

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİTKİ AKTİVATÖRÜ OLARAK GELİŞTİRİLMİŞ “AkseBio” PREPARATININ
TOPRAK KÖKENLİ BAZI FUNGAL BİTKİ PATOJENLERİNE ETKİ
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Ragıp Soner SİLME

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

2004

**BİTKİ AKTİVATÖRÜ OLARAK GELİŞTİRİLMİŞ “AkseBio” PREPARATININ
TOPRAK KÖKENLİ BAZI FUNGAL BİTKİ PATOJENLERİNE ETKİ
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Ragıp Soner SİLME

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**Bu tez 2003.02.0121.006 no’lu proje olarak Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2004

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ AKTİVATÖRÜ OLARAK GELİŞTİRİLMİŞ “AkseBio” PREPARATININ
TOPRAK KÖKENLİ BAZI FUNGAL BİTKİ PATOJENLERİNE ETKİ
MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Ragıp Soner SİLME

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**Bu tez/...../2004 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından not takdir edilerek
oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.**

JÜRİ: Prof. Dr. Prof. Dr. Oktay YEĞEN (Danışman)

Doç. Dr. Hüseyin BASIM

Doç. Dr. Bülent SAMANCI

ÖZET

BİTKİ AKTİVATÖRÜ OLARAK GELİŞTİRİLMİŞ “AkseBio” PREPARATININ TOPRAK KÖKENLİ BAZI FUNGAL BİTKİ PATOJENLERİNE ETKİ MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Ragıp Soner SİLME

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Oktay YEĞEN

Mayıs 2004, 86 sayfa

Bu çalışmada “AkseBio” preparatının bitkilerde zararlı olan fungal patojenlere etki mekanizmaları araştırılmıştır. Söz konusu preparatlardan izole edilen bakterinin karbon kaynağı olarak kekik bitkisinden elde edilen eterik yağ, gliserin ve her ikisinin karışımını içeren besi ortamlarında yetiştirilip, 7 günlük gelişme süresi boyunca besi ortamından alınan örnekler ekstrakte edilerek ince tabaka kromatografisine (TLC) uygulanmıştır. Antifungal maddelerin saptanması için TLC playtlerinin üzerine *Fusarium moniliforme* miselleri püskürtülmüş ve gelişme olmayan bölgeler işaretlenmiştir. Sırası ile gelişme olmayan bölgelerin Rf’si; 0.56, 0.52 ve 0.61 olarak kaydedilmiştir. Bakterinin ürettiği ürünler kimyasal yapısı bilinen başka maddelerle karşılaştırılmış ve indol-3-asetik asitle aynı Rf değeri (0.62) verdiği tespit edilmiştir. Bakterinin 144 saatlik yetiştirme sonunda eterik yağlı ortamda 0.0158 mg/ml, carvacrol’lu ortamda 0.0192 mg/ml ve eterik yağ+gliserin içeren ortamda 0.065 mg/ml IAA ürettiği tespit edilmiştir. Ayrıca alınan örneklerdeki kitinaz aktivitesi, bakteri ve besi ortamı birbirinden ayrılarak ve ayrılmadan ölçülmüştür. Ölçüm yapılan tüm zamanlarda (48, 96, 154 ve 240 saat), sadece bakteri ve bakteri+besi ortamı bazında kitinaz aktiviteleri tespit edilmiştir. Buna karşın, ilk 48 saat içinde besi ortamlarında, kitinaz aktiviteleri çok düşük seviyelerde bulunmuş, 96 saatlik inkübasyonu takiben yapılan ölçümlerde ise gliserin içeren besi ortamları hariç bütün besi ortamlarında kitinaz aktivitesinin yükseldiğini ve bu seviyenin 240’ıncı saate kadar devam ettikleri gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar bakterinin eterik yağlı ortamda ve eterik yağ+gliserin içeren ortamda kitinolitik enzimler ürettiğini göstermiştir.

Modifiye edilmiş PDA içeren ortamlarda bakterinin, toprak kökenli fungal fitopatojenler olan *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* ve *Phytophthora capsici*'ye etkisi incelenmiş ve bakterinin fitopatojenlerin gelişimini eterik yağla birlikte olduğu zaman, sadece eterik yağın etkisinden daha çok negatif yönde etkilediği tespit edilmiştir.

