$	$(2\pm1)\times10^7$	$(30\pm4)\times10^5$	$(28\pm8)\times10^7$

Tablodaki değerler, (ortalama ± standart sapma) olarak verilmiştir. **I**: MF-1 ve C-37 A bakterilerinin katı formülasona ilavesi sonrası, **II**: MF-1 ve C-37 A bakterilerinin katı taşıyıcıya ilavesinin ardından 48 Saat inkübasyon sonrası, **III**: TV-6F ve TV17C bakterilerinin spor formlarının katı taşıyıcıya eklenip 50°C 1 gün kurutulması sonrası, **IV**: Aynı taşıyıcıları içeren formülasyonların karıştırılıp 30°C' de 1 gün kurutulması sonrası.

Tablo 17'de elde edilen verilere göre, katı taşıyıcılı formülasyonların oluşturulması sonrası en yüksek bakteri içeriğine sahip formülayonların en yükseği ve en düşüğü sırasıyla, K-6 ve K-10 olmuştur. En yüksek bakteri içeriğine sahip K-6 formülasyonu yaklaşık $1{,}6\times10^9$ kob/gr, en düşük bakteri içeriğine sahip K-10 formülasyonu ise yaklaşık 4×10^7 olarak belirlenmiştir. Ortalama olarak çoğu katı taşıyıcılı formülasyonun 1 gramında 5×10^8 bakteri içeriği olduğu belirlenmiştir. Tüm üretim aşamalarında sayımları yapılan formülasyonların petri görüntüleri Şekil 24'de verilmiştir.

Form* No	Formülasyonların Farklı Üretim Aşamaları			
	I	II	III	IV
K-1				
K-2				
K-3				
K-4				
K-5				
K-6				
K-7				
K-8				
K-9				
K-10				
K-11				
K-12				

Şekil 24. Katı taşıyıcılı formülasyonların farklı üretimi aşamasındaki sayım sonucu petri görüntüleri

I: MF-1 ve C-37 A bakterilerinin katı formülasona ilavesi sonrası, **II**: MF-1 ve C-37 A bakterilerinin katı taşıyıcıya ilavesinin ardından 48 Saat inkübason sonrası, **III**: TV-6F ve TV17C bakterilerinin spor formlarının katı taşıyıcıya eklenip 50°C 1 gün kurutulması sonrası, **IV**: Aynı taşıyıcıları içeren formülasyonların karıştırılıp 30°C' de 1 gün kurutulması sonrası, *: Formülasyon

Şekil 24'de, I. ve II. aşamada bulununa MF-1 ve C-37A izolatlarının, III. aşamada TV-6F ve TV-17C izolatlarının, IV. aşamada tüm bakterilerin petri görüntüleri verilmiştir.

Sera Çalışması Sonuçları

Formülasyonların dört dozda bitkiye uygulanması sonuçları

Oluşturulan 12 farklı katı taşıyıcılı formülasyonun 4 farklı dozunun (1/1000, 1/500, 1/330, 1/250) hıyarda kök ve gövde çürüklüğü etmeni ET 46 fungusuyla beraber bitkiye uygulanma sonrası hastalık şiddeti sonuçları Tablo 18'de verilmiştir. Pozitif kontrol ilaç uygulamasından ve negatif kontrol ise ilaç ya da bakteri uygulaması yapılmayan uygulamalardan oluşmuştur. Hastalık değerlendirmesi 0-5 skalasına göre yapılmıştır (Liu *et al.*

1995). Çalışmada kullanılan hastalık skalası kendi bitkilerimizden oluşturulmuş ve değerlendirme bu skalaya göre yapılmıştır (Şekil 25).

Tablo 18. Formülasyonların dört dozda bitkiye uygulanması hastalık şiddeti sonuçları

Uygulamalar		Hastalık Şiddeti Değerleri				
		1. Doz[1]	**2. Doz[2]**	**3. Doz[3]**	**4. Doz[4]**	**Ortalama**
Formülasyon Uygulamaları	**K-1** (+ET 46)	**2,33 ABC**	**2,00 A**	**2,00 A**	**1,33 A**	**1,92 A**
	K-2 (+ET 46)	3,00 ABC	4,00 BC	3,33 ABC	2,33 ABC	3,17 BCD
	K-3 (+ET 46)	2,00 AB	2,67 AB	4,00 BCD	3,00 BCDE	2,92 BC
	K-4 (+ET 46)	3,67 BCD	3,67 BC	3,67 BCD	4,00 DEF	3,75 CDE
	K-5 (+ET 46)	3,67 BCD	2,67 AB	2,67 AB	3,00 BCDE	3,00 BC
	K-6 (+ET 46)	4,00 CD	2,00 A	3,00 ABC	3,33 BCDE	3,08 BC
	K-7 (+ET 46)	4,00 CD	3,67 BC	4,33 CD	4,33 EF	4,08 DEF
	K-8 (+ET 46)	5,00 D	4,00 BC	4,00 BCD	3,67 CDEF	4,17 EF
	K-9 (+ET 46)	4,00 CD	4,33 C	3,33 ABC	3,33 BCDE	3,75 CDE
	K-10 (+ET 46)	3,00 ABC	3,67 BC	2,67 AB	3,33 BCDE	3,17 BCD
	K-11 (+ET 46)	**1,33 A**	**2,00 A**	**2,00 A**	**2,00 AB**	**1,83 A**
	K-12 (+ET 46)	4,00 CD	2,67 AB	3,67 BCD	4,00 DEF	3,58 BCDE
Kontrol Uygulamaları	**Negatif Kontrol** (ET 46)	5,00 D	5,00 C	5,00 D	5,00 F	5,00 F
	Pozitif Kontrol (ET 46+İlaç)	2,67 ABC	2,67 AB	2,67 AB	2,67 ABCD	2,67 AB
	CV	**34.15**	**29.02**	**27.70**	**29.05**	**17.68**
	LSD	**1.95**	**1.57**	**1.54**	**1.58**	**0.98**

Aynı sütunda benzer harflerle ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p<0.01$), (**1. Doz:** 1/1000, **2. Doz:** 1/500, **3. Doz:** 1/330, **4. Doz:** 1/250).

Seranın uygulamaya ayrılan bölümünde beyaz sinek hastalığı ile karşılaşılmış ne kadar mücadele edilse de başarılı olunamamıştır. Bu olumsuz şartlara rağmen hastalık şiddeti açısından çoğu katı taşıyıcılı formülasyonlarımız pozitif kontrol uygulamasına göre daha etkili bulunmuştur. K-1 formülasyonu 4. doz ve K-11 formülasyonu 1. doz hastalık şiddeti değerleri 1,33 olarak bulunmuş ve en düşük hastalık şiddetine sahip uygulmalar olarak tespit edilmiştir. Bu formülasyonları takiben 1. doz uygulamarında K-3, 2. doz uygulamalarında K-1, K-6, K-11, 3.doz uygulamarında K-1, K-11 ve 4. doz uygulamalarında K-11 formülasyonları hastalık şiddeti 2,0 olarak bulunmuş hastalığa karşı ikinci en etkili formülasyon dozları olarak belirlenmiştir. Formülasyonların 4 dozunun ortalaması alındığında en etkili dozlar yine K-1 ve K-11 olarak bulunmuştur. Pozitif kontrol hastalık şiddeti 2,67 ve negatif kontrol hastalık şiddeti tüm bitkiler öldüğü için 5 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 25. Sera çalışmalar için oluşturulan hastalık skalası

Uygulama Adı	Bitki Uygulama Zamanları	
	Uygulamanın Hemen Sonrası	Uygulamadan 14 Gün Sonra
Negatif Kontrol (ET 46)		
Pozitif Kontrol (ET 46 +İlaç)		
K-1 4. Doz (+ET 46)		
K-11 1. Doz (+ET 46)		

Şekil 26. Hıyar bitkisinde ET 46 fungusunun oluşturduğu hastalık şiddetine etkili olan formülasyonların görüntüsü

Şekil 26'da negatif kontrol, pozitif kontrol, K-1 ve K-11 uygulamalarının saksı görüntüleri gösterilmiştir. Negatif kontrol uygulamasındaki bitkilerin 14 gün sonra tamamen öldüğü, pozitif kontrol uygulamasanın da formülasyon uygulamalarına göre hastalıktan daha çok etkilendiği görülmektedir.

Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması sonuçları

Çalışmanın birinci aşamasında, hastalığa karşı en etkin olduğu belirlenen K-1 formülasyonunun 4. dozu, K-11 formülasyonunun 1. dozu, pozitif kontrol ve negatif kontrol ET 46 fungusunun oluşturduğu hıyarda kök ve gövde çürüklüğü hastalığına karşı test edilmiş

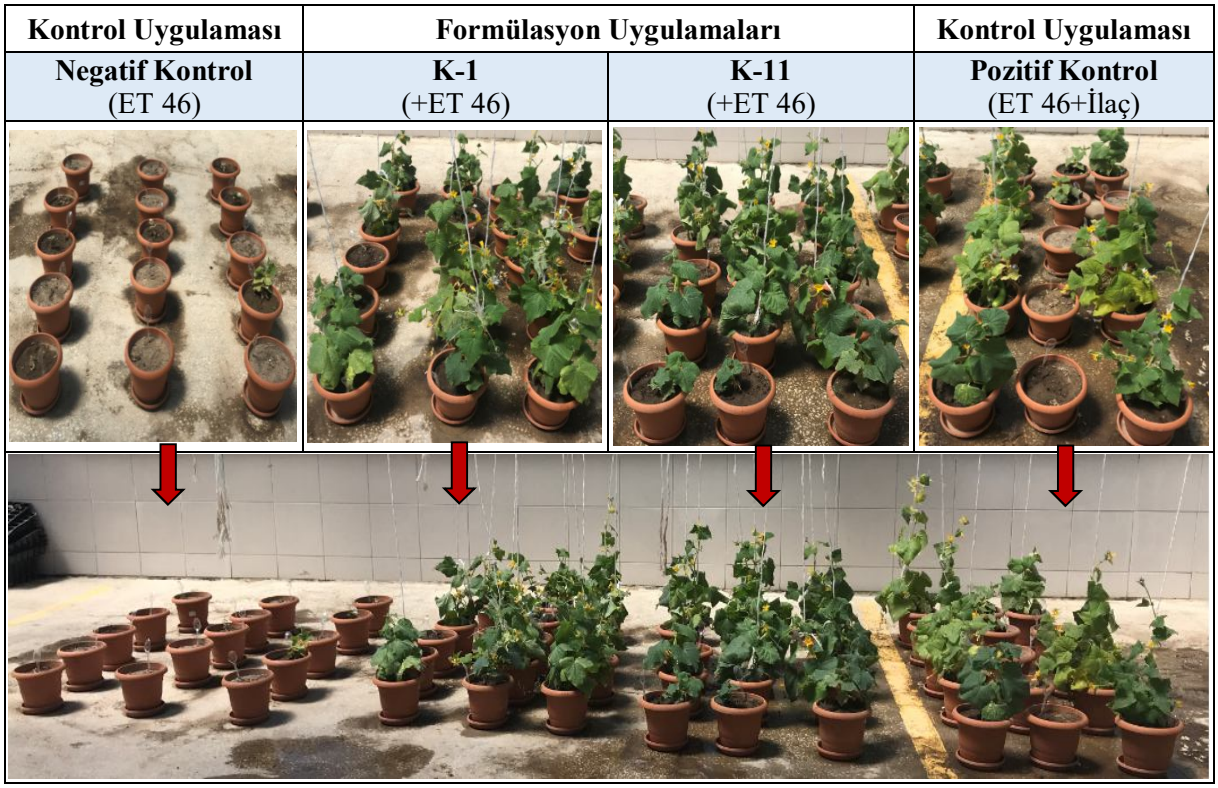
ve sonuçları Tablo 19'da verilmiştir. Hastalık değerlendirmesi 0-5 skalasına göre yapılmış (Liu *et al.* 1995), kendi oluşturduğumuz hastalık skalası kullanılmıştır (Şekil 25).

Tablo 19. Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması hastalık şiddeti sonuçları

Uygulamalar		**Hastalık Şiddeti**
Kontrol Uygulamaları	**Pozitif Kontrol** (ET 46+İlaç)	2,41
	Negatif Kontrol (ET 46)	4,8
Formülasyon Uygulamaları	**K-1** (+ET 46)	2,13
	K-11 (+ET 46)	1,47
	CV	**46.56**
	LSD	**ÖS**

ÖS: İstatistiksel olarak önemsiz sonuç.

Tablo 19'a göre en düşük hastalık şiddeti görülen uygulamalar sırasıyla K-11, K-1 formülasyonları ve pozitif kontrol olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak fark bulunmamasına karşın, hastalığa karşı en etkili formülasyon 1,47 hastalık şiddeti ile K-11, ikinci en etkili hastalık şiddeti 2,13 ile K-1 formülasyonu olmuştur. Pozitif kontrol ilaç uygulamasının hastalık şiddeti, formülasyon uygulamalarından daha yüksek olarak 2,41 değerinde bulunmuştur. Şekil 27'de, hastalık şideti değerlendirmesinin yapıldığı hıyar bitkilerinin saksı görüntüleri tek tek ve toplu olarak verilmiştir.



Şekil 27. Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması sonuç görüntüsü

Bitki ve Yetiştirme Ortamı Analiz Sonuçları

Bitki büyüme parametre sonuçları

Bitki gövde özelliklerinin sonuçları

Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması sonucu bitki gövde parametreleri ölçülmüş ve sonuçları Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. Bitki gövde özelliklerinin sonuçları

Bitki Parametreleri	Kontrol Uygulamaları		Formülasyon Uygulamaları		CV	LSD
	Negatif Kontrol (ET 46)	**Pozitif Kontrol** (ET 46+İlaç)	**K-1** (+ET 46)	**K-11** (+ET 46)		
Bitki boyu (mm)	-	36,33 B	49,67 AB	**65,33 A**	**22.23**	**25.42**
Yaprak sayısı (adet)	-	11,67 B	22,67 A	**24,33 A**	**16,79**	**7,44**
Yaprak alanı (cm^2)	-	593,36 B	**2145,91 A**	1579,12 AB	**24,25**	**1117,69**
Yaprak yaş ağırlığı (g)	-	11,61 B	**37,77 A**	33,13 A	**24,34**	**15,18**
Yaprak kuru ağırlığı (g)	-	2,82 B	**8,62 A**	7, 27 A	**22,77**	**3,22**
Gövde çapı (mm)	-	6,79 B	**10,12 A**	9,57 A	**12,16**	**1,64**
Gövde yaş ağırlığı (g)	-	12,00 B	35,33 A	**36,00 A**	**24,71**	**15,56**
Gövde kuru ağırlığı (g)	-	1,05 B	3,51 A	**3,64 A**	**26,51**	**1,64**
Çiçeklenme süresi (gün)	-	4,00 C	**5,00 B**	3,33 A	**8,11**	**0,76**

Aynı satırda benzer harflerle ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p<0.01$), **ÖS:** İstatistiksel olarak önemsiz sonuç, **Negatif Kontrol;** Bu kontrol grubundaki bitkiler öldüğü için analiz yapılamamıştır.

İstatistiksel açıdan bitki boyu, yaprak sayısı, yaprak alanı, yaprak yaş ağırlığı, yaprak kuru ağırlığı, gövde çapı, ortalama, gövde yaş ağırlığı, gövde kuru ağırlığı, bitki büyüme parametrelerinde önemli farklar olduğu tespit edilmiştir. Bitki büyüme parametrelerinden en yüksek; yaprak alanı (2145,91cm^2), yaprak yaş ağırlığı (37,77 g), yaprak kuru ağırlığı (8,62 g) ve gövde çapı (10,12 mm) değerleri K-1 uygulamasında belirlenmiştir. Bitki boyu (65,33mm), yaprak sayısı (24,33 adet), gövde yaş ağırlığı (36 g) ve gövde kuru ağırlığı (3.64 g)'nda ise en yüksek değerler K-11 formülasyon uygulamasında belirlenmiş ve aynı zamanda çiçeklenme süresi 3,33 gün ile en hızlı çiçek veren uygulama olmuştur. Pozitif kontrol olan ilaç uygulamasının ise bitki büyüme parametrelerinde formülasyon uygulamalarına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Bitki kök özelliklerinin sonuçları

Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması sonucu bitki kök parametreleri ölçülmüş ve sonuçları Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. Bitki kök özelliklerinin sonuçları

Bitki Parametreleri	Kontrol Uygulamaları		Formülasyon Uygulamaları		CV	LSD
	Negatif Kontrol (ET 46)	**Pozitif Kontrol** (ET 46+İlaç)	**K-1** (+ET 46)	**K-11** (+ET 46)		
Ortalama kök uzunluğu (mm)	-	28,00	27,67	**30,17**	**15,38**	**ÖS**
Ortalama kök çapı (mm)	-	1,85 B	3,83 AB	**4,17 A**	**30,50**	**2,27**
Ortalama kök gövde çapı (mm)	-	6,51 B	**10,28 A**	8,82 AB	**17,63**	**3,41**
Kök yaş ağırlığı (g)	-	9,40 B	**26,19 A**	15,40 AB	**35,71**	**13,76**
Kök kuru ağırlığı (g)	-	1,10	**3,32**	2,17	**47,71**	**ÖS**

Aynı satırda benzer harflerle ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p<0.01$), **ÖS:** İstatistiksel olarak önemsiz sonuç, **Negatif Kontrol;** Bu kontrol grubundaki bitkiler öldüğü için analiz yapılamamıştır.

Bitki uygulamaları sonucu bitki kök parametreleri ölçülmüş ve ortalama kök uzunluğu ve kök kuru ağırlığı parametrelerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Ortalama kök çapı (4,17 mm) parametresi en yüksek K-11 uygulamasında tespit edilmişken, ortalama kök gövde çapı (10,28 mm), kök yaş ağırlığı (26, 19 g) ve kök kuru ağırlığı (3,32 g) parametreleri ise en yüksek K-1 formülasyonunda belirlenmiştir. Bitki kök özellikleri sonuçlarına göre en düşük değerler pozitif kontrol ilaç uygulamasında saptanmıştır. Uygulamaların kök fotoğraları Şekil 28'de verilmiştir.