Bakterinin bitki aktivatörü olarak etkinliğinin tespiti için AkseBio, steril edilmiş AkseBio ve Kontrol (musluk suyu) grupları bitkiye sulama suyu olarak uygulanmıştır. Deneme sonunda yapılan ölçümler canlı bakteri içeren AkseBio preparatının uygulandığı grubun, steril edilmiş AkseBio ve Kontrol (musluk suyu) gruplara göre bitki gelişimini istatistiki olarak önemli derecede olumlu etkilediği tespit edilmiştir.

Çalışmada ortaya çıkan sonuçlar, AkseBio preparatında önemli bir miktarda mevcut olan kekik yağının bakteriyel parçalanması sonucunda antifungal maddelerin, indol-3-asetik asit ve kitinolitik enzimlerin üretildiğini göstermektedir. Bitki denemeleri sonucunda AkseBio preparatında mevcut bakterinin bitki gelişimini olumlu etkilediği tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: AkseBio, bitki aktivatörü, TLC, indol-3-asetik asit, antipatojen, kitinaz

JÜRİ: Prof. Dr. Oktay YEĞEN (Danışman)

Doç. Dr. Hüseyin BASIM

Doç. Dr. Bülent SAMANCI

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF “AkseBio”, THE PRODUCT DEVELOPED AS A PLANT ACTIVATOR, FOR THE EFFECT MECHANISM TO SOME FUNGAL SOILBORNE PLANT PATHOGENS

Ragıp Soner SİLME

**M.Sc. in Plant Protection
Adviser: Prof. Dr. Oktay YEĞEN
May 2004, 86 pages**

In this study, the mechanisms behind antifungal properties of a product “Aksebio” were examined. The bacteria isolated from the product were grown on different media containing essential oils from thyme, glycerin or essential oil+glycerin as carbon sources and the extracted samples taken during 7 days growth period were applied on TLC plates. After application mycelia of *Fusarium moniliforme* to TLC plates, antifungal properties of the preparation were determined as zone of inhibition on the plates with Rf values of 0.56, 0.52 and 0.61. The metabolites of bacteria are compared to the substances which the chemical structure is known and it is found that it is giving the same Rf value (0.62) with indole-3-acetic acid. At the end of growth period of 144 hours for the bacteria the amount of IAA produced by bacteria is: in the medium with essential oil 0.0158 mg/ml, in the medium with carvacrol 0.0192 mg/ml and in the medium of essential oil+glycerol 0.065 mg/ml. Furthermore, chitinase activities were collectively measured in bacteria+media and individually in bacteria and media after separation. Chitinase activities were present in only bacteria and bacteria+media at any time growth points (48, 96, 154 and 240 hours). However, the activities were almost absent in medial parts of samples taken after 48 hours of growth, whereas except in the medium containing glycerin, the bacteria excreted increasing chitinase in to the medium after 96 hours of incubation and this continued through 240 hours. These results show that bacteria are producing chitinolytic enzymes in the medium with essential oil or essential oil+glycerin.

In the medium that contains modified PDA, effect of bacteria to the soilborne fungal phytopathogens, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phytophthora capsici* is examined and it's determined that the growth of phytopathogens is more effected negatively than the essential oil when the essential oil and bacteria are applied together.

To determine the plant activator efficiency of the bacteria AkseBio, sterilized AkseBio and Control (tap water) groups are applied to plant for water requirements. The measurements at the end of experiment showed that the treated group of product AkseBio which has living bacteria is effecting plants' growth statistically more important than sterilized AkseBio and control (tap water) group.

The results from this study determined that by the bacterial degradation of essential oil which contains important part of the product AkseBio antifungal substances, indole-3-acetic acid and chitinolytic enzymes are produced. On the base of the results of experiments with plant, it is also determined the bacteria in product AkseBio is effecting growth of plant positively.

KEY WORDS: AkseBio, plant growth regulator, TLC, indole-3-acetic acid, antifungal, chitinase

COMMITTEE: Prof. Dr. Oktay YEĞEN (Adviser)
Assoc. Prof. Dr. Hüseyin BASIM
Assoc. Prof. Dr. Bülent SAMANCI

ÖNSÖZ

Yurdumuzda yüksek miktarlarda bilinçsizce kullanılan kimyasal ilaçların hem doğaya hem de insanlara zararlı olduğu bilinmektedir. Bu gerçek karşısında araştırmacılar olarak bizlere alternatif çözümler aramak yolunda büyük görevler düşmektedir. Bu bilinç içinde bu araştırmada, halen tarımda kullanılan kimyasal ilaçlara alternatif bir çözüm bulmak üzere üretilmiş bulunan AkseBio preparatının toprak kökenli bazı fungal bitki patojenlerine etki mekanizması araştırılmıştır.