Kontrol Uygulamaları	**Formülasyon Uygulamaları**	
Pozitif Kontrol (ET 46+İlaç)	**K-1** (+ET 46)	**K-11** (+ET 46)
		

Şekil 28. Pozitif kontrol, K-1 ve K-11 uygulamalarının kök gelişimine etkisi
Pozitif Kontrol; İlaç+fungus uygulaması, **K-1 ve K-11;** Bakteri+fungus uygulamaları.

İki formülasyon uygulamasının kök gelişimine etkisi pozitif kontrole oranla çok daha yüksek bulunmuştur. Bitki kök uzunluğu ölçümlerinde ise pozitif kontrol farkın bulunmadığı görülmüştür.

Bitki yaprağında besin elementi analizi sonuçları

Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması sonucu bitki yaprağındaki besin element içeriğine bakılmış ve sonuçları aşağıdaki Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22. Bitki yaprağında besin elementi analiz sonuçları

Besin Elementleri	Kontrol Uygulamaları		Formülasyon Uygulamaları		CV	LSD
	Negatif Kontrol (ET 46)	Pozitif Kontrol (ET 46+İlaç)	K-1 (+ET 46)	K-11 (+ET 46)		
Toplam N (%)	-	2,33B	3,02A	2,86A	**5,62**	**0,33**
P (%)	-	0,23B	0,31A	0,3A	**6,26**	**0,04**
K (%)	-	1,67B	2,38A	2,13A	**31,95**	**0,35**
Ca (%)	-	1,2	1,38	1,26	**6,04**	**ÖS**
Mg (%)	-	0,19B	0,29A	0,3A	**7,12**	**0,04**
Na (ppm)	-	171,34B	216,34A	212,64A	**6,93**	**29,48**
Zn (ppm)	-	17,22	16,87	19,73	**10,59**	**ÖS**
Fe (ppm)	-	69,27B	90,18A	89,55A	**6,16**	**10,94**
Mn (ppm)	-	22,46B	32,7A	30,58AB	**12,16**	**7,46**

Aynı satırda benzer harflerle ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p<0.01$), **ÖS:** İstatistiksel olarak önemsiz sonuç, **Negatif Kontrol;** Bu kontrol grubundaki bitkiler öldüğü için analiz yapılamamıştır.

Bu tez kapsamında yapılan bitkilerin yapraklarında yapılan bitki besin element analiz sonuçlarına göre N, P, K, Mg, Na, Fe ve Mn elementleri istatistiksel olarak önemli farklar olduğu belirlenmiştir. Ca ve Zn elementlerinde istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür. N, P, K, Mg, Na, Fe en yüksek orana sahip elementler istatistiksel açıdan K-1 ve K-11 formülasyonlarında görülmüştür. P ve Mn elementi en yüksek orana K-1 formülasyonunda ulaşırken, pozitif kontrol ilaç uygulaması tüm besin elemetlerinde en düşük orana sahip olduğu görülmüştür.

Bitki yaprağında antioksidan enzim aktivitelerinin sonuçları

Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması sonucu bitki yaprakraklarında savunma mekanizmasında görevli antioksidan enzim aktivitelerine bakılmış ve sonuçları Tablo 23'de verilmiştir.

Tablo 23. Bitki yaprağında antioksidan enzim aktivitelerinin sonuçları

Uygulamalar		Enzimler (EU/mg protein)[1]			
		POX[2]	**CAT[3]**	**PPO[4]**	**SOD[5]**
Kontrol Uygulamaları	**Negatif Kontrol** (ET 46)	-	-	-	-
	Pozitif Kontrol (ET 46+İlaç)	130,90 A	6,73 AB	46,89 A	2,19
Formülasyon Uygulamaları	**K-1** (+ET 46)	144,35A	7,64 A	22,11 B	1,82
	K-11 (+ET 46)	81,45 B	5,61 B	29, 86 B	2,06
	CV	**13.30**	**10.13**	**19.91**	**12,45**
	LSD	**35.82**	**1.53**	**14.87**	**ÖS**

Aynı sütunda benzer harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur (P<0.01), **[1]:** Enzim unitesi/miligram protein, **[2]:** Guaiakol Peroksidaz, **[3]:** Katalaz, **[4]:** Polifenol Oksidaz **[5]:** Superoksit dismutaz, **ÖS:** İstatistiksel olarak önemsiz sonuç, **Negatif Kontrol;** Bu kontrol grubundaki bitkiler öldüğü için analiz yapılamamıştır.

Guaiakol peroksidaz (POX), katalaz (CAT), polifenol oksidaz (PPO) aktiviteleri yapılan istatistik analiz sonucunda önemli farkların olduğu belirlenmiştir. POX enziminde en yüksek aktiviteler 144 EU/mg protein ile K-1 ve 130,90 EU/mg protein ile pozitif kontrol ilaç uygulamasında belirlenmiştir. CAT enziminde en yüksek aktivite değerine 7,64 EU/mg protein ile K-1'de ulaşılmıştır. PPO enzim aktivitesi en yüksek değeri 46,89 EU/mg protein ile pozitif kontorlde görülmüştür. Süperoksit dismutaz (SOD) enziminde istatistiksel açıdan fark bulunmamıştır.

Yetiştirme ortamı besin elementi analizi sonuçları

Formülasyonların seçilen dozlarda bitkiye uygulanması sonucu bitkilerin yetiştirme ortamlarında yapılan besin element sonuçları Tablo 24'de verilmiştir.

Tablo 24. Yetiştirme ortamı besin elementi analizi sonuçları

Besin Elementleri	Kontrol Uygulamaları		Formülasyon Uygulamaları		CV	LSD
	Kontrol	Pozitif Kontrol (ET 46+İlaç)	K-1 (+ET 46)	K-11 (+ET 46)		
Toplam N (%)	0,05	0,05	0,06	0,06	**ÖS**	**ÖS**
P (%)	4,88	4,82	5,25	5,14	**ÖS**	**ÖS**
K (%)	244,06AB	237,04B	258,08A	252,71AB	**4,38**	**20,41**
Ca (%)	1939,11	1912,94	2107,72	2064,15	**ÖS**	**ÖS**
Mg (%)	107,69	106,56	116,01	113,6	**ÖS**	**ÖS**
Na (ppm)	23,27	23	24,96	24,44	**ÖS**	**ÖS**
Zn (ppm)	0,24B	0,26B	0,36A	0,35A	**7,55**	**0,04**
Fe (ppm)	5,33	5,18	5,64	5,53	**ÖS**	**ÖS**
Mn (ppm)	0,26	0,26	0,28	0,28	**ÖS**	**ÖS**

Aynı satırda benzer harflerle ifade edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p<0.01$), **Kontrol;** hiçbir uygulama yapılmamış yetiştirme ortamı, **ÖS:** İstatistiksel olarak önemsiz sonuç.

Yetiştirme ortamı besin elementi analiz sonuçlarına göre K ve Zn elementlerinde istatistiksel olarak önemli farklar olduğu belirlenmiştir. K elementi en yüksek K-1 uygulaması yapılan toprakta belirlenmiştir. Toplam N, P, Ca, Mg, Fe ve Mn elemetlerinde istatistiksel açıdan önemli farklar olmadığı bulunmuştur. Toprakta bulunan elementlerde pozitif kontrol ilaç uygulaması değerlerinin kontrol uygulamasına göre azaldığı, K-1 ve K-11 formülasyonlarında ise negatif kontrole göre artış gösterdiği belirlenmiştir.

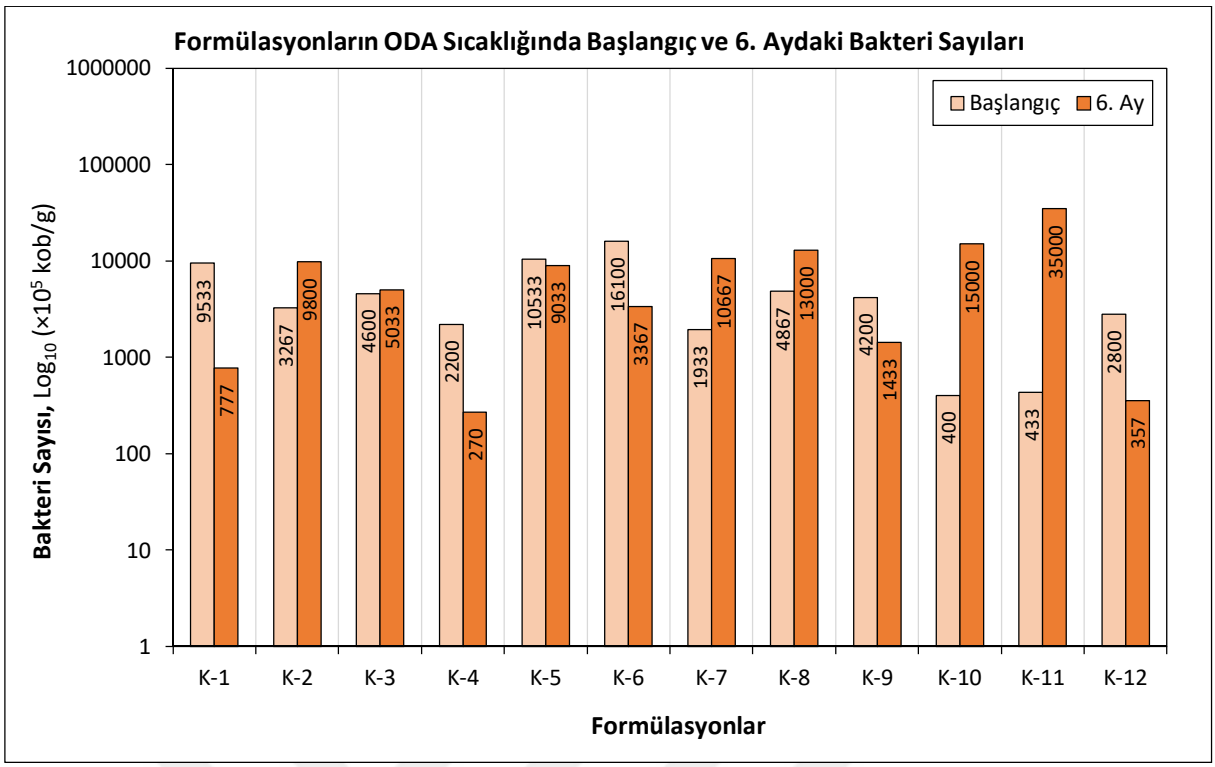
Katı Taşıyıcılı Formülasyonların Raf Ömrü Sonuçları

Oda sıcaklığı ve buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilen formülasyonların 6 aylık sayım sonuçları Tablo 25' de verilmiştir. Bu sayım sonuçlarına göre 6. ayın sonunda oda sıcaklığında muhafaza edilen en yüksek bakteri içeriğine sahip formülasyon K-11 formülasyonu olmuştur. K-11 formülasyonunun oda sıcaklığındaki 6. ay bakteri sayısı $3,5\times10^9$ kob/gr olarak belirlenmiştir. 6. ay sonucu buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilen $8,9\times10^9$ kob/gr bakteri içeriği ile en yüksek değer K-3 formülasyonunun olmuştur. Oda sıcaklığı muhafaza şartları altında yaklaşık 10^9 kob/gr bakteri miktarına sahip formülasyonlar; K-2, K-7, K-8, K-10 olarak, yaklaşık 10^8 kob/gr bakteri miktarına sahip formülasyonlar; K-3, K-5, K-6, K-9 olarak, yaklaşık 10^7 kob/gr bakteri miktarına sahip formülasyonlar; K-1, K-4 ve K-12 olarak belirlenmiştir. Buzdolabı sıcaklığı muhafaza şartları altında genel olarak formülasyonların bakteri sayıları daha yüksek bulunmuştur.

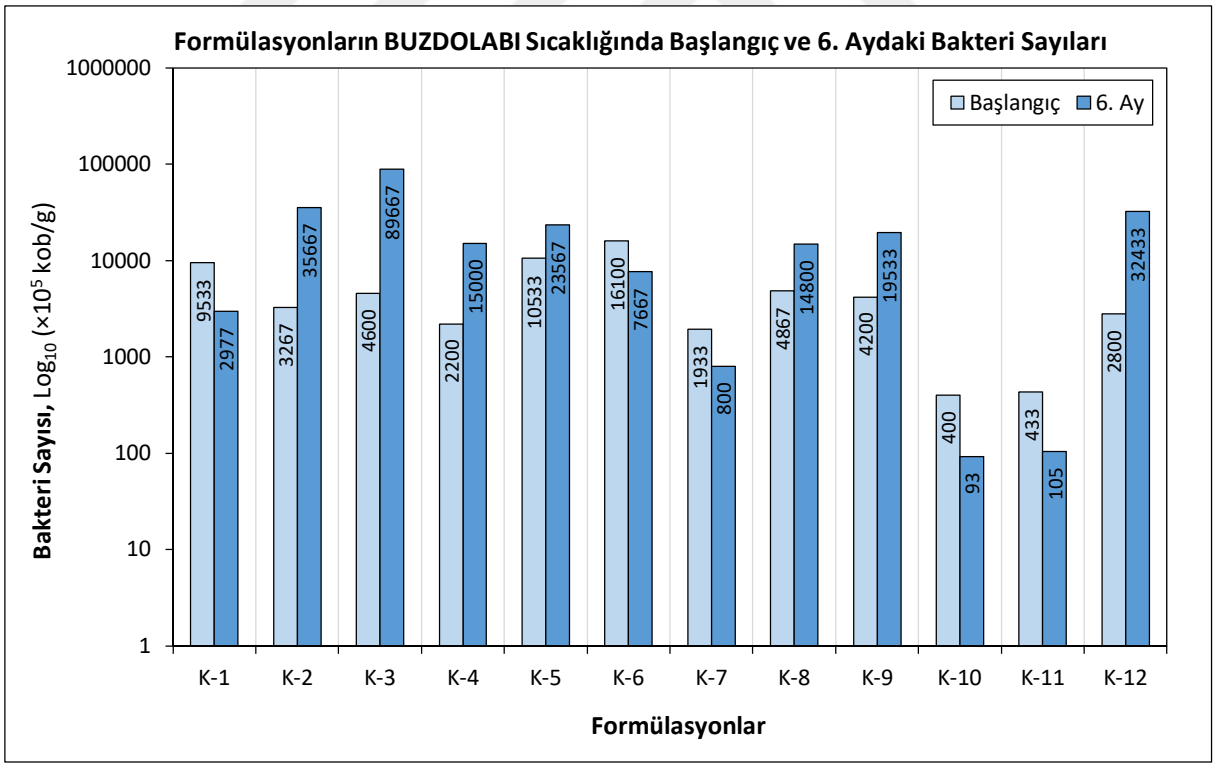
Buzdolabı sıcaklığı muhafaza şartları altında yaklaşık 10^9 kob/gr bakteri miktarına sahip formülasyonlar;K-2, K-4, K-5, K-8, K-9, K-12 olarak, yaklaşık 10^8 kob/gr bakteri miktarına sahip formülasyonlar; K-1, K-6 olarak, yaklaşık 10^7 kob/gr bakteri miktarına sahip formülasyonlar; K-7, K-10, K-11 olarak belirlenmiştir. İkinci bitki uygulamasında kullanılan K-1 formülasyonu en yüksek bakteri içeriği $2{,}9\times10^8$ kob/gr olarak buzdolabı sıcaklığında, K-11 formülasyonu en yüksek bakteri içeriği $3{,}5\times10^9$ kob/gr oda sıcaklığında olduğu belirlenmiştir. 6. ay formülasyonlarının oda ve buzdolabı sıcaklığında 6. ay formülasyon sayımlarının bir arada olduğu grafikler Şekil 29 ve Şekil 30'da verilmiştir.

Tablo 25. Katı taşıyıcılı formülasyonların oda ve buzdolabı sıcaklığındaki raf ömürleri

Formü-lasyon	Koloni Oluşturan Bakteri Sayısı (×10^5 kob/g)													
	Başlangıç		1. Ay		2. Ay		3. Ay		4. Ay		5. Ay		6. Ay	
	Oda	Buzdolabı	Oda	Buzdolabı	Oda	Buzdolabı	Oda	Buzdolabı	Oda	Buzdolabı	Oda	Buzdolabı	Oda	Buzdolabı
K-1	9.533	9.533	79.333	52.000	130.000	1.933	21.667	933	45.333	5.867	733	800	777	2.977
K-2	3.267	3.267	23.000	26.533	127.000	42.300	25.000	12.667	21.000	49.667	19.467	46.333	9.800	35.667
K-3	4.600	4.600	285.333	13.600	78.333	46.233	62.000	107.667	68.667	93.000	16.667	75.333	5.033	89.667
K-4	2.200	2.200	47.333	1.667	43.667	43.300	23.667	207	38.000	2.817	500	10.467	270	15.000
K-5	10.533	10.533	88.000	40.133	18.667	79.667	6.667	26.333	34.167	48.333	17.000	21.467	9.033	23.567
K-6	16.100	16.100	43.100	26.233	21.333	44.333	8.067	570	12.833	10.700	533	20.167	3.367	7.667
K-7	1.933	1.933	47.233	5.867	85.000	2.000	139.333	1.167	48.333	823	27.333	683	10.667	800
K-8	4.867	4.867	50.333	16.267	12.333	31.200	75.667	50.667	58.667	68.667	19.333	683	13.000	14.800
K-9	4.200	4.200	12.333	37.100	102.333	13.667	10.667	780	5.000	623	2.633	10.453	1.433	19.533
K-10	400	400	6	143	26.567	223	69.000	113	40.667	107	43.667	150	15.000	93
K-11	433	433	4	299	19.100	477	123.000	1.067	46.000	170	34.000	140	35.000	105
K-12	2.800	2.800	20.767	17.333	47.667	527	24.333	177	13.333	442	767	10.640	357	32.433



Şekil 29. Katı taşıyıcılı formülasyonların oda sıcaklığında başlangıç ve 6. aydaki bakteri sayıları



Şekil 30. Katı taşıyıcılı formülasyonların buzdolabı sıcaklığında başlangıç ve 6. aydaki bakteri sayıları

TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikroorganizmalar; gıda, tarım, çevre, endüstri ve enzim üretimi olmak üzere pek çok alanda AR-GE çalışmaları başta olmak üzere, ekonomik ve pratik olarak biyoteknolojiye hizmet veren biyolojik sistemlerdir. Günümüz biyoteknolojisi, biyokontrolde mikroorganizmaları özellikle de bakterileri kullanarak biyoproseslerin gelişimini ve tarımsal alanda uygulamaya aktarılmasını desteklemektedir. Tarımsal faaliyetlerde her geçen yıl daha fazla tarımsal ürün elde etmek için bitki hastalık ve zararlıları ile mücadelede hala yoğun bir şekilde kimyasallar kullanılmaktadır. Kullanılan kimyasalların çevreye, insan ve hayvan sağlığına verdiği potansiyel zarar nedeniyle, tarımda zararlı öldürücü bileşiklerin kullanımını engellemek veya azaltmak için yeni stratejiler geliştirilmektedir. Bu stratejilerden biri olan biyolojik mücadele stres koşullarının olumsuz etkilerini azaltmak, bitki gelişimini düzenlemek ve bitki hastalık ve zararlılarını kontrol etmek gibi özelliklere sahip olması nedeniyle her geçen gün popülerliği artan bir mücadele yöntemidir.