Yapılan bu çalışmanın tümü Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın bütün aşamalarında gerekli olan tüm laboratuvar tekniklerini araştırmam ve öğrenmem konusunda beni teşvik eden, her türlü desteği sağlayan ve hiçbir yardımı esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Oktay YEĞEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmada projenin finansal olarak desteklenmesini sağlayan Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu'na, yardımlarından dolayı sayın Doç. Dr. Hüseyin BASIM'a, sayın Doç. Dr. Bülent SAMANCI'ya, sayın Doç. Dr. Salih ÜLGER'e, sayın Dr. Cengiz İKTEN'e ve Bitki Koruma Anabilim dalımızdaki bütün Öğretim üyelerine de yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	3
2.1. Eterik Yağın Antimikrobiyal Potansiyeli Üzerine Araştırmalar.....	3
2.2. <i>Enterobacter</i> spp. ile İlgili Çalışmalar.....	10
2.3. Eterik Yağ ve Benzeri Kimyasalları Parçalayan Mikroorganizmaların Ürettikleri Ürünlerle İlgili Çalışmalar.....	19
3. MATERYAL ve METOD.....	28
3.1. AkseBio Preparatından Eterik Yağı Parçalayan Mikroorganizmanın İzolasyonu	28
3.2. Bakterinin Karbon Kaynağı Olarak Eterik Yağ, Gliserin ve Carvacrol Kullanılan Ortamda Yetiştirilmesi.....	28
3.3. Bakterinin Yetiştirildiği Karbon Kaynağına Bağlı Olarak Ürettiği Ürünlerin İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemi ile Saptanması ve Fungitoksik Etkisinin İncelenmesi.....	29
3.4. Bakterinin Yetiştirildiği Karbon Kaynağına Göre İndol-3-asetik Asit Üretiminin Tespiti.....	31
3.5. Bakterinin Yetiştirildiği Karbon Kaynağına Göre Kitinaz Aktivitesinin Tespiti.....	32
3.6. Bakterinin Toprak Kökenli Bazı Fungal Patojenlere Olan Etkisi.....	34
3.6.1. Araştırmada kullanılan toprak kökenli bazı fungal patojenler.....	34
3.6.2. Bakterinin toprak kökenli fungal patojenlere olan antagonistik etkisinin belirlenmesi.....	34
3.7. Bakterinin Bitki Aktivatörü Olarak Etkinliğinin Belirlenmesi.....	35

4. BULGULAR.....	37
4.1. AkseBio Preparatında Eterik Yağı Parçalayan Mikroorganizmaların Tanısı.....	37
4.2. Bakterinin Karbon Kaynağı Olarak Eterik Yağ, Gliserin ve Carvacrol Kullanılan Ortamda Yetiştirilmesine Bağlı Olarak Ürettiği Ürünlerin İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemi ile Saptanması ve Fungitoksik Etkisinin İncelenmesi.....	37
4.3. Bakterinin Yetiştirildiği Karbon Kaynağına Göre İndol-3-asetik Asit Üretiminin Tespiti.....	53
4.4. Bakterinin Yetiştirildiği Karbon Kaynağına Göre Kitinaz Aktivitesinin Tespiti.....	56
4.5. Bakterinin Toprak Kökenli Bazı Fungal Patojenlere Olan Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi.....	58
4.6. Bakterinin Bitki Aktivatörü Olarak Etkinliğinin Belirlenmesi.....	64
5. TARTIŞMA.....	70
6. SONUÇ.....	73
7. KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrad derece
µl	Mikro litre
ml	Mili litre
mM	Mili molar
nm	Nanometre
kDa	Kilo Dalton