Bu çalışmada; biyoajan bakteriler kullanılarak katı taşıyıcılı formülasyon geliştirilmiş hıyarda kök ve gövde çürüklüğü hastalığının kontrolündeki etki mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmış ve bu potansiyel biyoajanların bitki gelişimi üzerine etkisi belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan bakteriler *P. chlororaphis* (MF-1 ve C37-A) ve *B. subtilis* (TV-6F ve TV-17C) izolatları daha önce yürütülen farklı çalışmalardaki etkinlikleri de dikkate alınarak hıyar kök ve gövde çürüklüğü hastalığını önemli oranda kontrol etmelerinin yanısıra, bitki gelişimi ve verim üzerine olumlu etkileri sebebiyle biyolojik mücadelede avantajlı olabileceği düşünülerek seçilmiştir. Bu bakterilerin, *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* ET 46 fungusuna karşı antifungal aktivitesine NA ve PDA ortamında bakılmış ve yüzde engelleme oranları NA'da MF-1, C-37A, TV-17C ve TV-6F için sırasıyla %50,5, %43,5, %41,1 ve %41,1 PDA'da C-37A, MF-1, TV-17C ve TV-6F için sırasıyla %35,2, %34,1, %31,7 ve %31,7 olarak ölçülmüştür. Her iki ortam dikkate alındığında MF-1 izolatı NA ortamında C-37A izolatı ise PDA ortamında ET 46 fungusuna karşı yüksek etkinlik göstermiştir.

Daha önce yürütülen bazı çalışmalarda da bu izolatların fungal bitki patojenlerine karşı etkili oldukları görülmüştür. *B. subtilis* TV-6F ve *B. subtilis* TV-17C izolatlarının in vitro koşullarda *Alternaria alternata, Penicillium digitatum, Sclerotinia sclerotiorum, P. ultimum,* ve *P. italicum*'a karşı antifungal aktivitelerinin olduğu görülmüştür. Ayrıca depo koşullarında bu bakteri izolatlarının mandalina meyvelerinde doğal inokulasyonlar ile oluşabilecek hastalık

şiddetini de önemli ölçüde azalttıkları görülmüştür (Tozlu *et al*. 2019). Domateste *A. alternata*'ya karşı patojen fungusun gelişimini engelleyen en etkili izolatlar arasında *B. subtilis* TV-6F'nin olduğu ve etkinliğinin %78,57 düzeyinde olduğu belirtilmiştir (Tekiner *et al*. 2019a). Tekiner *et al.* (2019b)'nin yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise *B. subtilis* TV-6F ve *B. subtilis* TV-17C izolatlarının in vitro koşullarda hasat öncesi ayvada önemli kayıplara sebep olan Alternaria çürüklüğüne sebep olan patojen fungusa karşı önemli antifungal etki gösterdikleri belirlenmiştir. *Colletotrichum gloesporoides*'in in vitro koşullarda mikrobiyal antagonistlerle mücadele edilebilirliğinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise; içlerinde *B. subtilis* TV-6F ve *B. subtilis* TV-17C izolatlarının da bulunduğu toplam 9 adet biyoajan bakteri izolatı kullanılmış tüm mikrobiyal antagonistlerin in vitro şartlarda patojen fungusun gelişimini engellediği belirlenmiştir (Tekiner *et al.* 2019c). Aynı patojene karşı yürütülen bir diğer çalışmada ise *B. subtilis* TV-6F izolatının % 95 oranında etkili olduğu tespit edilmiştir (Tekiner *et al.* 2018a). Toplam 13 adet biyoajan bakteri ve *T. harzianum* türüne ait toplam 2 fungus izolatının in vitro şartlarda *A. solani*'ye karşı etkililiği test edilmiştir. *B. subtilis* TV-6F ve *B. subtilis* TV-17C izolatlarının bu patojene karşı biyolojik mücadelede biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Çamlıca ve Tozlu 2019). Tekiner *et al.* (2018b), narda *Coniella granati*'ye karşı in vitro şartlarda patojene karşı antagonistik aktivitelerini test etmiş, araştırma sonucunda *B. cereus* TV-85D izolatının %66 etkinlikle en etkili izolat olduğu bunu sırasıyla %64 etkinlikle *B. substilis* TV-17C ve %60 etkinlikle *B. substilis* TV-6F izolatının takip ettiğini belirtmiştir. Kırmızı lahanada *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary'ye karşı yürütülen bir diğer biyolojik mücadele çalışmasında ise; *B. subtilis* TV-17C ve TV-6F strainlerinin hem in vitroda hem de in vivoda etkili olduğu belirtilmiştir (Tozlu *et al.* 2016). Kapya biberde önemli kayıplara neden olan *F. proliferatum*'un mücadelesinde *P. chlororaphis* FDG-37 izolatının in vivo koşullarda %70 oranında hastalık gelişimi üzerine etkili olduğu belirtilmiştir (Şahinoğlu ve Tozlu 2019). Bir diğer çalışmada; *P. chlororaphis* FDG-37'nın patlıcan fidelerinde büyük verim kayıplarına neden olan *B. cinerea*'ya karşı in vivo şartlarda etkili olduğu tespit edilmiştir (Akça and Tozlu 2019). Yine *P. chlororaphis* FDG-37 izolatının kullanıldığı bir diğer çalışmada da havuçta *Geotrichum candidum* ile mücadelede bu bakterinin biyoajan olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Tozlu 2016). Bu çalışmada kullanılan biyoajan bakterilerin daha önceki çalışma sonuçlarına göre farklı patojen gruplarına karşı çok geniş spektrumlu etkinliğe sahip olması, oluşturulan formülasyonların kullanım alanlarını arttırmakta ve gelecekte yapılacak olan ruhsatlama çalışmaları için önemli bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

16s rDNA, bakteriyel filogenetik ve sınıflandırmada önemli bir rol oynar. Bu nedenle, farklı türler arasında yüksek oranda korunduğu için prokaryotların filogenetik çalışmalarında güvenilir bir moleküler belirteç olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple bakteri izolatlarına 16s

rDNA dizi analizi yapılmıştır. Bu analize göre MF-1 ve C-37A izolatları *Pseudomonas chlororaphis,* TV-6F ve TV-17C izolatları *Bacillus subtilis* olarak tanılanmıştır.

Mantarların hücre duvarlarının temel yapı bileşeni olan kitini parçalama yeteneğine sahip kitinaz enzimleri, bitki patojeni olan mantarlara karşı fungusit olarak biyolojik amaçlı kullanılabilmektedir. Yürütülen pek çok çalışmada kitinaz enzim aktivitesinin antifungal aktivitede önemli olduğu vurgulanmıştır (Şenol 2014). Bu nedenle çalışmada kullanılan MF-1, C-37A, TV-6F ve TV-17C izolatlarının kitinaz enzim aktiviteleri belirlenmiş ve aktivite aralığı 0,159-0,277 EU/ml olarak bulunmuştur. En yüksek aktiviteden başlayarak sırasıyla MF-1 (0,277 EU/ml), C-37A (0,265 EU/ml), TV-6F (0,173 EU/ml) ve TV-17C (0,159 EU/ml) olarak ölçülmüştür. Antifungal etkinlik ve kitinaz aktivitesi dikkate alındığında, en yüksek antifungal etkinliği gösteren MF-1 ve C-37A bakterilerinin kitinaz enzim aktivitesinin de yüksek olduğu tespit edilmiş ve antifungal etkinlikte kitinaz enziminin de etkili olduğu düşünülmektedir. Yürütülen bir çalışmada *F. culmorum*'a karşı özellikle *P. chlororaphis* MF-1 ve B. subtilis TV-125A'nın yüksek antifungal aktiviteleri ile kitinaz enzim aktiviteleri arasında pozitif bir ilişki olduğu ve patojenin kontrolünde kitinaz enzim aktivitesinin önemli olabileceği belirtilmiştir (Şenol 2014). Benzer bir diğer çalışmada depo koşullarında uygulanan *B. subtilis* TV-6F ve *B. subtilis* TV-17C izolatlarının mandalinanın raf ömründe önemli artış sağladığı bu biyoajanların kitinaz, glukanaz ve proteaz enzim aktivitelerinin pozitif olduğu ve depo hastalıklarına sebep olan pek çok fungal patojenin gelişimini engelleyebilme potansiyellerinin de bu özelliklerinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Tozlu *et al.* 2019). Chung *et al.* (2010) yaptığı çalışmada topraktan izole ettiği *B. subtilis* NPU 001 suşunu kitin ihtiva eden ortamda geliştirerek kitinaz elde etmiş ve *F. oxysporum*' un hif uzamasını inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Ghasemi *et al.* (2011), *B. pumilus* SG2 bakterisinden saflaştırdıkları kitinaz enziminin *F. graminearum*, *R. solani*, *Magnaporthe grisea*, *S. sclerotiorum*, *T. reesei, B. cinerea* ve *Bipolaris* sp.'e, Sindhu and Dadarwal (2001) Pseudomonas suşlarından elde ettikleri kitinaz enziminin *P. aphanidermatum* ve *R. solani*'ye, Nielsen *et al.* (1999), *P. fluorescens*'in 12 izolatının *P. ultimum* ve *R. solani*'ye karşı anti-fungal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmalar kitinaz enzim aktivitesinin, antifungal etkinlik amacıyla kullanıldığını göstermiştir. Biyoajaların daha önceki çalışmaları ile yaptığımız çalışma kitinaz enzim varlığını ve antifungal açıdan önemli sonuçlar gösterebileceğini destekler niteliktedir. Hıyarda kök ve gövde çürüklüğü etmenine karşı gösterdiği antifungal etkinin nedenlerinden birinin biyoajan bakterilerinde görülen kitinaz enzimi sayesinde olduğu tespit edilmiştir.

Fitaz enzimi bitki beslenmesinde çok önemli bir yere sahiptir. Fitaz enzimi inorganik fosforun dönüşümünü sağlayarak bitkiler tarafından kullanılabilir hale gelmesinde ve bitki gelişim parametrelerinde oldukça önemli bir rol oynar (Naz *et al.* 2013). Bu sebeple çalışmada kullanılan MF-1, C-37A, TV-6F ve TV-17C izolatlarının fitaz enzim aktiviteleri belirlenmiş ve aktivite aralığı 413-458 EU/ml olarak bulunmuştur. En yüksek aktiviteden başlayarak sırasıyla C-37A (458 EU/ml), TV-17C (446 EU/ml), TV-6F (424 EU/ml) ve MF-1(413 EU/ml) olarak ölçülmüştür. Bakterilerden fitaz enziminin kısmi saflaştırılması ve kullanılmasıyla ile ilgili çok sayıda çalışma vardır (Sarıbuga *et al.* 2014; Demirkan *et al* 2017; Karagöz *et al.* 2020;). Oluşturalacak ürünün antifungal etkinliğinin yanında bitki beslenmesinde önemli roller olduğu düşünüldüğü için fitaz enzimi varlığına bakılmak istenmiştir. Biyoajan bakterilerle ile yapılacak formülasyon çalışmasında fitaz enzimi aktivitesine bakılarak bitki beslenmesine etki mekanizması araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada fitaz üreticisi *A. niger* türleri bitkiye uygulanmış ve bu uygulama sonucunda topraktaki serbest fosfat miktarının arttığı ve gelişimi etkileyen fosfatlı gübrelere ihtiyaç duyulmayacağı belirlenmiştir (Naz *et al.* 2013). El-Toukhy *et al.* (2013), *B. subtilis* MJA adlı bakteride yaptıkları çalışmada maksimum fitaz üretimini 720 EU/ml, Lata vd (2013) *Aspergillus heteromorphus* MTCC 10685 suşundan fitaz aktivitesini 17.88 U/ml, Singh *et al.* (2013) izole ettikleri *B. subtilis* DR6 suşundan maksimum fitaz üretimini 378 EU/ml olarak elde etmişlerdir. Raghavendra ve Halami (2009), *Pediococcus pentosaceus* CFR R38 ve CFR R35 suşlarında fitaz aktivitesinin sırasıyla 213 U/ml, 89 U/ml olduğunu belirlemişlerdir. Fu *et al.* (2011) *B. licheniformis* ZJ-6 suşundan en yüksek fitaz aktivitesini 0.1511 U/mL olarak saptamışlardır. Fitaz enzim aktivitesinin bitki beslenmesinde önemli bir yeri olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalara göre, elde ettiğimiz aktivitelerin çoğu literatürdeki çalışmalarla örtüşmüş ve bazı aktivitelerin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Biyokontrol amacıyla kullanılacak olan bakterilerin bitki beslenmesine katkı sağlayarak bitki gelişimini olumlu yönde etkileyebileceği belirlenmiştir.

Dünyada üretim sıralamasında 3. sırada yer alan ülkemizde hıyar bitkisi ihracat için çok önemli bir yere sahiptir. Özellikle bu bitkide görülen hastalıklara karşı biyolojik içerikli ürünlerin üretilmesi ve organik tarımın desteklenmesi günümüz açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla üretilecek formülasyonlarda kullanılacak biyoajan bakterin en geliştiği ortam, pH ve sıcaklığın belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, tüm izolatlar NB sıvı kültüründe daha iyi gelişim göstermiştir. Aynı tür olan MF-1 ve C-37A izolatlarının en iyi geliştikleri pH sırasıyla 8,5 ve 8 sıcaklıklar ise 27ºC ve 29ºC olarak belirlenmiştir. Yine aynı tür olan TV-6F ve TV-17 izolatlarının en iyi geliştikleri pH değerleri ise sırasıyla 7,5 ve 8,5, sıcaklık ise 35ºC olarak tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada; *B. subtilis* (WT 168) bakterisinin optimum gelişme koşullarını pH 8 ve 34-37ºC olarak, *P. fluorescens* (SBW25) bakterisinin ise

pH 7,5 ve 29ºC olarak belirlemiştir (Anonymous 2016b). Jamil *et al.* (2007) en yüksek antibakteriyel özelliğine sahip *B. subtilis* MH-4 için optimizasyon çalışması yapmış antibiyotik üretimi için optimum sıcaklığı 37ºC ve optimum pH'yı 8 olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada topraktan izole ettikleri *Pseudomonas* sp. QL212 optimum kültür şartlarını 12 saatlik inkübasyon süresi sonunda pH 8,03 ve 30°C olarak belirlemişlerdir. Yapılan optimizasyon çalışmalarının bu tez kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar ile benzer sonuçlar elde ettiği belirlenmiştir.

Biyolojik mücadelenin temel prensibi ve hedefi tarla ve sera koşullarında hastalık ve zararlıların kontrol edilmesidir. Kimyasal mücadelenin olumsuz yan etkilerinin anlaşılması nedeniyle, zirai mücadelede alternatif ve/veya tamamlayıcı yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle son yıllarda yürütülen araştırmalar sonucunda bazı mikrobiyal formülasyonlar geliştirilmiştir. Dünyada bakteriler kullanılarak geliştirilen sıvı, yarı katı ve katı olmak üzere üç çeşit mikrobiyal içerikli formülasyon bulunmaktadır. Düşük su içeriğine sahip katı formülasyonlar, sıvı formlasyonlara göre hayatta kalma süreleri daha uzun ve yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmalarından dolayı oldukça avantajlıdır (Melin *et al*. 2006). Katı taşıyıcılı bir formülasyon içeriği hazırlanırken dikkat edilecek ilk husus içeriğindeki maddelerin insan ve çevre üzerine olumsuz etkileri olmayan, maliyeti düşük, geniş spektrumlu ve her türlü çevre koşullarında kullanım imkânının olmasıdır. Ayrıca seçilen taşıyıcıların fazla sayıda mikroorganizma barındırabilmesi ve kolay ulaşılabilir olması gerektiği de yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Rivera-Cruz *et al.* 2008). Aslan (2011) yaptığı çalışmada, *P. putida* 18/K *ve B. subtilis* 66/3 izolatları ile biyogübre formülasyonları üretmiş ve formülasyonlarına perlit, zeolite ve kokopit taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Rivera-Cruz *et al.* (2008) farklı killer, hayvan gübreleri, kompostlanmış bitkisel materyal ve diğer organik maddeler taşıyıcı olarak kullanılabileceğini bildirirken, Ahmad *et al.* (2008) formülasyonlar için taşıyıcı olarak zenginleştirilmiş kompost kullanılabileceğini bildirmiştir. Bir başka çalışmada doğal ve sentetik zeolite ve vermikülit esaslı inorganik taşıyıcıların da kullanılmakta olduğunu bildirilmiştir (Sarma *et al.* 2009)

Tüm bu hususlar göz önünde bulundurularak katı taşıyıcı maddeler literatür çalışmalarına göre seçilmiş ve formülasyon üretimi sırasında çeşitli ön deneme çalışmaları yapılmıştır. Yapılan ön deneme sonuçlarında Formülasyon-A ve Formülasyon–B'de yaklaşık 10^3 kob/ml düzeylerinde bakteri içeriği elde edilmiş formülasyon oluşturulurken kurutma aşamasında değişikliğe gidilmesi ve inkübasyona tabi tutulması gerektiği düşünülmüştür. Bashan (2014), kurutma aşamasında bakteri sayısının azaldığını ancak daha stabil sonuçlar alındığını belirtmiştir. Tamamen kuru formülasyonlarda bakterilerin hareketsiz bir formda

kalarak metabolizmasının yavaşladığını hatta bazı durumlarda durmasından dolayı çevresel streslere karşı dirençli ve gübre uygulamasıyla daha uyumlu olduğunu bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada Daha yavaş kuruyan bir formülasyon, saklama sırasında suşun hayatta kalmasını arttırdığı belirtilmiştir (Moënne-Loccoz *et al.* 1999). Bu nedenle daha düşük sıcaklıklarda daha uzun süre kurutma yapılmasına karar verilmiş ve MF-1 ve TV-17C bakteri izolatları ile 72 saatlik bir kurutma uygulamasına gidilmiştir. MF-1 bakteri izolatı ile kurutma sonrası 60. saat 34×10^6 kob/ml, TV-17C bakterisi ile kurutma sonrası 72. saatte 26×10^6 kob/ml bakteri içeriğine sahip formülasyonlar elde edilmiştir. Ön deneme çalışmalarında yüksek bakteri içerikli formülasyonlar elde edilmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre kurutma işleminin daha uzun süre düşük sıcaklılarda yapılması gerektiği belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önce yapılan çalışma sonuçları ile desteklenmiştir.

Bu aşamada daha uzun raf ömrüne sahip formülasyonlar geliştirebilmek için elde edilen bakteri miktarları az bulunmuştur. Bu nedenle bakterilerin 96 saat boyunca gelişimleri izlenmiştir. MF-1 izolatı için 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda bakteri sayısı $2,3\times10^9$ kob/ml olarak bulunmuş ve süre boyunca artış görülmüştür. TV-17C izolatı için 96 saatlik inkübasyon süresinde azalış görülmüş ve en yüksek bakteri sayısı 24. saate $1,7\times10^9$ kob/ml olarak elde edilmiştir. *B. subtilis* bakterisi asidik, alkali, oksidatif veya ozmotik durumlar oluştuğunda stres altında dayanıklı endospor üretebilmektedir. Bu sayede zor şartlarla baş edebilecek ve uygun ortam oluştuğunda tekrar gelişimine devam edebileceği belirtilmiştir (Perez 2000; Bandow 2002). Bu sebeple formülasyon çalışmalarında TV-6F ve TV-17C izolatları ile iki farklı ortam kullanılarak endospor üretimine gidilmiş ve karşılaştırılmıştır. Her iki izolatın da BSM ortamında yaklaşık 10^9 kob/ml endospor, DSM ortamında ise çok daha düşük miktarlarda endospor oluşturduğu belirlenmiş ve endospor üretimi için BSM ortamı kullanılmıştır. Posada-Uribe *et al.* (2015) çalışmalarında ortam ve kültür koşullarını, bitki büyümesini teşvik eden *B. subtilis'*in EACB0575 spor üretimini arttırmak için farklı istatistiksel metotlarla optimize etmişler ve BSM ortamı kullanarak endospor üretimi yapmışlardır. Martınez-Alvarez *et al.* (2016), mısırda *F. verticillioides* (Sacc.)' e karşı içerisinde *B. cereus* B25 sporları bulunan toz formülasyon geliştirmişler ve bu toz formülasyonun, in vitro ve mısır bitkilerinde *F. verticillioides*'e karşı etkinliğini test etmişlerdir. Yapılan bu çalışmalar göz önüne alınarak elde ettiğimiz sonuçların diğer çalışmalarla desteklendiği görülmüş ve formülasyonlar çalışmalarında TV-6F ve TV-17C izolatlarının endospor formları kullanılmasına karar verilmiştir.

Formülasyonda koruyucu maddelerin kullanımı kurutma ve saklama sırasında bakteriyel hayatta kalma oranlarını artırmanın uygun bir yoludur (Schoebitz *et al.* 2012).

Biyoajan bakterilerinin optimizasyonu, TV-6F ve TV-17C bakterilerinin endospor formlarının kullanılmasına karar verildikten sonra son olarak formülasyon içeriğindeki koruyucu maddelerin biyoajan bakterilere karşı antibakteriyel etkisi test edilmiştir. Koruyucu maddeler gıda katkı maddelerinden seçilmiştir. Yapılan çalışmada kullanılacak olan %1 sitrik asit %1 potasyum sorbatın biyoajan bakteriler üzerine antibakteriyel etki göstermediği belirlenmiş ve bu oranların formülasyonda kullanılmasına karar verilmiştir. Kullanılan koruyucu maddelerin çok daha yüksek oranlarda gıda katkı maddesi olarak kullanıldığı ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Marz 2002; Atasever, 2007; Altuğ, 2009). Çeşitli granüler ve toz formdaki katı formülasyonlarda taşıyıcı malzemeler karboksimetil selüloz (Martinez-Alvarez *et al.* 2016; Prasad and Babu, 2017; Basheer *et al.* 2019), jelatin (Berninger *et al*. 2017), arap sakızı (Berninger *et al*. 2016), maltodekstrin (Campos et al 2014), laktoz ve sukroz gibi disakkaritler (Cabrefiga *et al.* 2014; Molina-Romero *et al.* 2017) ve sütten elde edilen bileşikler (Berninger *et al.* 2017) gibi yapışkan / koruyucu maddelerle birleştirilmiştir.

Tüm optimizasyonlar sağlandıktan sonra katı taşıyıcılı formülasyonlar oluşturulmuş ve her bir basamağında sayımlar yapılmıştır. Bu sonuçlara göre 10^9 kob/g ile 10^7 kob/g arasında değişen sayıda bakteri içerikli sayımlar gerçekleştirilmiştir. Üretilen formülasyonların bakteri sayım çalışmalarında, Pesenti-Barili *et al.* (1991) *A. radiobacter* K84 izolatı ile oluşturduğu katı taşıyıcıda $4x10^9$ kob/g, Martınez-Alvarez *et al.* (2016) *B. cereus* B25 sporları içeren talk bazlı formülasyonunda $1x10^9$ kob/g bakteri sporu içerikli ürün oluşturmuşlardır. Katı taşıyıcılı formülasyonlarımızın bakteri miktarlarının da bu sayılara ulaştığı görülmüştür. Çalışmada oluşturulan formülasyonların sonuçlarının oldukça başarılı olduğu ve ileride üretime yönelik yapılacak çalışmalara yön vereceği düşünülmektedir.

Oluşturduğumuz katı taşıyılı formülasyon uygulamaları ile sera çalışmaları yapılmıştır. İlk sera uygulamasında katı taşıyıcılı formülasyon uygulamalarının 4 farklı dozu bitkide ET 46 fungusu ile birlikte uygulanmış ve hastalık şidddeti değerlendirmesi yapılmıştır. Bu değerlendirmeye göre hastalıkla mücadelede en etkili formülasyonlar K-1 (4. doz) ve K-11 (1. doz) olarak tespit edilmiştir. K-1 ve K-11 formülasyonlarının hastalık şiddeti değeri 1,33 bulunurken, pozitif kontrol hastalık şiddet değeri 2,67 olarak bulunmuştur. Negatif kontrol uygulamasında tüm bitkiler öldüğü için hastalık şiddet değeri 5 olarak belirlenmiştir. Uygulamalarda K-1 (4.doz) ve K-11 (1. doz) için %26,6, pozitif kontrol için %53,4 ve negatif kontrol için %100 oranlarında hastalık görülmüştür. Formülasyon dozlarının ortalamaları dikkate alındığında, K-11 ve K-1 için; sırasıyla hastalık şiddeti değeri 1,83 ve 1,92 olarak belirlenmiş, %36,6 ve %38,4 oranlarında hastalık görülmüştür. Yaptığımız çalışmayı destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Chakraborty *et al.* (2020), pirinçte patlama hastalığının

tedavisi için talk, bentonit, hurma yağı ve hindistancevizi yağı içinde *P. fluorescens* ve *P. putida* kullanılarak formülasyon hazırlayıp pirinç patlama hastalığına karşı test etmişlerdir. formülasyonlarının hastalığa karşı ticari üretim için potansiyel bir aday olabileceğini belirtmişlerdir. Martınez-Alvarez *et al.* (2016), mısırda *F.* verticillioides'e karşı içerisinde *B. cereus* B25 sporları bulunan toz formülasyon geliştirilmiş ve bu toz formülasyonun, in vitro ve mısır bitkilerinde *F. verticillioides*'e karşı etkinliğini araştırmışlardır. *B. cereus* B25 sporlarının talk bazlı bir toz formülasyonunun, *F. verticillioides*'in neden olduğu mısır kulağı ve kök çürüklerinin biyo-kontrolü için yeterli olabileceğini belirtmişlerdir.

Formülasyon dozları bitkiye denendikten sonra formülasyonun seçilen dozları ile bitki uygulaması çalışması yapılmış ve hastalık şiddetleri değerlendirilmiştir. Hastalık şiddetine karşı en etkili formülasyon K-11 formülasyonu olmuştur. Uygulamaların hastalık şiddeti değerleri K-11 için 1,47, K-1 için 2,13, pozitif kontrol ilaç uygulaması için 2,41, negatif kontrol için ise 4,8 olarak tespit edilmiştir. Uygulamalarda K-11 için %29,4, K-1 için %42,6, pozitif kontrol ilaç uygulaması için %48,2 ve negatif kontrol için %96 oranlarında hastalık görülmüştür. Bu sonuçlarına göre K-11 formülasyonu hastalık şiddeti daha düşük olurken K-1 formülasyonu hastalık şiddeti değeri K-1 uygulamasına göre daha yüksek bulunmuştur. Pozitif kontrol ve negatif kontrol uygulamarında hastalık şiddeti değeri de biraz düşük tespit edilmiş ancak formülasyon uygulamarına göre yine yüksek hastalık şiddeti bulunmuştur.

Kullandığımız biyoajan bakterilerinin bir kısmi ile yapılan antifungal bir çalışmada petride *Fusarium culmorum*'a karşı antifungal aktiviteleri test edilen toplam 158 izolattan 31'i pozitif sonuç vermiştir. Antifungal test sonucunda elde edilen izolatların pozitif sonuçları yüzde olarak ifadesi; yaklaşık %77'si *Bacillus* izolatlarına aittir. *Bacillus* izolatlarından pozitif sonuç verenlerin yaklaşık olarak %32'si *B. megaterium,* %26'sı *B. subtilis*, %19'u ise *B. pumilus*'a ait olduğu belirtilmiştir. Bu izolatların dışında pozitif sonuç verenlerin yaklaşık %7'si *P. fluorescens*'e, %10'u *Pseudomonas putida*'ya ve %3'ü ise *P. macerans* ve *P. agglomerans*'a ait olduğu saptanmıştır (Şenol 2014). Başka bir çalışmada *F. oxysporum* ve *F. culmorum*'un kontrolünde *B. cepacia* OSU 7 straini (Liu *et al.* 1995; Kotan vd 2002; Küçük *et al.* 2007); *G. graminis* var. *tritici*, *F. culmorum* ve *F. moniliforme*'nin kontrolünde *T. harzianum* (Martyn and Gordon 1996); *F. oxysporum* f. sp. *melonis*'in kontrolünde *P. putida*; *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*'in kontrolünde *B. subtilis* (Kotan 1998); pamukta *Verticillium* songunluğunun kontrolünde fluorescent Pseudomonas türleri (Melan 2004) başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Biyolojik mücadelede bir başka yaklaşımda aynı türün patojen olmayan ırklarının biyolojik mücadelede potansiyel biyoajan olarak kullanılmasıdır. Abeysinghe (2006), çalışmasında Sri Lanka'daki patojen olmayan üç *F. oxysporum* izolatının hıyarda kök ve gövde

çürüklüğü etmeni *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*' a karşı etkinliğini test etmiştir. Sera saksı deneylerinin sonuçları, patojenik olmayan iki *F. oxysporum* izolatının Fusarium kök ve gövde çürüklüğü hastalığını önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur.

Bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin bitki gelişim, verim ve kalite parametreleri üzerine etkili olmasının yanısıra aynı zamanda pek çok hastalık ya da zararlının kontrolünde de önemli görevler üstlendiği bilinmektedir. Formülasyonların seçilen dozlarının bitkide hastalık şiddeti değerlendirilmesi yapıldıktan sonra bitki büyüme parametrelerine bakılmıştır. Bitki gövde parametreleri sonuçlarına göre, hıyar bitkilerinde pozitif kontrol ilaç uygulamasına kıyasla, K-1 formülasyon uygulamasının; bitki boyunda %37, yaprak sayısında %94, yaprak alanında %262, yaprak yaş ağırlığında %225, yaprak kuru ağırlığında %206, gövde çapında %49, gövde yaş ağırlığında %194 ve gövde kuru ağırlığında %234 oranında artışlar, K-11 formülasyon uygulamasının ise, bitki boyunda %80, yaprak sayısında %108, yaprak alanında %166, yaprak yaş ağırlığında %185, yaprak kuru ağırlığında %158, gövde çapında %41, gövde yaş ağırlığında %200 ve gövde kuru ağırlığında %247 oranında artışlar sağladığı belirlenmiştir. Bitki kök parametreleri sonuçlarına göre, hıyar bitkilerinde pozitif kontrol ilaç uygulamasına kıyasla, K-1 formülasyon uygulamasının; ortalama kök çapında %107, ortalama kök gövde çapında %58, kök yaş ağırlığında %179 ve kök kuru ağırlığında %202 artışlar, K-11 formülasyon uygulamasının ise, ortalama kök çapında %125, ortalama kök gövde çapında %35, kök yaş ağırlığında %64 ve kök kuru ağırlığında %97 oranında artışlar sağladığı görülmüştür. İstatistiksel açıdan önemli kabul edilen bitki parametrelerinin hepsinde formülasyon uygulamalarının pozitif kontrole göre daha yüksek sonuçlara sahip olduğu görülmüştür. Bitki gövde ve kök özellikleri sonuçlarına göre istatistiksel açıdan önemli farklar bulunmayan ortama kök uzunluğu dışında bitki kök parametreleri için en düşük değerler pozitif kontrol olan kimyasal ilaç uygulamasında saptanmıştır.

Daha önce yürütülen bir çalışmada; Bakteriyel formülasyonların birçoğunun hem hastalığı kontrol ettiği, hemde bitki gelişimi ve bitki klorofil miktarında artışlara sebep oldukları tespit edilmiştir (Aktaş 2014). Bir çalışmada; *B. subtilis* PA1 ve *P. azotofixans* PA2 strainlerinin pamukta kırmızı örümcek yoğunluğunu önemli ölçüde azalttığı, vejatatif ve genaratif bitki gelişiminde önemli derecede artışlara neden olduğu, kütlü pamuk veriminde %80,03 ve lif veriminde ise %82,17 oranında artışlar gözlendiği belirtilmiştir (Çelik 2019). Karagöz (2009) yaptığı çalışmada; bakteriyel organizmalar kullanarak marulda bakteriyel leke hastalığını kontrol ederken, aynı zamanda marul gelişimi üzerine de bu biyoajanların önemli katkılar sağlayarak yaş ve kuru ağırlık artışına sebep olduğunu belirlemiştir. Gökçe ve Kotan (2016) yaptıkları çalışmada, *B. subtilis* TV-93B, *B. megaterium* TV-56F, *B. choshinensis* TV-53D, *B.*

pumilus TV-3C ve *B. megaterium* TV-6D izolatların tamamı buğdayda bitki boyu ve yaprak sayısında sadece patojen uygulaması yapılan kontrole göre artışlara sebep olduğunu belirlemişlerdir. *B. megaterium* TV-56F, *B. pumilus* TV-3C ve *B. megaterium* TV-6D izolatları yan kök sayısı ve toplam yaş ağırlıkta; *B. choshinensis* TV-53D, *B. pumilus* TV-3C ve *B. megaterium* TV-6D izolatları ise toplam kuru kök ve toplam kuru gövde ağırlığında artışa sebep olduğunu ve hastalık şiddetini önemli seviyede azalttığı bildirmişlerdir. Çalışmamızda da biyoajan bakterileri ile oluşturulan katı taşıyıcılı formülasyonların (K-1, K-11) hıyarda kök ve gövde çürüklüğünü engellemelerinin yanı sıra bitki gelişim parametrelerinde de önemli artışlara sebep olduğu tespit edilmiştir.

PGPB bakterilerinin simbiyotik veya asimbiyotik azotu fikse edebildiği, organik fosfatı ve diğer besin elementlerini minarelize ettiği, mineral fosfat ve demiri çözebildiği belirtilmiştir (Çakmakçı *et al.* 2007; Karagöz *et al.* 2016a; Dadaşoğlu *et al.* 2017). Seçilen formülasyon dozları ile bitki büyüme parametreleri analizi sonrası bitki ve yetiştirme ortamı besin elementlerine bakılmıştır. Bu tez kapsamında bitkilerin yapraklarında Toplam N, P, K, Mg, Na, Fe ve Mn besin elementleri analizi yapılmıştır. Bitki besin element analiz sonuçlarına göre Toplam N, P, K, Mg, Na, Fe ve Mn elementleri istatistiksel olarak önemli farklar olduğu belirlenmiştir. Bitki yaprağındaki besin element içeriğine bakıldığında N, P, K, Mg, Na ve Fe elementlerinin K-1 ve K-11 formülasyonlarında pozitif kontrol ilaç uygulamasına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. P ve Mn elementi en yüksek orana K-1 formülasyonunda ulaşırken, pozitif kontrol uygulamasının tüm besin elemetlerinde en düşük orana sahip olduğu görülmüştür.