Kısaltmalar

dk	Dakika
dev	Devir
rpm	Repeat per minute = dakikada devir sayısı
UV	Ultraviole ışığı
PDA	Patates Dekstroz Agar
IAA	Indol-3-asetik asit
sd	Standart deviation = Standart sapma
TLC	Thin Layer Chromatography = İnce tabaka kromatografisi
Solvent A	Kloroform:Aseton (9:1) karışımı
Solvent B	Toluen:Etilasetat:Formik asit (5:4:1) karışımı
EB	Eterik yağ içeren bakterili ortam
GB	Gliserin içeren bakterili ortam
EGB	Eterik yağ ve gliserin karışımı içeren bakterili ortam
CB	Carvacrol içeren bakterili ortam
EK	Eterik yağ içeren bakterisiz kontrol ortamı
GK	Gliserin içeren bakterisiz kontrol ortamı
EGK	Eterik yağ ve gliserin karışımı içeren bakterisiz ortam
CK	Carvacrol içeren bakterisiz kontrol ortamı
Bak+Be.O	Bakteri ve bakterinin geliştirildiği besi ortamının bir arada bulunması
GliCarvacrol	Gliserin ve Carvacrol karışımı içeren ortam
pH.D.Gli	pH düzenlemesi yapılmış gliserinli ortam

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kekik (<i>Thymus vulgaris</i>) bitkisinde mevcut monoterpenlerin formülleri (Gouyon vd 1983).....	7
Şekil 2.2. <i>Enterobacter cloacae</i> 'de bitki hormonu indole-3-asetik asidin biyosentezi için indole-3-pyruvic asit yolu(Schütz vd 2003).....	13
Şekil 2.3. Bitki tohumu veya kökü üzerinde bir bakterinin Etilen miktarını azaltması ve indole üretimi(Glick vd 1998).....	14
Şekil 2.4. İndole ve türevleri (Webster vd 2002).....	16
Şekil 2.5. β -lactam halkasının β -lactamase tarafından parçalanması (Anonymous 2004).....	18
Şekil 4.1. Bakterili ve bakterisiz ortamların zamana bağlı olarak pH seviyelerindeki değişim.....	37
Şekil 4.2. Karbon kaynağına bağlı olarak zamana göre bakteri sayısındaki değişim.....	38
Şekil 4.3. Deneme 1'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü.....	39
Şekil 4.4. Üzerine fungus süspansiyonu püskürtülmüş, deneme 1'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü.....	40
Şekil 4.5. Üzerine Sülfürik asit-Metanol karışımı püskürtülmüş, deneme 1'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının görüntüsü.....	41
Şekil 4.6. Deneme 1'e göre hazırlanmış bakterili ortamların ve kimyasal yapısı bilinen maddelerin, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü.....	42
Şekil 4.7. Bakterili ve bakterisiz deneme 2 ortamlarında zamana bağlı olarak pH seviyelerindeki değişim.....	43
Şekil 4.8. Deneme 2 karbon kaynağına göre hazırlanmış ortamlarda bakteri gelişiminin zamana göre değişimi.....	44
Şekil 4.9. Deneme 2'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü.....	45

Şekil 4.10. Üzerine fungus süspansiyonu püskürtülmüş, deneme 2'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü.....	46
Şekil 4.11. Üzerine fungus süspansiyonu püskürtülmüş, deneme 2'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının normal ışık altında görüntüsü.....	46
Şekil 4.12. Deneme 2'e göre hazırlanmış bakterili ortamların ve kimyasal yapısı bilinen maddelerin, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü.....	47
Şekil 4.13. Deneme 2'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent B'de geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü.....	48
Şekil 4.14. Üzerine Salkowski reagent püskürtülmüş, deneme 2'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent B'de geliştirilmiş plakalarının görüntüsü.....	49
Şekil 4.15. Deneme 2'e göre hazırlanmış bakterili ortamların ve kimyasal yapısı bilinen maddelerin, Solvent B'de geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü.....	50
Şekil 4.16. Deneme 2'e göre hazırlanmış bakterili ortamların ve kimyasal yapısı bilinen maddelerin, Solvent B'de geliştirilmiş plakalarının normal ışık altında görüntüsü.....	50
Şekil 4.17. Üzerine Sülfürik asit-Metanol karışımı püskürtülmüş, deneme 2'e göre hazırlanmış bakterili ortamların ve kimyasal yapısı bilinen maddelerin, Solvent B'de geliştirilmiş plakalarının görüntüsü.....	51
Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonlarda IAA'nın ve bakterinin ürettiği indole'un karşılaştırması.....	52
Şekil 4.19. Karbon kaynağına bağlı olarak ortamların pH'larının zamanla değişimi.....	53
Şekil 4.20. Karbon kaynağına bağlı olarak ortamlardaki bakteri sayısının zamanla değişimi.....	54
Şekil 4.21. Karbon kaynakları 2.deneme için hazırlanmış bakterili ve bakterisiz ortamlardan alınan numunelerde Salkowski reagent uygulaması sonucu indole miktarına göre renk değişimi.....	55