Bitkilerin yetiştirilme ortamlarından mutlaka almaları gereken en önemli besin maddelerinin başında gelen azot; sudan sonra bitki büyümesini sınırlayan önemli bir faktördür (Vitousek and Howarth 1991). Bitki yapraklarındaki toplam azot pozitif kontrol ilaç uygulamasına kıyasla K-1 formülasyon uygulaması için %30 oranında, K-11 formülasyon uygulaması için %23 oranında daha yüksek bulunmuştur. Genel olarak yapraktaki toplam azotun yeterlilik düzeyini Pritss ve Handley (1998) %2,0-2,8 olarak, İbrikçi vd (1994), %2,50-3,20 olarak bildirmişlerdir. Çalışmalara göre yapraktaki toplam azot miktarının yeterli olduğu ve formülasyon uygulamalarının pozitif kontrol ilaç uygulamasına göre toplam azot miktarını arttırdığı görülmüştür. Azot fiksasyonu yapan bakteriler ile yapilan çalişmalar, bu bakterilerin patojenlere karsi dayaniklilik sagladigini, büyüme süresini kisalttığını, bitki gelisimini teşvik ettiğini, çiçeklenme, verim ve/veya kaliteyi arttırdığını göstermiştir (Bashan and de-Bashan 2002; Shridhar 2012; Mohammadı 2018).

Fosfor ATP, şekerler ve nükleik asitlerin oluşması için bitkilerin ihtiyaç duyduğu önemli bir elementtir. Ayrıca fosfor, hücre bölünmesi, çiçek ve meyve oluşumunda, bitkilerin olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır. Bitki yapraklarındaki P elementi pozitif kontrol ilaç uygulamasına kıyasla K-1 formülasyon uygulaması için %35 oranında, K-11 formülasyon uygulaması için %30 oranında daha yüksek bulunmuştur. Potasyum, bitkilerin hastalıklara karşı dayanıklılığını artırmakta, tohumun olgunlaşmasını ve bitkinin kök sisteminin gelişmesini sağlamaktadır (Kacar ve Katkat 2010). Bitki yapraklarındaki potasyum miktarı pozitif kontrol ilaç uygulamasına kıyasla K-1 formülasyon uygulaması için % 43, K-11 formülasyon uygulaması için ise %28 oranında daha yüksek bulunmuştur. Magnezyum, özellikle fosfor olmak üzere diğer elementlerin alınmasına yardımcı olmakta ve çok sayıda enziminin aktivasyonunda rol almaktadır (Plaster, 1992; Gardiner ve Miller, 2008). Bitki yapraklarındaki Mg elementi oranı pozitif kontrol ilaç uygulamasına kıyasla K-1 formülasyon uygulaması için %53, K-11 formülasyon uygulaması için ise %58 oranında daha yüksek bulunmuştur.

Demir elementi bitkide solunum ve fotosentez reaksiyonlarında çok önemli rol oynar. Bitkilerdeki katalaz, peroksidaz ve sitokrom oksidaz gibi enzimleri aktive ederek birçok biyokimyasal reaksiyonun katalizlenmesini sağlar. Eksikliğinde klorofil miktarı azalır ve bitki büyümesi yavaşlar (McCauley vd., 2009). Bitki yapraklarındaki Fe elementi miktarı pozitif kontrol ilaç uygulamasına kıyasla K-1 formülasyon uygulaması için % 30, K-11 formülasyon uygulaması için ise %29 oranında daha yüksek bulunmuştur. Bu artış istatistiki olarak da önemli çıkmıştır. Demir eksikliğine bağlı olarak oluşan kloroz tarımda gerek meyvecilik gerek bağcılık gerekse sebze yetiştiriciliğinde önemli bir sorundur. Bu formülasyonların hem kök hastalığını önleme hemde klorozu önlemede oldukça önemlidir.

Mangan, yaşamsal öneme sahip enzimlerin aktivasyonunda temel göreve sahiptir. Dekarboksilaz, dehidrogenaz ve oksidaz enzimlerini aktive etmektedir. Süperoksit dismutaz enziminin yapısında yer almaktadır. Toprakta manganın çözünürlüğü toprak reaksiyonuna, mikroorganizma faaliyetlerine ve toprak suyunun özelliklerine göre değişmektedir (Kantarcı, 2000; Boşgelmez vd 2001). Fotosentezde suyun parçalanmasında rol oynamaktadır. Azot metabolizmasında ve asimilasyonunda etkilidir. Demir, kalsiyum ve magnezyumun absorpsiyonunda önemli rol oynar. Gardiner and Miller (2008) Bitki yapraklarındaki Mn elementi miktarı pozitif kontrol ilaç uygulamasına kıyasla K-1 formülasyon uygulaması için %46, K-11 formülasyon uygulaması için ise %36 oranında daha yüksek bulunmuştur. Yetiştirme ortamında yapılan besin elementleri analizine göre; toplam N, P, Ca, Mg, Fe ve Mn elementlerinde uygulamalar arasında istatistiksel olarak önemli farklar olmadığı belirlenmiş, K ve Zn elementlerinde ise istatistiksel olarak önemli farklar olduğu tespit edilmiştir. Yetiştirme

ortamında analiz edilen besin elementlerinin pozitif kontrol uygulamasındaki değerlerinin negatif kontrole göre azaldığı, K-1 ve K-11 formülasyonlarında ise negatif kontrole göre artış gösterdiği belirlenmiş ancak bu artışlar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

Pozitif kontrol ilaç uygulamasıdaki bitki besin elementi sonuçlarına göre katı taşıyıcılı formülasyon içerisinde bulunan biyoajan bakterilerin azotu fikse edebildiği ve diğer besin elementlerini minarelize ettiği ve demiri çözebildiği belirlenmiştir. Ayrıca inorganik fosforun çözülerek bitkiye alınmasında biyoajan bakterilerin ürettiği fitaz enziminin de payı olduğu görülmüş, bu sayede bitki büyüme parametelerinin de olumlu yönde etkilendiği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, muz bitkisinde PGPB uygulaması gören bitkilerin kök uzunluklarında, sayısında, ağrılıklarında ve N içeriğinde önemli oranda artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar PGPB uygulaması gören bitkilerin yapraklarında klorofil içeriğinde ve yaprakların ağırlıklarında artış meydana geldiğini saptamışlardır (Baset Mia *et al*. 2010). Diğer bir çalışmada PGPB uygulamalarının N, P ve K gibi besin elementlerinin alınımını artırdığı bildirilmiştir (Karlıdağ *et al.* 2007; Karthikean, *et al.* 2010). Çakmakçı vd (2005) çalışmalarında P-çözücü *Bacillus* M-13 ve *Bacillus* RC07, N_2-fikseri *Bacillus* OSU-142, *Paenibacillus* RC05 ve *Rhodobacter* RC04 bakterileri P ve N alınımını artırdığını bildirilmişlerdir. Ayrıca *Bacillus* RC07 ve *Bacillus* M-13 toprak pH'sını düzenleyerek kalsiyum fosfatları çözebildiğini bildirmişlerdir. Kaymak *et al.* (2008) *B. megatorium*'un nanede kök parametreleri (köklenme performansı, kök uzunluğu, köklerin kuru ağırlığı) üzerinde pozitif yönde etkisi olduğu bildirilmiştir. Han *et al.* (2006), Fosforu çözebilen *B. megatorium* var. *phosphaticum* ve Potasyum çözebilen bakteri *B. mucilaginosus*, besinsel açıdan fakir olan toprakta yetiştirilen biber ve kabakta besin elementlerinin alınımında artış meydana getirdiği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, PGPB uygulamalarının P ve K gibi temel besin elementlerinin yanı sıra mikro besin elementlerinin de bitki tarafından alınımını artırdığı bildirilmektedir (Dobbelaere *et al.* 2003; Çakmakçı vd 2005; Karlıdağ *et al.* 2007). Mirik *et al.* (2008), fosfatı indirgeyen 11 adet bakteri izolatını aday PGPB izolatı olarak seçmiştir. Bunlardan üç tanesi ile yaptığı saksı ve tarla çalışmalarında PGPB uygulanan bitkilerde hastalık şiddetinin %65 oranında azaldığını saptamıştır. PGPR'ların bitki boyu, gövde çapı, bitki yas ağırlığı, bitki kuru ağırlığı, kök uzunluğu, kök kuru ağırlığı, verim, meyve boyu ve meyve sayısında değişen oranlarda artışa neden olduğunu belirlemistir. Khan (2005), *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* gibi bakterilerinin bitkideki Fe, Zn, Mg, Ca, K, ve P içeriklerini artırdığını ortaya koymuştur. Orhan *et al.* (2006), bakteri uygulamalarının topraktaki elverişli Mg'u önemli derecede etkilediğini belirtmiştir.

Toprağa uygulanan bakterilerin topraktaki organik maddeleri parçalaması üzerine de önemli katkıları olduğu bilinmektedir. Bu bakterilerin organik gübre desteği ile toprağa

uygulanması neticesinde hem etkinliğinin artacağı hem de uzun vadede toğrağın birçok özelliğinin olumlu yönde gelişeceği düşünülmektedir. Tez çalışmasındaki besin elementleri ve bitki büyüme parametreleri karşılaştırıldığında formülasyon uygulamalarındaki biyoajan bakterilerin N, P, K, Ca, Mg, Fe ve Mn elementlerinin bitkiye alımını arttırarak bitki büyüme parametrelerinde olumlu etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuca göre oluşturulan katı taşıyıcılı formülasyonların hem biyokontrolde hemde mikrobiyal gübre olarak bitki beslenmesinde kullanılacağı düşünülmektedir.

Bitki kök rizosferindeki patojenlerin bastırılmasında kullanılan biyokontrol bakterilerinin rekabet özelliklerinin de biyokontrol organizmaya önemli katkılar sağladığı bilinmektedir (Gökçe ve Kotan 2016). Yapılan bir çalışmada; soya ve bezelye tohumlarından sızan etanol ve acetaldehydin'in *P. ultimum'*un sporangiumlarınca emilerek hifsel gelişmenin teşvik edildiği, *P. putida* N1R izolatı ile soya ve bezelye tohumlarının muamelesi sonucu ortamdaki etanol karbon kaynağına dönüştürülerek patojen organizmanın sporangial üremesi ve hif gelişimi zayıflatıldığı ve bu yolla patojene karşı kontrol sağlandığı belirtilmiştir (Paulitz 1991). Antibiyosis, besin-yer yarışması ve dayanıklılığın uyarılması gibi birbirinden farklı mekanizmaları kullanan kök bakterilerinin kombinasyonu yoluyla aynı konukçuda birden fazla hastalığa karşı biyolojik savaşta sinerjistik etki yoluyla başarı sağlanabilmektedir (Aslan ve Özaktan 2005). Çalışmamızda kullandığımız biyoajan bakterilerin kitinaz ve fitaz enzimi ürettiği, bitki besin elementlerinin toprakta kullanılabilirliğini arttırarak bitkiye alınmasını sağladığını ve bu sayede bitki büyüme parametrelerinde artışlara sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca Fe elementini bağlayarak siderefor üretimi yaptığı da daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Bu hususlar göz önüne alınarak formülasyonlarda kullanılan izolatların rekabetik özelliklerinin de patojenin kontrolünde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Biyolojik kontrol amacıyla kullanılan bakterilerin etki mekanizmalarından birisi de bitkideki sistemik dayanıklılık mekanizmasının teşvik edilerek bitkinin ekstrem koşullara dayanıklılığının artırılmasıdır. Yapılan bir çalışmada fluorescent Pseudomonaslardan *P. putida'*nın, sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) ile ilgili olan PR1a proteinlerini şifreleyen genlerin expressionunu teşvik ettiği ispatlanmıştır (Zdor and Anderson 1992). Yapılan bir başka çalışmada ise, *P. fluorescens* bakterilerinin, *Fusarium* solgunluk hastalıklarının etki altına alınmasında, canlı bakterilerin etkili olduğu kadar, bakteriyel hücrelerin hücre yüzeyindeki lipopolisakkaritlerin de dayanıklılığı artırabildiği gözlenmiştir (Leeman *et al.* 1995). Yine; *P. fluorescens*, *S. marcescens* ve *P. putida* bakterilerinin bazı strainleri hıyar ve turp bitkilerinde patojen olan *Colletotrichum lindemuthianum*, CMV, *P. syringae* pv. *lachrymans* ve *F. oxysporium* patojenlerine karşı sistemik dayanıklılığı uyardığı saptanmıştır (Whipps 1992). Bu

nedenle bu çalışmada etkili bulunan izolatların hıyarda olduğu gibi farklı bitki türlerinde de SAR'ı teşvik edebilme potansiyellerinin ileride yapılacak çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda biyolojik mücadele etmenlerinin bitkilerde bitki gelişimi teşvik ettikleri, bitkideki POX, PPO, SOD ve CAT gibi bazı antioksidan enzim düzeylerinde değişikliklere sebep olarak bitkiyi stres koşullarına karşı daha dayanıklı hale getirdikleri bilinmektedir (Patten and Glick 1996). SOD aktivitesinin stres koşullarında arttığını veya azaldığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu sebeple SOD'un streslere veya ortamdaki ROS seviyelerine göre düzenleyici bir rol üstlendiği ileri sürülmüştür (Aydın 2016). Bitkilerde ROS'un, patojen saldırılarına yanıtla ilişkili olduğu, aktif oksijen türlerinden H_2O_2'nin, bitkide fitoaleksin üretimine ve PR proteinlerinin sentezine neden olarak dayanıklılık mekanizmasını tetiklediği bildirilmiştir (Bolwell and Daudi 2009).

Formülasyonların seçilen dozlarının bitkiye uygulanması sonucunda bitkilerin yapraklarında antioksidant enzim aktivitelerine bakılmıştır. Pozitif kontrol ilaç uygulaması ve formülasyon uygulamalarının hıyar bitkisi yapraklarının antioksidant enzim içeriği üzerine olan etkisi incelendiğinde; K-1 formülasyonunda POX ve CAT enzimlerinin pozitif kontrole göre enzim aktivitesi değeri yüksek çıkmış, PPO enzimi ise K-11 formülasyonunda, K-1'e göre daha yüksek ve pozitif kontrole göre her ikisi de düşük bulunmuştur. K-11 formülasyonunun antioksidan enzimlerinin düşük çıkmasındaki ana sebebinin hastalık şiddeti oranınındaki düşüklükten olduğu düşünülmektedir. Ortamdaki serbest radikallerin daha önceden ortadan kaldırıldığı için mevcut antioksidan enzimlerde stres faktörleinin azalmasından dolayı düşüş yaşanmıştır. Ancak K-1 formülasyon uygulamasında hastalık şiddeti oranı pozitif kontrol ilaç uygulamasına göre düşük olmasına rağmen antioksidan enzimlerden POX ve CAT enzim aktivitelerinin daha yüksek çıktığı belirlenmiştir. Pozitif kontrol ilaç uygulaması hastalık şiddetine göre formülasyon uygulamalarının hastalık şiddetlerinin aynı seviyede olduğu düşünülürse, K-11 formülasyonunun %1,98 POX enziminde, %36,8 CAT enziminde, %4,39 PPO enziminde ve %54,3 SOD enziminde pozitif kontrol uygulamasına göre daha yüksek aktivite göstereceği hesaplanmıştır. Ayrıca K-11 formülasyonunun %8,42 CAT enziminde, %51,05 PPO enziminde ve %60,2 SOD enziminde K-1 formülasyonuna göre yüksek aktivite göstereceği hesaplanmıştır. Tüm bu sonuçlara göre aynı hastalık şiddetine maruz kalan bitkilerde K-11 formülasyonunun en yüksek aktivite vereceği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada domates'de *P. fluorescens* CHA0 izolatı uygulamalarında bitkideki peroksidaz (POX), polifenoloksidaz (PPO) ve superoksid dismutaz (SOD) enzim aktivitelerinin uyarıldığı belirtilmiştir (Ramamoorthy *et al.* 2002). Benzer bir başka çalışmada da *P. fluorescens* ile