Şekil 4.22. <i>Rhizoctonia solani</i> denemesi.....	58
Şekil 4.23. Normal <i>Rhizoctonia solani</i> misellerinin mikroskopta incelenmesi.....	59
Şekil 4.24. Eterik yağ içeren ortamda <i>Rhizoctonia solani</i> misellerinin mikroskopta incelenmesi.....	59
Şekil 4.25. Bakteri içeren ortamda <i>Rhizoctonia solani</i> misellerinin mikroskopta incelenmesi.....	60
Şekil 2.26. Bakteri içeren ortamda <i>Rhizoctonia solani</i> misellerinin mikroskopta incelenmesi.....	60
Şekil 4.27. <i>Fusarium moniliforme</i> denemesi.....	61
Şekil 4.28. <i>Phytophthora capsici</i> denemesi.....	62
Şekil 4.29. Salatalık bitkilerinde bitki gelişmesindeki farklılıklar.....	64
Şekil 4.30. Salatalık bitkilerinde kök ve tüm bitki gelişmesindeki farklılıklar.....	67
Şekil 4.31. Salatalık bitkilerinde yaprak alanlarındaki farklılıklar.....	67
Şekil 4.32. Muamelelerin yaprak yaş ağırlığına etkisi.....	68
Şekil 4.33. Muamelelerin yaprak kuru ağırlığına etkisi.....	68
Şekil 4.34. Muamelelerin kök yaş ağırlığına etkisi.....	69
Şekil 4.35. Muamelelerin yaprak alanı değerine etkisi.....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Denemelerde kullanılan A besi ortamının içeriği.....	28
Çizelge 4.1. Bakterili ve bakterisiz deneme 1 ortamlarında zamana bağlı olarak pH seviyelerindeki değişim.....	38
Çizelge 4.2. Bakterili ve bakterisiz deneme 2 ortamlarında zamana bağlı olarak pH seviyelerindeki değişim.....	43
Çizelge 4.3. Karbon kaynağına bağlı olarak ortamların pH'larının zamanla değişimi.....	53
Çizelge 4.4. Karbon kaynağına bağlı olarak ortamlardaki indol miktarının zamanla değişimi.....	54
Çizelge 4.5. Karbon kaynağına bağlı olarak ortamlardaki indol miktarının zamanla değişimi.....	55
Çizelge 4.6. Bakterinin kitinaz aktivitesine göre absorbans değerindeki değişim.....	57
Çizelge 4.7. Bakterinin toprak kökenli bazı fungal patojenlere olan antagonistik etkisinin istatistiki incelenmesi.....	63
Çizelge 4.8. Salatalık bitkisine AkseBio, Steril edilmiş AkseBio ve Kontrol (musluk suyu) uygulaması sonucunda elde edilen verilerin istatistiki incelenmesi.....	66

1. GİRİŞ

Tıbbi bitki, baharat ve buna benzer bir çok bitkinin kullanımı çok eskilerden beri bilinmektedir. Bitkilerin tıbbi amaçlarla kullanımı M.Ö. 3000 – 5000 yıllarında Sümer ve Ege medeniyetlerine kadar dayanır. Bu bitkilerin yararlı olduğunun bilinmesine rağmen bunların kültüre alınmamasından dolayı kullanım alanları doğal olarak yetiştiği yerlerde sınırlı kalmıştır.

Bu bitkilerin büyük bir çoğunluğu kendilerine has karakteristik kokulara sahip olup, bu kokular bitkilerin içermiş oldukları yağlardan kaynaklanmaktadır. Bitkilerin içerdikleri bu yağlar normal yağlardan farklı ve buharlaşma özelliği göstermektedir. Bu yüzden bitkilerin içerdikleri yağlara uçucu yağ, eterik yağ veya esans gibi isimler verilmektedir. Bitkilerin içerdikleri bu yağlar tek bir bileşikten değil, çok sayıda bileşiklerden oluşmuş maddelerdir. Bunların en önemlileri hidrokarbon, alkol, aldehid, keton ve ester yapılı bileşiklerdir.

Günümüzde tarım alanlarında, hastalıklar ve zararlılarla mücadelede aşırı kullanılan kimyasallar çevre kirliliğine sebep olmaktadır. Bu kimyasalların yerine, eterik yağ içeren bitkilerden faydalanılıp faydalanılamıyacağı uzun zamandır araştırılmaktadır. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nde sürdürülen araştırmalarda eterik yağ içeren bazı bitkilerin toprak kökenli fungal patojenlere olan etkileri denenmiştir. Bu konuda yürütülen Yüksek lisans tez çalışmalarında, eterik yağın fungitoksik potansiyeli (Çakır 1992), ekotoksikolojisi (Ünlü 1995), toprakta parçalanabilme durumu (Baysal 1997) ve pratikte kullanılabilirliği (Gümrükçü 2001) saptanmıştır.

Tez çalışmaları haricinde yapılan başka araştırmalarla da eterik yağın fungitoksik potansiyeli (Çakır ve Yeğen 1991, Yeğen vd 1992, Müller-Riebau vd 1994, Müller-Riebau vd 1995, Müller-Riebau vd 1996, Yeğen vd 1998), toprakta parçalanabilme durumu (Baysal ve Yeğen 1997) ve antibakteriyel etkisi (Basım vd 2000, Yeğen vd 2002) saptanmıştır.

Bu çalışmada daha önce yapılmış çalışmalarla geliştirilmiş olan “AkseBio” isimli, içeriğini *Thymbra spicata* uçucu eterik yağı, bitkisel yağlar ve bitki zleri oluşturan preparatın doğada mikrobiyolojik olarak parçalanması sonucu oluşan maddeler ve oluşan bu maddelerin bazı bitki patojeni funguslara olan etkisi araştırılmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

Bitki aktivatörü olarak geliştirilmiş “AkseBio” preparatının toprak kökenli bazı fungal bitki patojenlerine etki mekanizmasının bir parçası olan kekik eterik yağının ve benzeri kimyasalların mikroorganizmalar tarafından parçalanması sonucu oluşan ürünlerle ilgili literatüre pek fazla rastlanamamıştır.

Bitki patojenleriyle biyolojik mücadelede çeşitli mikroorganizmaların kullanımı uzun zamandan beri süregelmektedir. Günümüzde *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Gliocladium virens*, *Trichoderma* spp. mikroorganizmaları preparat haline getirilerek hem bitki hastalık etmenleriyle mücadele edilmekte hem de bitki gelişimi teşvik edilmektedir (Handelsman ve Stabb 1996).

2.1. Eterik Yağın Antimikrobiyal Potansiyeli Üzerine Araştırmalar

Vokou ve Liotiri (1999), eterik yağların toprak mikroorganizmalarına olan etkisini araştırmışlardır. Mikrobiyal etkinliğin tespiti için zamana bağlı olarak çıkan karbondioksit miktarı incelenmiştir. *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha spicata*, *Coridothymus capitatus* ve *Lavandula angustifolia* bitkilerinin yağlarını ayrı ayrı aromatik bitkilerin yetiştirildikleri ve yetiştirilmedikleri toprakların üst kısmından alınan örneklerle uygulamışlardır. Aromatik bitkilerin yetiştirilmediği, daha evvel eterik yağa maruz kalmamış toprak örneklerinde bile mikrobiyal aktivitenin yükseldiği tespit edilmiştir.

Daferera vd (2000), bazı aromatik bitkilerin eterik yağlarının içeriklerini ve bu eterik yağların *Penicillium digitatum*'a etkilerini incelemişlerdir. *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* ve *Origanum dictamnus* eterik yağlarının fenolik bileşiklerce zengin olduğunu ve sırası ile toplam yağın %65.8, %71.1 ve %78.0'ını oluşturduğunu tespit etmişlerdir. *Origanum majorana* yağının %42.1'i hidrokarbonlardan, %24.3 alkollerden ve %14.2 fenollerden oluşmaktadır. *Lavandula angustifolia* Mill. %58.8 alkollerden, %32.7 esterlerden oluşmaktadır. *Rosmarinus officinalis* ve *Salvia fruticosa* eterik yağları sırası ile %88.9 ve %78.0 eter içermektedir. *O. vulgare*, *T. vulgaris*, *O. dictamnus*

ve *O.majorana* eterik yağları 250-400 µg/ml gibi düşük konsantrasyonlarda *Penicillium digitatum* gelişmesi tam olarak engellenmiştir. *L. angustifolia*, *R. officinalis* ve *S. fruticosa* eterik yağları *P. digitatum*'u düşük düzeyde engellemiştir.