muamele edilen muz köklerinde POX ve PPO düzeylerinde artış olduğu ve bunun da *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* karşı bitkide direnç oluşturduğu belirtilmiştir (Saravanan *et al.* 2004). Çiftçi ve Altınok (2019) yaptıkları çalışmada *Pseudomonas* spp. izolatı, patojen inokulasyonundan 72 saat sonra patlıcan bitkilerinde savunma enzimlerinden olan katalaz CAT ve POX sırasıyla %22.8 ve %27.7 oranında artırdığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada *P. aeruginosa* izolatının hem antibiyosis etkisi gösterdiği hem de patlıcanda Fusarium solgunluğu hastalık gelişimini %80'in üzerinde baskıladığı ve CAT, POX ve PPO savunma enzimlerini aktive ettikleri bildirilmiştir (Altınok *et al.* 2013). Çalışmamızda da biyoajan bakteri inokule edilen bitkilerde antioksidan enzim düzeylerinde artışların olduğu bitkilerin dayanıklılık mekanizmalarını tetikleyerek hastalığın kontrolünde önemli olabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasında katı taşıyıcılı formülasyonların kullanılmasının en büyük sebebi; bu tür formülasyonların diğer formülasyonlara göre önemli avantajlara sahibi olmasıdır. Endüstriyel sistemde üretilen ürünlerin daha uzun süre ve daha stabil depolanabilmesi, az yer kaplaması, düşük ulaşım maliyetleri en önemli konuların başında gelmektedir. Özellikle raf ömrü, üretim sistemlerinde sürekli çalışılan bir konudur. Katı taşıyıcılı formülasyonlarda bakteri türü, kullanılan taşıyıcı ve taşıyıcı partikül büyüklüğüne göre raf ömrü değişiklik göstermektedir. Raf ömrü çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlara göre 6. ayın sonunda en yüksek bakteri sayısına sahip formülasyon $8,9\times10^9$ kob/gr değeri ile buzdolabında muhafaza edilen K-3 formülasyonu olmuştur. İkinci bitki uygulamasında kullanılan K-1 formülasyonu en yüksek bakteri içeriği $2,9\times10^8$ kob/gr olarak buzdolabı sıcaklığında, K-11 formülasyonu en yüksek bakteri içeriği $3,5\times10^9$ kob/gr olarak oda sıcaklığında olduğu belirlenmiştir. Tüm formülasyonlarımız her iki muhafaza şartında da en düşük bakteri sayısına sahip formülasyon $9,3\times10^6$ kob/gr değeri ile buzdolabında muhafaza edilen K-10 formülasyonu olarak belirlenmiştir. Her iki muhafaza şartı dikkate alınarak yapılan değerlendirmede 6. ay sonunda oda ve buzdolabı sıcaklığında en yakın bakteri sayısına sahip formülasyonun K-8 ($1,3\times10^9$ kob/gr (oda) $1,5\times10^9$ kob/gr (buzdolabı) olduğu tespit edilmiştir. Vidhyasekaran ve Muthamilan (1995) *P. fluorescens* izolatı kullanarak talk taşıyıcılı formülasyonları 12 ay, vermikülit taşıyıcılı formülasyonların 8 ay, kaolit taşıyıcılı formülasyonun 4 ay raf ömrüne sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca tez çalışmamızda kullandığımız bakteri türü olan *B. subtilis* bakterilerinin talk ve vermikülit içinde 45 gün yeterli sayıda saklanabildiği belirtilmiştir (Amer and Utkhede 2000). Chakraborty *et al.* (2020) talk, bentonit, hurma yağı ve hindistancevizi yağı içinde *P. fluorescens* ve *P. putida* kullanalarak formülasyon üretmişlerdir. 8. ay sonunda bakteri miktarı 10^5-10^7 kob/ml olarak bulunmuştur. Formüle edilen ürünlerde ümit verici raf ömrü sonuçlar olduğu belirtilmiştir. Bir başka çalışmada *Bacillus* spp. CaB5 bakterisinin talk bazlı formülasyonu üretilmiş ve yaşanabilirlik analizleri 45 güne kadar mikrobiyal sayımlarla

doğrulanmıştır. CaB5 bazlı formülasyonun, ekonomik açıdan bitkilerin büyümesini arttırdığı ve saha uygulamasında kullanılabilirliği potansiyelinin olduğu vurgulanmıştır (Basheer *et al.* 2019) *Bacillus cereus* B25 sporları bulunan toz formülasyon geliştirmişler ve bu toz formülasyonun, raf ömrünü değerlendirmişlerdir. $1x10^9$ kob/g bakteri sporu içeren talk bazlı toz formülasyon için spor canlılığı zaman içinde yavaşça azalmış ve oda sıcaklığında 360 gün saklamanın sonunda %53 spor canlılığı bulunmuştur (Martınez-Alvarez *et al.* 2016). Zhang *et al.* (2018), *B. subtilis* suşu ile biyo-gübre taşıyıcısı turbaya ve mısır kepeği kalıntısına inoküle etmişlerdir. Raf ömrü çalışmalarında ilk sayımları $1x10^{11}$ iken 4. ayda bakterilerde azalış görülmüş ve 6. ayda $1x10^8$ olarak belirtilmiştir.

Bu tez kapsamında yapılan raf ömrü çalışması sonuçlarına göre; daha önce yapılan çalışmalar ile sonuçlarımız desteklenmiştir. Yapılan raf ömrü çalışmaları ile oluşturulan formülasyonlarımızın gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacağı ve ümit verici olduğu görülmüştür.

Dünyada kök çürüklüğü hastalıkları tarımda en önemli sorunların başında gelmekte olup ciddi bir kimyasal ilaç kullanımı söz konusudur. Kök çürüklüğüne sebep olan farklı cinslere ait çok sayıda patojen türü olduğu için geliştirilen kimyasal pestisitlerin başarısı her zaman tartışılmaktadır. Bu çalışmada etkili bulunan biyoajanların çok geniş spektrumlu olmaları daha önce yürütülen pek çok çalışmada da görüldüğü izah edilmiştir. Bu yüzden ileride yapılacak çalışmalar ile bu biyoajanların ruhsatlı ticari ürüne dönüşmesi durumunda özellikle başta kök hastalıkları olmak üzere diğer pek çok fungal hastalığında bu biyopestisit formülasyonu ile kontrol edilebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak:

- İnsan sağlığı ve çevre kirliliği yönünden riskli olmayan, biyobozunur ve pestisite alternatif yerli formülasyonlar oluşturulmuştur.
- Oluşturulan bu formülasyonların, hıyarda Fusarium kök ve gövde çürüklüğü hastalığına karşı alternatif kimyasal ilaç uygulamasına kıyasla daha etkili olduğu belirlenmiştir.
- Oluşturulan formülasyonların antifungal etkinliklerinin yanında, bitki beslenmesine ve bitki büyümesine de önemli katkılar sağladığı tespit edilmiştir.
- 6 aylık muhafaza süresi boyunca yapılan çalışmalara göre oldukça başarılı raf ömrü sonuçları alınmıştır.

KAYNAKLAR

Abeysinghe, S., 2006. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, the causal agent of root and stem rot of *Cucumis sativus* by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. Ruhuna Journal of Science, 1, 24-31.

Agrios, G.N., 1997. Plant Pathology. San Diego, CA: Academic, 635.

Ahmad, R., Arshad, M., Khalid, A., Zahir, A., 2008. Effectiveness of organic-/bio-fertilizer supplemented with chemical fertilizers for ımproving soil water retention, aggregate stability, growth and nutrient uptake of maize (Zea mays L.). Journal of Sustainable Agriculture 31 (4), 57-75.

Ajilogba, C.F., Babalola, O.O. and Ahmad, F., 2013. Antagonistic effects of *Bacillus* species in biocontrol of tomato *Fusarium* wilt. Journal of Studies on Ethno-Medicine, 7(3), 205-216.

Akça, A. and Tozlu, E., 2019. Patlıcanda Kurşuni Küf Hastalığı Etmeni *Botrytis cinerea* ile Biyolojik Mücadele İmkanlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Akköprü, A. and Demir, S., 2005. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteri. Journal of Phytopathology, 153 (9), 544-550.

Aksoy, H.M. and Yılmaz, N.D.K., 2008. Antagonistic effects of natural *Pseudomonas putida* biotypes on *Polymyxa betae* Keskin, the vector of Beet necrotic yellow vein virüs in sugar beet. Journal of Plant Diseases and Protection, 115 (6), 241-246.

Aktaş, S., 2014. Domates Öz Nekrozuna Neden Olan Etmenlere Karşı PGPR ve Biyoajan Bakterileri Kullanılarak Kontrollü Koşullarda Biyolojik Mücadele Imkânlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Altın, N., 2004. Serada Hıyar *Fusarıum* Solgunluğu (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*)'na Karşı Biyolojik Savaş Odaklı Önlemler Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Altın, N. ve Bora, T., 2015. Serada hıyar *Fusarium* solgunluğu (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)'na karşı floresan Pseudomonasların etkinliğinin belirlenmesi. ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 3 (1), 63-71.

Altınok, H.H., Dikilitas, M., Yıldız, H.N., 2013. Potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates as biocontrol agents against *Fusarium* wilt of eggplant. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 27 (4), 3952-3958.

Altuğ, T., 2009. Gıda Katkı Maddeleri. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir.

Amer, G.A. and, Utkhede, R.S., 2000. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. Canadian Journal of. Microbiology, 46, (9), 809-816.

Anderson, A.J. and Kim, Y.C., 2018. Biopesticides produced by plant-probiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates. Crop Protection, 105, 62-69.

Andres, T.C., 2004. Web site for the plant family *Cucurbitaceae* & home of The *Cucurbit* http://www.cucurbit.org (22.10.2020).

Anith, K.N., Vaishakhi, A.S., Viswanathan, A. Varkey, S., Aswini, S., 2016. Population dynamics and efficiency of coconut water based liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* AMB-8. Journal of Tropical Agriculture, 54, 184-189

Anonim, 2010. Hıyar Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara.

Anonim, 2019. Türkiye İstatistik Kurumu. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 (15.08.2019).

Anonim, 2020a. Sürdürülebilir bir dünya için kurumsal çözümler. http://www.skdturkiye.org/files/yayin/surdurulebilir-tarim-ilkeleri-iyi-uygulamalar-rehberi_4.pdf (28.10.2020).

Anonim, 2020b. Dünyada gıda güvenliği ve beslenme durumu. http://www.fao.org/3/ca5249tr/ca5249tr.pdf (28.10.2020).

Anonim, 2020c. http://daytam.atauni.edu.tr/cihazlar/qiacube-qiagen-dna-rna-izolasyon-robotu/ (24.10. 2020).

Anonymous, 2016a. Biopesticides primed for growth. http://www.bioworksinc.com/in-the-news/2014_RiseOfBioPesticides_24pgs.pdf (20.08.2016).

Anonymous, 2016b. Study of the optimum growth conditions of *Bacillus subtilis* (strain WT 168), and *Pseudomonas fluorescens* (strain SBW25). Retrieved from iGEM Toulouse, http://2016.igem.org/wiki/images/e/e0/T--Imperial_College--ToulouseGrowthStudy.pdf (28.10.2020).

Anonymous, 2016c. New Biopesticides for IPM and Organic Production. http://www.birc.org/JulAug2011.pdf (Erişim Tarihi: 10.08.2016)

Anonymous, 2016d. Biopesticides: Where we stand?http://www.caes.uga.edu/topics/sustainag/documents/BioPesticides_Ohio_State0018.pdf (10.08.2018).

Anonymous, 2018. *Bacillus subtilis*. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_subtilis (15.11.2018).

Anonymous, 2020a. Crops. FAO, http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize (28.10.2020).

Anonymous, 2020b. Agricultural Biologicals/Biopesticides Market. https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/infographics/biopesticides-market-100073 (28.10.2020).

Aslan, E. ve Özaktan, H., 2005. Kök bakterileri tarafından konukçu bitkide hastalıklara karşı sistemik dayanıklılığın uyarılması. Anadolu Journal of Aegean Agricultural Research Institute, 15 (1), 84-100.

Aslan, E., 2011. Bitki Gelişiminş Arttıran *Bacillus subtilis* str. 66/3 ve *Pseudomonas putida* str. 18/1K'nın Biyogübre Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Performansları Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Atasever, M., Ceylan, Z.G., Çanakçı, G. ve Atasever, İ., 2007. Kaşar peyniri üretiminde laktik asit, asetik asit, sitrik asit ve glucano delta lakton kullanılması. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Dergisi, 2007, 2 (4), 153-158.

Aydın, İ., 2016. Halofitik Bitkilerin Rizosferinden İzole Edilen Halotolerant Bakteriler Kullanılarak Mısırda (*Zea Mays* L.) Tuz Stresi Toleransının Artırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Bandow, J.E., Brötz, H. and, Hecker,. M., 2002. *Bacillus subtilis* tolerance of moderate concentrations of rifampin ınvolves the B-Dependent general and multiple stress response. Journal of Bacteriology, 184 (2), 459-467.

Baset Mia, M.A., Shamsuddin, Z.H., Wahab, Z. and Marziah, M., 2010. Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation of tissue-cultures Musa plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. Australian Journal of Crop Science, 4 (2), 85-90.

Bashan, Y., 1998. Inoculants of plant growth promoting rhizobacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances, 16, 729-770.

Bashan, Y. and de-Bashan, L.E., 2002. Protection of tomato seedlings aganist infection by Pseudomonas *syringae* pv. *tomato* by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilens*. Applied and Environmental Microbiology, 6, 2637-2643.

Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R. and Hernandez, J.P., 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). Plant Soil, 378, 1-33. (2014). https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x

Basheer, J., Ravi, A., Mathew, J. and Krishnankutty, R.E., 2019. Assessment of plant-probiotic performance of novel endophytic *Bacillus* sp. in talc-based formulation. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 11 (1), 256-263.

Berninger, T., Mitter, B. and Preininger, C., 2016. The smaller, the better? The size effect of alginate beads carrying planl growth-promoting bacteria for seed coating. Journal of Microencapsulation, 33, 127-136.

Berninger, T., Mitter, B. and, Preininger, C., 2017. Zeolite-based, dry formulations for conservation and practical application of Paraburkholderia phytofirmans PsJN. Journal of Applied Microbiology. 122 (4), 974-986.

Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J., 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Current Opinion in Plant Biology, 4 (4), 343-350.

Blokhnina, O., 2000. Academic Dissertation. ISSN 1239-9469, ISBN 951-45-9631-5, ISBN 951-45-9632- 3, ISBN 951-45-9633.

Bodelier, P.L.E. and Laanbroek, H.J., 1997. Oxygen uptake kinetics of Pseudomonas chlororaphis grown in glucose-or glutamate-limited continuous cultures. Research Microbiology, 167, 392-395.

Bolwell, G.P. and Daudi, A., 2009. Reactive oxygen species in plant-pathogen interaction. (Signaling and communication in plants. Ed. del Rio LA, Puppo A). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 113-133.

Bora, T., Özaktan, H., Gore, E. and Aslan, E., 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. Journal of Phytopathology, 152 (8-9), 471-475.

Boşgelmez, A., Boşgelmez, İ.İ., Savaşçı, S. ve Paslı, N., 2001. Ekoloji – II (Toprak). Başkent Klişe Matbaacılık, Kızılay-Ankara.

Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N., 2005. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - an update. ALTEX 22, 87-102.

Bremner, J.M. and Mulvaney, C.S., 1996. Nitrogen–Total. In: Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties, Second Edition, Ed. A.L. Page, SSSA Book series, No: 9, Madison, 595-622.

Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. and Backhouse, D., 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. 3rd Department of Crop Sciences, University of Sydney.

Cabrefiga, J., Frances, J., Montesinos, E. and Bonaterra, A., 2014. Improvement of a dry formulation of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e for fire blight disease biocontrol by combination of culture osmoadaptation with a freeze-drying Iyoprotectant. Journal of Applied Microbiology, 117, 1122-1131.

Caesar, A.J. and Burr, T.J., 1991. Effect of conditioning, betaine, and sucrose on survival of rhizobacteria in powder formulations. Applied and Environmental Microbiology, 57, 168-172.

Campos, D.C., Acevedo, F., Morales, E., Aravena, J., Amiard, V., Jorquera, M.A, Inostroza, N.G. and, Rubilar, M., 2014. Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules. World Journal of Microbiology and Biotechnology, DOI 10.1007/s11274-014-1662-8.

Canbolat, M., Bilen, S., Çakmakçı, R., Sahin, F. and Aydın, A., 2006. Effect of plant growth promoting rhizobacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. Biology and Fertility of Soils, 42, 350-357.

Chakraborty, S., Tumpa, F.H. and Khokon, Md. A.R., 2020. Development of formulation of fluorescent pseudomonads and its evaluation on bio-management of blast of rice. Archives of Phytopathology and Plant Protection, DOI: 10.1080/03235408.2020.1826721.

Charpenter, C.A., Gadille, P. and, Benoit, J.P. 1999. Rhizobacteria microcapsulation: properties microparticles obtained by spray drying. Journal of Microencapsulation, 16 (2), ,215-229.

Choi, Y.M., Suh, H.J. and Kım, J.M., 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus sp.* KHU-10. Journal of Protein Chemistry, 20, 287-292.

Chung, S., Lim, J.H. and Kim, S.D., 2010. Powder formulation using heat resistant endospores of two multi-functional plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus* strains having phytophtora blight suppression and growth promoting functions. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 53, 485-492.

Çakar, G., 2020. Patates Kuru Çürüklük Hastalığı Etmeni *Fusarium Oxysporum* Schlect. Emend Snyd. & Hans.'ın Biyolojik Mücadele İmkânlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Çakmakçı, R., Dönmez, M.F., Canpolat, M. ve Sahin, F., 2005. Sera ve farklı tarla koşullarında bitki gelişimini teşfik edici bakterilerin bitki gelişimi ve toprak özelliklerine etkisi. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, Antalya, Cilt-1, 45-50.

Çakmakçi, R., Dönmez, F., Aydın, A. and Sahin, F., 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. Soil Biology & Biochemistry, 38 (6), 1482-1487.

Çakmakçı, R., Dönmez, M.F. and Erdoğan, Ü., 2007. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. Turkish J. Agric. For., 31, 189-199.

Çamlıca, E. and Tozlu, E., 2019. Biological control of *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) L.R. Jones and Grout in tomato. Fressenius Environmental Bulletin, 28 (10), 7092-7100.

Çelik, S., 2019. Pamukta Kırmızı Örümceğin Biyolojik Mücadele İmkanlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Çiftçi, M., Adıgüzel, A., Erat, M. ve Şahin, M., 2004. *Bacillus* sp. (BA-142) Bakterisinden glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin kısmen saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 35 (4), 151-158.

Dadasoglu, F., Karagöz, K., Kotan, R., Sarihan, F., Yildirim, E., Saraç, S. and Harmantepe, F.B., 2013. Biolarvicidal effects of nine *bacillus strains* against larvae of culex pipiens linnaeus, 1758 (diptera: culicidae) and nontarget organisms. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 23 (1), 35-42.

Dadaşoğlu, E., Öztekin, A., Dadaşoğlu, F., Çakmakçı, R., Kotan, R. and Çomaklı, V., 2017. Enzyme activities and effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth in mountain tea. Romanian Biotechnological Letters. 22 (3), 12538-12545.

Dandurand, L.M., Morra, M.J., Cahaverra, M.H. and Orser, C.S., 1994. Survival of *Pseudomonas spp.* In air dried mineral powders. Soil Biology and Biochemistry, 26, 1423-1430.

Daza, A., Santamaría, C., Rodríguez-Navarro, D.N., Camacho, M., Orive, R. and Temprano F., 2000. Perlite as a carrier for bacterial inoculants. Soil Biology and Biochemistry, 32, 567-572.

De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M.R., McSweeney, P.L.H., Faccia, M., Giovine, M. and Gobbetti, M., 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from Lactobacillus sanfrancisensis CB1, International Journal of Food Microbiology, 87, 259- 270.

Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak, A., 2005. Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, Ankara, 1-27.

Demirci, E. and Dane, E., 2003. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. from stem bases of Winter Wheat in Erzurum Turkey. Phytoparasitica, 3, 170-173.

Demirkan, E., Sevgi, T., Akcakoca, D., Ersoy, F., 2017. Partial purification, characterization and wheat bran degradation studies of a new phytase from the *Bacillus megaterium* EBD 9-1 strain. Turkish Journal of Biochemistry, DOI 10.1515/tjb-2016-0265.

Deng, P., Wang, X., Baird, S.M. and Lu, S-E., 2015. Complete genome of *Pseudomonas chlororaphis* strain UFB2, a soil bacterium with antibacterial activity against bacterial canker pathogen of tomato. Standards in Genomic Sciences, 10, 117.

Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M. and Chauhan, S.M., 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea L.*) by application of plant growthpromoting rhizobacteria. Microbiological Research, 159, 371-394.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y. and Vanderleyden, J., 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biology and Fertility of Soils 36, 284-297.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y., 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences, 22 (2), 107-149.

Ekinci, M., Turan, M., Yildirim, E., Güneş, A., Kotan, R. and Dursun, A., 2014. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth, nutrient, organıic acid, amıno acid and hormone content of cauliflower (*Brassica oleracea* l. var. *botrytis*) transplants. Acta Scientiarum Polonorum Horticulture, 13 (6), 71-85.

El-Toukhy, N.M.K., Youssef, A.S., Mikhail, M.G.M., 2013. Isolation, purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* MJA. African Journal of Biotechnology, 12 (20), 2957-2967.

Erdurmuş, D. ve Katırcıoğlu, Y.Z., 2008. Buğdayda önemli kök ve kök boğazı hastalık etmenlerine karşı *Trichoderma* harzianum'un etkinliğinin araştırılması. Bitki Koruma Bülteni, 48 (1), 37-48.

García de Salamone, I.E., Hynes, R.K. and Nelson, L.M., 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. Canadian Journal of Microbiology, 47, 404-411.

Gardiner, D.T. and Miller, R.W., 2008. Soils in Our Environment. 11th Edition, Pearson/Prentice Hall, Upper Saddle Hill, New Jersey, USA.

Ghasemi, S., Ahmadian, G., Sadeghi, M., Zeigler, D.R., Rahimian, H., Ghandilia, S., Naghibzadeh, N. and Dehestani, A., 2011. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. Enzyme and Microbial Technology, 48, 225–231.

Glare, T.R., Caradus, J. and Gelernter, W.D., 2012. Have biopesticides come of age?, Trends Biotechnology, 30, 250-258.

Glick, B.R., Karaturovíc, D.M. and Newell, P.C., 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. Canadian Journal of Microbiology, 41, 533-536.

Gong, Y.P., Toivonen P.M.A., Lau O.L. and Wiersma P.A., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple in related to its browing disorder. Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei Journal, 42, 259-264.

Gökçe, A.Y. ve Kotan, R., 2016. Buğday kök çürüklüğüne neden olan *Bipolaris sorokiniana* (sacc.)'ya karşı pgpr ve biyoajan bakterileri kullanılarak kontrollü koşullarda biyolojik mücadele imkanlarının araştırılması. Bitki Koruma Bülteni, 56 (1), 49-75.

Gutiérrez-Mañero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouachi, J., Tadeo, F.R. and Talon, M., 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus* pumilus and *Bacillus* licheniformis produce high amounts of physiologically active gibberellins. Physiologia Plantarum, 111, 206- 211.

Günay, A., 1993. Özel Sebze Yetiştiriciliği. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ankara.

Han, H.S., Supanjani and Lee, K.D., 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. Plant, Soil and Environment, 52 (3), 130-136.

Hassan, E. and Gökçe, A., 2014. Production and Consumption of Biopesticides. Advances in Plant Biopesticides, pp. 361-380, Singh, D., Ed., Springer, New Delhi, India.

Huang, P., He, Z., Ji, S., Sun, H., Liu, C., Hu, Y., Wang, X. and Hui, L., 2011. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. Nature, 475, 386-389.

İbrikçi, H., Gülüt, K.Y. ve Güzel, N., 1994. Gübrelemede Bitki Analiz Teknikleri. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:95, Adana.

İncekara, R., 2011. Hıyar Kök ve Kökboğazı Çürüklüğü Etmeni *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*' a Karşı Bitki Uçucu Yağlarının Antifungal Etkinlikleri. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.

Jamil, M., ur Rehman S., Ku Lee K.J., Kim J.M., Kim H-S., Rha, E.S., 2007. Salinity reduced growth PS2 photochemistry and chlorophyll content in radish. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.) vol. 64.

Javid, K.J., Mahdian, S., Behboudi, K. and Alizadeh A., 2016. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* by some *Trichoderma harzianum* isolates. Journal Archives of Phytopathology and Plant Protection. 49, (17-18), 471-484.

Jeon, J.S., Lee, S.S., Kim, H.Y., Ahn, T.S. and Song, H.G., 2003. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. Journal of Microbiology, 41, 271-276.

Jeyarajan, R. and, Nakkeeran, S., 2000. Exloitation of Microorganisms and Viruses as Biocontrol Agents for Crop Disease Management. In: Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture Biocontrol Potential and Their Exploitation ın Sustainable Agriculture, (Ed. Updhyay *et al.*), Kluver Academic/Plenum Publishers, pp. 95-116, USA.

Kabaluk, J.T., Svircev, A.M., Goette, M.S. and Woo, S.G., 2010. The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdictions worldwide. IOBC Global, http://www.iobc-global.org/download/Microbial_Regulation_Book_Kabaluk_ et_al_2010.pdf, 99 p, (22.10.2020).

Kacar, B. ve Katkat, V., 2010. Bitki Besleme. 5. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım Tic. Ltd. Şti, Kızılay-Ankara.

Kantarcı, M.D., 2000. Toprak İlmi. İ.Ü. Toprak İlmi ve Ekoloji Anabilim Dalı, İ.Ü. Yayın No. 4261, Orman Fakültesi Yayın No. 462, İstanbul.

Karaçalı, İ., 1993. Bahçe Ürünlerinin Muhafaza ve Pazarlanması. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. No: 494, Bornova/İzmir.

Karagoz, K., Dadasoglu, F., Mohammadi, P. and Kotan, R., 2018. Screening bacterial antagonists to common scab disease. The Journal of Animal & Plant Sciences, 28 (4), 1068-1073, ISSN: 1018-7081.

Karagöz, K., 2003. Bazı PGPR ve Biyoajan Bakterilerin Marulun Gelişimi ve Marul Yaprak Lekesi Hastalığı Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Karagöz, K., 2009. Bazı PGPR ve Biyoajan Bakterilerin Marulun Gelişimi ve Marul Yaprak Lekesi Hastalığı Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Karagöz, F.P., Dursun, A., Kotan, R., Ekinci, M., Yıldırım, E. and Mohammadi, P., 2016a. Assessment of the effects of some bacterial isolates and hormones on corm formation and some plant properties in saffron (*Crocus sativus* L.). Journal of Agricultural Science, 22, 500-511.

Karagöz, K., Dadaşoğlu, F. and Kotan, R., 2016b. Effect of some plant growth promoting and bioagent bacteria on degradation of organochlorine pesticides. Fresenius Environmental Bultein, 25 (5), 1348-1353.

Karagöz Parlakova, F., Demir, Y., Şenol Kotan, M., Beydemir, Ş., Dursun, A., Dikbaş N., 2020. Purification of the phytase enzyme from *Lactobacillus plantarum*: The effect on pansy growth and macro–micro element content. Biotechnology and Applied Biotechnology, DOI: 10.1002/bab.2026, 1-9.

Karlıdağ, H., Eşitken, A., Turan, M. and Sahin, F., 2007. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. Scientia Horticulturae, 114, 16-20.

Karthikeyan, B., Joe, M.M., Jaleel, C.A. and Deiveekasundaram, M., 2010. Effect of root ınoculation with plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on plant growth, alkaloid content and nutrient control of catharanthus roseus (L.). G. Don. Nat. Croat., 19 (1), 205-212.

Kaymak, H.C., Yaralı, F., Güvenç, İ. and Dönmez, M.F., 2008. The effect of inoculation with plant growth rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L.) cuttings. African Journal of Biotechnology, 7 (24), 4479-4483.

Khachatourians, G.G., 2009. Insecticides, microbials. Applied Microbiology: Agro, Food, 95-109.

Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. J. Trace Elements Med Biol, 18, 355-364.

Kırbağ, S. ve Parlak, Y., 1996. Elazığ'da yetiştirilen bazı sebzelerde görülen fungusların tespiti ve önemli bulunanın biyolojisi ve savaşı üzerine araştırmalar. F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 8 (2), 69-81.

Kiewnick, S., 2007. Practicalities of developing and registering microbial biological control agents. Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition And Natural Resources, 2, No: 013, 11 p.

Kloepper, J.W., 1993. Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. Soil Microbial Ecology, F. Blasne Metting, J. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 255-274.

Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K. and Scholz, S., 2012. Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environmental Science and Technology, 46, 9690-9700.

Kotan, R., 1998. Biber ve Domatesteki Bakteriyel Leke Hastalığı (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) dye.)'nin Biyolojik ve Kimyasal Kontrolü. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Kotan, R., Sahin, F., Demirci, E., Ozbek, A., Eken, C. and Miller, S.A., 1999. Evaluation of antagonistic bacteria for biological control of *Fusarium* dry rot of potato. Phytopathology, 89, p 41.

Kotan, R., 2002. Doğu Anadolu Bölgesi'nde Yetiştirilen Yumuşak Çekirdekli Meyve Ağaçlarından İzole Edilen Patojen ve Saprofitik Bakteriyel Organizmaların Klasik ve Moleküler Metotlar İle Tanısı ve Biyolojik Mücadele İmkânlarının Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Kotan, R. ve Sahin, F., 2002. Bitki hastalıkları ile biyolojik mücadelede bakteriyel organizmaların kullanılması. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 31 (1), 111-119.

Kotan, R., Sahin, F., Demirci, E. ve Eken, C., 2002. Patates (*Solanum tuberosum* L)'te kuru çürüklüğe sebep olan fungal patojenlerden *Fusarium solani*'ye karşı potansiyel bakteriyel etmenler kullanılarak biyolojik mücadele imkânlarının araştırılması. Türkiye V. Biyolojik Mücadel Kongresi, Erzurum.

Kotan, R., Sahin, F. and Ala, A., 2004. Nutritional similarity in carbon source utilization of *Erwinia amylovora* and its potential biocontrol agents. Journal of Turkish Phytopathology, 33 (1-3), 25-38.

Kotan, R. and Sahin, F., 2006. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and nutritional similarity in carbon source utilization of pathogen and its potential biocontrol agents. Journal of Turkish Phytopathology, 35 (1-3), 1-13.

Kotan, R., Sahin, F., Demirci, E. and Eken, C., 2009. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. Biological Control, 50, 194-198.

Kotan, R. ve Çelik, S., 2014. Mikrobiyal gübre ve biyopestisitlerin kullanımında dikkat edilmesi gereken hususlar. Harman Time, 14, 64-68.

Kotan, R., 2020. Tarımda biyolojik çözümler. Harman Yayıncılık, İstanbul.

Koul, O., 2011. Microbial biopesticides: opportunities and challenges, Perspectives in Agriculture. Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 6, No. 056.

Kurt, S., Baran, B., Sarı, N. and Yetisir, H., 2002. Physiologic races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in the southeastern anatolia region of Turkey and variteal reactions of races of the pathogen. Phytoparastica, 30 (4), 395-402.

Küçük, C., Kivanc M., Kinaci, E. and Kinaci, G., 2007. Biological efficacy of *Trichoderma harzianum* isolate to control some fungal pathogens of wheat (*Triticum aestivum*) in Turkey. Biologia, 62 (3), 283-286.

Lata, S., Rastogi, S., Kapoor, A., Imran, M. 2013. Optimization of culture conditions for the production of phytase from Aspergillus heteromorphus MTCC 10685. International Journal of Advanced Biotechnology and Research, 4(2), 224-235.

Lee, S-K., Lur, H-S., Lo, K-J., Cheng, K-C., Chuang, C-C., Tang, S-J., Yang, Z-W. and Liu, C-T., 2016. Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodopseudomonas palustris* strain PS3. Biotechnological Products and Process Engineering. 100, 7977-87.

Leeman, M., Van Pelt, A.J., Den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B., 1995. Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology, 85 (9), 1021-1027.

Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Black Well Scientific Puplication, 157 p, Oxford, USA.

Lemanceau, P., Steinberg, C., Thomas D.J.I., Edel, V., Raaijmakers, J.M. and Alabouvette, C., 2000. Natural Soil Suppressiveness to Soilborne Diseases. Fifth International PGPR Workshop, Cordoba-Argentina.

Li, L., Ma, J., Li, Y., Wang, Z., Ga, T. and, Wang, Q., 2012. Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. Crop Protection, 35, 29-35.

Limanska, N., Korotaeva, N., Biscola, V., Ivanytsia, T. and Merlich, A., 2015. Study of the potential application of lactic acid bacteria in the control of ınfection caused by *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Plant Pathology and Microbiology, 6:8, 292.

Liu, L., Kloepper, J.W. and Tuzun, S., 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology, 85, 695-698.

Lobo, C.,B., TomásTomas, M., S., J., Viruel, E., Ferrero, M., A. and, Lucca, M., E., 2019. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as noculants in beneficial agricultural Technologies,. Microbiological Research, 2019, 12-25.

Lucas Garcia, J.A., Probanza, A., Ramos, B., Ruiz Palomino, N. and Gutierrez Manero, F.J., 2000. Effects of Inoculation with PGPR on Seedling Growth of Different Tomato and Pepper Varieties in Axenic Conditions. Fifth International PGPR Workshop, Cordoba-Argentina.

Luck, H., 1965. Catalase. In: Methods of Enzymatic Assays. (Ed): HU Bergmeyer. New York, Academic Press: 885-894.

Luz, W.C., 2000. Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Graminicolous Crops in Brazil. Fifth International PGPR Workshop, Cordoba-Argentina.

Malusa, E., Sas-Paszt, L. and Ciesielska, J., 2012. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. The Scientific World Journal, Vol. 2012, Article ID 491206, doi:10.1100/2012/491206.

Mancebo, A., Molier, T., González, B. and Lugo, S., 2011. Acute oral, pulmonary and intravenous toxicity/pathogenicity testing of a new formulation of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* SH-14 in rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 59, 184-190.

Manjula, K. and, Podile, A.R., 2001. Chitin supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF1. Canadian Journal of. Microbiology, 47, 618-625.

Maranho, L.A., Botelho, R.G., Mitie-Inafuku, M., Nogueria, A.R., Alves de Olinda, R., Inacio de Sousa, B.A. and Tornisielo, V.L., 2014. Testing the neem biopesticide (*Azadirachta indica* A. Juss) for acute toxicity with *Danio rerio* and for chronic toxicity with *Daphnia magna.* Journal of Agricultural Science and Technology, 16, 105-111.

Martınez-Alvarez, J.C., Castro-Martinez, C., Sanchez-Pena, P., Gutierrez-Dorado, R. and Maldonado-Mendoza, I.E., 2016. Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. World J Microbiol Biotechnol, 32 (75).

Martyn, R.D. and Gordon, T.R., 1996. *Fusarium* Wilt of Melon. In: Zitter, T.A., Hopkins, D.L. and Thomas, C.D., (eds.), Compendium of Cucurbit Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn, USA, 14-15.

Martyn, R.D., 1996. *Fusarium* Wilt of Cucumber, 15-16 Compendium of cucurbit diseases. Zitter,T.A., Hopkins, D.L., and Thomas, C. E. (eds.), APS press, Minnesota, 87s.

Marz, U., 2005. World Markets for citric, ascorbic, ısoascorbic acids: highlighting antioxidants in food. Business Communications Company (Inc.): Food & Beverage Publications, http://www.bccresearch.com/report/ (12.03.2011).

McCauley, A., Jones, C., and Jacobsen, J., 2009. Nutrient management. nutrient management module 9 montana state university extension service. Publication, 4449 (9), 1-16.

McMillan, S. 2007. Promoting growth with PGPR. The Canadian Organic Grower, 32-34.

Melan, K., 2004. Zirai Mücadele İlkeleri ve Organik Tarımda Kullanılacak Yöntemler. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara.

Melin, P., Hakansson, S.„ Eberhard, T.H. and, Schnüiirer, J., 2006. Survival of the biocontrol yeast Pichia anomala afterlong-term storage in liquid formulations at differenttemperatures, assessed by flow cytometry. Journal of Applied Microbiology, ISSN 1364-5072.

Mertens, D., 2005. AOAC Official Method 922.02. Plants Preparation of Laboratuary Sample. Official Methods of Analysis, 18th edn. Horwitz, W., and G.W. Latimer, (eds). Chapter 3, pp1-2, AOAC-International Suite 500, 481. North Frederick Avenue, Gaitherburg, Maryland 20877-2417, USA.

Meyer, J.M., Geoffroy, V.A., Baida, M., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W. and Palleroni, N.J., 2002. Siderophore Typing, a Powerful Tool for the Identification of Fluorescent and Nonfluorescent Pseudomonads. Applied and Envıronmental Mıicrobiology, 68 (6), 2745-2753.

Miranda, J.E., Navickiene, H.M.D., Nogueira-Couto, R.H., De Bortoli, S.A., Kato, M.J., da Silva Bolzani, V. and Furlan, M., 2003. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). Apidologie, 34, 409-415.

Mirik, M., Aysan, Y. and Çınar, Ö., 2008. Biological control of bacterial spot disease of pepper with *Bacillus* strains. Turk. J. Agric. Forest, 32, 381-390.

Moënne-Loccoz Loccoz, Y., Naughton, M., Higgins, P., Powell, J., O'Connor, B., and O'Gara, F., (1999.) Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113. Journal of Applied Microbiology, 86, 108-116.

Mohammadı, P., 2018. Domates Bakteriyel Solgunluk ve Kanser Hastalığı Etmeni *Clavibacter Michiganensis* Subsp. *Michiganensis* (Smith) Davis *Et Al.*)'Nin Biyoajan Bakteriler

Kullanılarak Mücadele İmkânlarının Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Mohammadi, P. ve Kotan, R., 2014. Biberde bakteriyel leke hastalığının etmeni *xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın kontrolünde kullanılabilecek ve bitki gelişimi üzerine de etkili olan bakteriyel biyopestisitin geliştirilmesi. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, Antalya, Türkiye.

Molina-Romero, D., Baez, A., Quintero-Hernandez, V., Castaneda-Lucio, M., Fuentes-Ramírez, E., del Rocío Bustillos-Cristales, M., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y.E., Munive, A. and Munoz-Rojas, J., 2017. Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. Plos One, 12 (11), 1-21.

Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A. and, Vesey, G., 2006. Preservation of micro-organisms by drying; A review. Journal of Microbiological Methods, 66, (2), 183-193.

Morikawa, M., 2006. Beneficial biofilm formation by ındustrial bacteria *Bacillus* subtilis and related species. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101 (1), 1-8.

Muratçavuşoğlu, N. ve Hancıoğlu, Ö., 1995. Ankara ili buğday ekim alanlarında kök ve kök boğazı hastalıklarına neden olan *Fusarium* türlerinin tespiti üzerine araştırmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Adana, 174-177.

Mutlu, G., Kırbağ, S. ve Üstüner, T., 2015. Elazığ ili örtüaltı hıyar yetiştiriciliğinde görülen fungal hastalıkların belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 55(4), 341-360.

Nadaroğlu, H. and Demir, N., 1986. In vivo effects of chlorpyrifos and parathion methyl on some oxidative enzyme activıties ın chickpea, bean, wheat, nettle and parsley leaves. Fresenius Environmental Bulletin, 18 (5), 647-652.

Nakkeeran, S., Fernando, D.W.G. and, Siddiqui, Z.A., 2005. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Formulations and Its Scope In Commercialızation for The Management of Pests And Diseases. vol. 10, PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Ed: Siddiqui, Z.A., pp. 257-296, Springer Netherlands, .

Naz, F., Maqbool, A., Malik, K.A., 2013. Degradation of legume phytate in soil using fungal phytase. Pakistan Journal of Botany, 45(3) ,1017-1022.

Nielsen, M.N. and Sorensen, J., 1999. Chitinolytic activity of *Pseudomonas fuorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology, 30, 217-227.

O'Brien, K.P., Franjevic, S. and Jones, J., 2009. Green Chemistry and Sustainable Agriculture: The Role of Biopesticides. P: 50.

Oktay, E. and Benlioğlu, K., 2010. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. Biological Control, 53 (1), 39-45.

Oldaç, Ş., Ülke, G. ve Mirik, M., 2002. Domates Bakteriyel Leke Hastalığına (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) Karşı Biyolojik Mücadele Çalışmaları. Türkiye V. Biyolojik Mücadele Kongresi Bildirileri Kitabı, Erzurum, 391-398.

Orhan, E., Eşitken, A., Ercişli, S., Turan, M. and Şahin, F., 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield growth and nutrient contents in organically growing raspberry. Scientia Horticulturae, 111, 38-43.

Owen, J.H., 1956. Cucumber wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Phytopathology, 46, 153-157.

Özaktan, H. and Bora, T., 2006. Studies on biological control of fire blight with some antagonistic bacteria. Proceedings of the Xth International Workshop on Fire Blight, ACTA Horticulturea, 704, 337-340.

Özaktan, H. ve Gezen, M., 2002. Kültür Mantarında Bakteriyel Benek (*Pseudomonas Tolaasii*) Hastalığının Biyolojik Kontrolünde Fluoresant Pseudomonasların Etkisi Üzerine Bir Çalışma. Türkiye V. Biyolojik Mücadele Kongresi Bildirileri Kitabı, Erzurum, 371-380.

Özaktan, H., Kıdoğlu, F., Gül, A., Tüzel, Y., Özel, N. ve Aslan, E., 2009. Kök bakterilerinin topraksız ortamda yetiştirilen domates bitkisinde verime ve bakteriyel benek hastalığına (*Pseudomans syringae* pv. *tomato*) etkisi. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, Van, s 332.

Park, C.S., Paulizt, T.C., and Baker, R., 1988. Biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber resulting from interactions between Pseudomonas putida and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, 78, 190-194.

Parmar, N., and Dadarwal, K.R., 2000. Pathogenic Suppressive Abilities of Rhizosphere Bacteria From Healthy Chikpea Plants. Fifth International PGPR Workshop, Cordoba-Argentina.

Patten, C.L. and Glick, B.R., 1996. Bacterial bio-synthesis of indole-3-acedic acid. Canadian Journal of Microbiology, 42, 207-220.

Paulitz, T. C., 1991. Effect of *Pseudomonas putida* on the stimulation of *Pythium ultimum* by seed volatiles of pea and soybean. Phytopathology, 81, 1282-1287.

Perez, A.R., Abanes-De Mello, A. and, Pogliano, K., 2000. SpoIIB Localizes to Active Sites of Septal Biogenesis and Spatially Regulates Septal Thinning during Engulfment in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 182 (4), 1096-1108.

Pesenti-Barili, B., Ferdani, E., Mosti, M., and Degli-Innocenti, F., 1991. Survival of Agrobacterium radiobacter K84 on various carriers for grown gall control. Applied and Environmental Microbiology, 57 (7), 2047-2051.

Plaster, E.J., 1992. Soil Science and Management. 2nd Edition, Delmar Publishers Inc., Albany, New York, USA.

Poppy, G.M., 1997. Tritrophic interactions: improving ecological understanding and biological control. Endeavour, 21, 61-65.

Posada-Uribe, L.F., Romero-Tabarez, M., Villegas·-Escobar, V., 2015. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. Bioprocess and Biosystems Engineering, 38, 1879-88.

Prasad, A.A. and Babu, S., 2017. Compatibility of Azospirillum brasilense and *Pseudomonas fluorescens* in growth promotion of groundnut (*Arachis hypogea* L.). Anais da Academia Brasileira de Ciências, 89 (2), 1027-1040.

Pritts, M.P. and Handley, D.T., 1998. Strawberry Production Guide for the Northeast, Midwest, and Eastern Canada (NRAES-88), New York, USA.

Raghavendra, P. and Halamı, P.M., 2009. Screening, selection and characterizatio of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. International Journal of Food Microbiology, 133, 129-134.

Ramamoorthy, V., Raguchander, T. and Samiyappan, R., 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Plant Soil, 239, 55-68.

Rastegari, A.A., Yadav, A.N. and Yadav, N., 2020. Trends of microbial biotechnology for sustainable agriculture and biomedicine systems. Diversity and functional perspectives Elsevier, 243-282, Amsterdam.

Rivera-Cruz, M.D.C., Narcia, A.T., Ballona, G.C., Kohler, J., Caravaca, F. And , Roldan, A., 2008. Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops. Soil Biolog and Biochemistry, 40, 3092-3095.

Romerio, R.S., 2000. Preliminary results on PGPR research at the Universidade federal de viçosa, Brazil. Fifth International PGPR Workshop, Cordoba-Argentina.

Rosell, G., Quero, C., Coll, J. and Guerrero, A., 2008. Biorational insecticides in pest management. Journal of Pesticide Science, 33, 103-121.

Sahin, F., Çakmakçı, R. and Kantar, F., 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N2-fixing and phosphate solubilizing bacteria. Plant Soil, 265, 123-129.

San-Lang, W., Shih, I-L., Wang, C-H., Tseng, K-C., Chang, W-T., Twu, Y-K., Ro, J-J. and Wang, C-L., 2002. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. Enzyme and Microbial Technology, 31, 321-328.

Saravanan, T., Bhaskaran, R. and Muthusamy, M., 2004. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots against *Fusarium* wilt disease. Plant Pathology Journal, 3(2), 72-80.

Sarıbuğa, E., 2013. *Lactobacıllus plantarum* ve *Lactobacillus acıdophılus* Bakterilerinden Fitaz Enziminin Kısmen Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Sarma, M.V.R.K., Sharan, K., Prakash, A., Bisaria, V.S. and Shai, V., 2009. Application of Fluorescent pseudomonads inoculants formulations on *vigna mungo* through field trial. Internatioanal Journal of Biological and Life Science, 5, 25-29.

Selin, C., Habibian, R., Poritsanos, N., Athukorala, S.N.P., Fernando, D. And de Kievit, T.R., 2010. Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*, but do play a role in biofilm formation. FEMS Microbiology Ecology, 71 (1), 73-83.

Selvaraj, S., Ganeshamoorthi, P., Anand, T., Raguchander, T., Seenivasan, N. and Samiyappan, N., 2014. Evaluation of a liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Helicotylenchus multicinctus* in banana plantation. Bio Control, 59, 345-355.

Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N. and Kotan, R., 2014. Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum.* Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 13, 35-42.

Sezen, A., 2012. Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Nohut (Cicer arietinum L. cv. Aziziye-94) Bitkisinde Biyogübre Ajanı Olarak Kullanılabilme Potansiyellerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Shridhar, S.B., 2012. Review: Nitrogen fixing microorganisms. International Journal of Microbiological Research, 3 (1), 46-52.

Sindhu, S.S. and Dadarwal, K.R., 2001. Chitinolytic and cellulolytic Pseudomonas sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by Mesorhizobium sp. Cicer in chickpea. Microbiological Research, 156, 353–358.

Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S. and Chung, Y.R., 1999. Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology, 89, 92-99.

Singh, N., Pandey, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 2008. Biological control of root rot fungus macrophomina phaseolina and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* bn1. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24, 1669-1679.

Stephan, C.E., 1977. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. ASTM STP 634. Eds F.L. Mayer and J.L. Hamelink. Philadelphia P.A., 65-84, https://doi.org/10.1520/STP32389S.

Şahin, F., 2010. Organik bitkisel üretimde biyoteknoloji ve Ar-Ge, Türkiye IV. Organik Tarım Sempozyumu, Erzurum.

Şahinoğlu, E. and Tozlu, E., 2019. An investigation of biological control possibilities against *Fusarium proliferatum* on conic red pepper. 2st International Conference on Food, Agriculture and Animal Sciences (ICOFAAS), Antalya, Turkey.

Şenol, M., 2014. *Pseudomonas fluorescens ve Bacillus subtilis bakterilerinin Fusarium culmorum*'a Karşı Antifungal Etkinliği, Bakterilerden Elde Edilen Kitinaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Tekiner, N., Tozlu, E., Kotan, R. and Dadaşoğlu, F., 2018a. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* with bioagent bacteria and fungi under ın vitro conditions. International Congress on Vocational and Technical Sciences-II May 10-13, 2018 Batumi – Georgia, s: 97.

Tekiner, N., Tozlu, E., Kotan, R., Dadaşoğlu, F., 2018b. Biological control of *Coniella granati* saccardo in pomegranate ICOFAAS, International Conference On Food, Agriculture and Animal Sciences (ICAFAAS), Antalya, Turkey.

Tekiner, N., Tozlu, E., Kotan, R., 2019a. Domateste *alternaria alternata* (fr.) keissl'nın bazı bakteriler ile biyolojik mücadelesi, Bitki Koruma Bülteni, 59 (4), 57-68.

Tekiner, N., Tozlu, E. ve Kotan, R., 2019b. Portakalda antraknoz hastalığı *Colletotrichum gloeosporioides*'in biyolojik mücadele imkânlarının araştırılması. Atatürk Üniviversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 50 (3): 282-291.

Tekiner, N., Kotan, R., Tozlu, E. and Dadaşoglu, F., 2019c. Determination of some biological control agents against Alternaria rot in quince. Alinteri J. Of Agr. Sci., 34 (1): 25-31

Tekiner, N., Tozlu, E., Kotan, R. and Dadasoglu, F., 2020. Biological control of *Botrytis cinerae* and *Alternaria alternate* with bioagent bacteria and fungi under in vitro conditions. Fresenius Environmental Bulletin, 29 (1), 640-649.

Thakur, N., Kaur, S., Tomar, P., Thakur, S. and Yadav, A.N., 2020. Chapter 15 - Microbial biopesticides: Current status and advancement for sustainable agriculture and environment. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, 243-282.

Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U. and Tillberg, E., 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. Soil Biology and Biochemistry, 31, 1847-1852.

Todar, K., 2006. *Pseudomonas aeruginosa*. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas (28.10.2020).

Tok, F.M., 2010. Kavun ve Hıyar Patojen *Fusarium oxysporum* İzolatlarının Patojenste, Irk, Vejetatf Uyum Grubu ve Aflp Teknikleriyle Karakterizasyonu ve Dağılımları. Doktora Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.

Tombolini, R., van der Gaag, D.J., Gerhardson, B. and Jansson, J.K., 1999. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. Applied and Environmental Microbiology, 65 (8), 3674-3680.

Tozlu E., 2016. Bazı bakteriyel biyokontrol ajanlar ile havuç acı çürüklük hastalığı (*geotrichum candidum* link)'nın biyolojik mücadelesi. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 47(1), 1-9.

Tozlu, E., Mohammadi, P., Kotan, M. S., Nadaroglu, H. and Kotan, R., 2016. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de bary, the causal agent of white mold disease in red cabbage by some bacteria. Plant Protection Science, 52 (3): 188-198.

Tozlu, E., Tekiner, N. and Kotan R., 2018a. Screening of *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) isolates of domestic plant origin against different fungal plant pathogens for use as biopesticide. Fresenius Environmental Bulletin, 27 (6), 4232-4238.

Tozlu, E., Tekiner, N., Kotan, R. and Örtücü, S., 2018b. Investigation on the biological control of Alternaria alternate. Indian Journal of Agricultural Sciences 88 (8), 1241-1247.

Tozlu, E., Kotan, M. Ş., Tekiner, N., Dikbaş, N. and Kotan, R., 2019. Biological control of postharvest spoilage in fresh Mandarins (*Citrus Reticulata* Blanco) fruits using bacteria during storage. Erwerbs-Obstbau, 61 (2), 157-164.

Tunalı, B., Nicole, J.M., Hodson, D., Uçkun, Z., Büyük, O., Erdurmuş, D., Hekimhan, H., Aktaş, H., Akbudak, M.A. and Bağcı, S.A., 2008. Root and crown root fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. Plant Disease, 92 (12), 99-1306.

Uçkun, Z. ve Yıldız, M., 2004. İzmir, Aydın ve Denizli illeri buğday alanlarındaki kök ve kökboğazı hastalıklarının yoğunluğunun ve etmenlerinin belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 44 (1-4), 79-92.

Vakalounakis, D.J., 1996. Allelism of theFcu-1 andFoc genes conferring resistance to fusarium wilt in cucumber. European Journal of Plant Pathology, 102, 855-858.

Vakalounakis, D.J. and Fragkiadakis, G.A., 1999. Genetic diversity of *Fusarium* oxysporum isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD Fingerprinting. Ecology and Pouplation Biology, 89 (2), 161-168.

Vidhyasekaran, P. and Muthamilan, M., 1995. Development of formulations of pseudomonas fluorescens for control of chickpea. Wilt. Plant Dis., 79, 782-786.
Vitousek, P.M. and Howarth R.V., 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? Biogeochemistry, 13, 85-115.
Wall, L.G., 2000. Consequences of an Overview on PGPR Work in Argentina: The Field Should be Wider. Fifth International PGPR Workshop, Cordoba-Argentina.
Wang, S-L., Yen, Y-H., Tzeng, G-C. and Hsieh, C., 2005. Production of antifungal materials by bioconversion of shellfish chitin wastes fermented by *Pseudomonas fluorescens* K-188. Enzyme and Microbial Technology, 36, 49-56.
Wang, H-H., Huang J-J., Bi Rong., 2010. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. Plant Science, 179 (3), 281-288.
Whipps, J. M., 1992. Status of biological disease control in horticulture. Biocontrol Science and Technology, 2 (3), 24.
Wilson, E.O., 1990. First word. Omni, 12, 6.
Ye, Y., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. and Lu, C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorrhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. Environmental and Experimental Botan, 49 (3), 209-221.
Yordanova, R. Y., Christov, K. N. and, Popova, L. P., (2004). Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. Environmental and Experimental Botany, 51 (2), 93-101.
Zdor, R. and Anderson, A. J., 1992. Influence of root colonizing bacreria the defensee response on of bean. Plant Soil, 140, 99-107.
Zhang, Z., Yuen, G.Y., Sarath, G. and Penheiter, A.R., 2000. Chitinases from the Plant Disease Biocontrol Agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3.wilson. Biological Control, 91 (2), 204-211. G.N., 2005. Plant Pathology. Department of Plant Pathology, University of Florida, Academic Press, p. 635, Amsterdam.
Zhang, S., Miao, H., Yang, Y., Xie, B., Wang, Y. and Gu, X., 2014. A major quantitative trait locus conferring resistance to *Fusarium* wilt was detected in cucumber by using recombinant inbred lines. Molecular Breeding, 34, 1805-1815.
Zhang, H., Liu, Y. and Wang, G., 2018. Integrated use of maize bran residue for one-step phosphate bio-fertilizer production. Applied Biochemistry and Biotechnology, 187 (4), 1475-1487.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Merve ŞENOL KOTAN
Doğum tarihi:	31 Mayıs
Doğum Yeri:	Erzurum
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, ERZURUM
Tel:	-
E-mail:	mervesenol25@gmail.com
Eğitim	
Lise:	Tire Kutsan Anadolu Lisesi, İzmir (2008)
Lisans:	Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2012)
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı (2014)
Doktora:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı (2020)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
TMMOB Gıda Mühendisleri Odası	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
1. Tozlu, E., Şenol Kotan, M., Tekiner, N., Dikbaş, N., Kotan, R. 2018. Biological Control of Postharvest Spoilage in Fresh Mandarins (Citrus Reticulata Blanco) Fruits Using Bacteria During Storage, Erwerbs-Obstbau. 1-8.	