Arras ve Usai (2001), çeşitli bitkisel eterik yağların, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Botrytis cinerea* ve *Alternaria citri*'ye fungitoksik etkisini incelemişlerdir. Sonuçta *Thymus capitatus* (L.) Hofm. eterik yağının 4 fungusunda gelişmesini 250 ppm (vol/vol) düzeyinde kuvvetli bir fungitoksik etki ile engellediği saptanmıştır. Diğer eterik yağlar 250 ppm (vol/vol) düzeyinde fungusların gelişmesini % 9 ila % 95 arasında azaltmıştır. *T. capitatus* eterik yağları 75, 150 ve 250 ppm düzeyinde, desikatör içerisine yerleştirilmiş ve üzerlerine *P. digitatum* 10⁸ konidi ml⁻¹ püskürtülmüş olan sağlıklı portakal meyvelerinde atmosferik basınçta düşük bulunmuştur ve % 3-10 arasında engelleme bulunmuştur oysaki vakum uygulamasında (0.5 bar) konidi ölümü yüksek bulunmuştur ve %90-97 seviyesinde engelleme gözlenmiştir. Bu veriler ışığında istatistiki olarak thiabendazole – TBZ (2000 ppm) uygulamaları kadar etkilidir. Elektron mikroskopu incelemeleri *T. capitatus* eterik yağının buharlarının *P. digitatum* konidilerinin morfolojisini etkilediğini göstermiştir.

Guynot vd (2003), çeşitli bitki eterik yağlarının hamur ürünlerinde bozulmaya neden olan *Eurotium amstelodami*, *E. herbariorum*, *E. repens*, *E. rubrum*, *Aspergillus flavus*, *A. niger* ve *Penicillium corylophilum*'a etkisini incelemişlerdir. Kekik eterik yağı ve diğer bitkisel yağların bu fungusların gelişimini engelledikleri saptanmıştır.

Bouchra vd (2003), Labiatae familyasından çeşitli bitkilerin eterik yağlarının içerikleri ve *Botrytis cinerea*'ya antifungal etkisi incelenmiştir. İncelenilen bitkiler arasında *Origanum compactum* ve *Thymus glandulosus* eterik yağının misel gelişimini engellediği tespit edilmiştir. Her iki bitkinin yağı da 100 ppm dozunda uygulandığında %100 engelleme gerçekleşmiştir. *Mentha pulegium* 250 ppm düzeyinde uygulanınca ortalama düzeyde etki göstermiştir ve misel gelişimini %58,5 engellemiştir. Çalışılan yağların ana içerikleri de incelenmiş ve *T. glandulosus* ve *O. compactum*'un ana içerikleri olan Thymol ve Carvacrol'un 100 ppm'de %100 engellemeye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Giamperi vd (2002), çeşitli bitkilerin eterik yağlarının *Phytophthora cinnamomi* Rads., *Pyrenochaeta lycopersici* Kleb. ve *Verticillium dahliae* Kleb.'e etkilerini incelemişlerdir. Kekik yağının bu funguslara fungistatik ve fungisit etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Velluti vd (2003), tarçın ve yabani mercanköşk eterik yağlarının mısır tohumunda *Fusarium proliferatum* gelişimini ve fumonisin B1 üretimini engellediği tespit edilmiştir.

Velluti vd (2004), yabani mercanköşk eterik yağının *Fusarium graminearum* tarafından zearalenone ve deoxynivalenol üretimini azalttığını saptamışlardır.

Soliman ve Badeaa (2002), kekik ve cinnamon (500 ppm) eterik yağlarının *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* ve *Fusarium moniliforme* gelişimini tamamen engellediği belirtilmiştir.

Suhr ve Nielsen (2003), kekik eterik yağının çavdar ekmeğinde bozulmaya yol açan fungusların gelişimini engellediğini tespit etmişlerdir.

Inouye vd (2000), çeşitli eterik yağların buhar etkisinin *Aspergillus fumigatus* gelişimine etkisini incelemişlerdir. Engelleme etkilerine göre bu gruplar 3 grup olarak sınıflandırılmıştır. İlk grup Citron (*Citrus medica* Linn.), lavanta ve çay ağacı yağından oluşmaktadır ve gelişmeyi havada 63 µg ml⁻¹ dozunda engellemiştir ancak buhar ortamdan uzaklaşınca tekrar gelişme gözlenmiştir. İkinci grup; Perilla (*Perilla frutescens*) ve lemongrass (*Cymbopogon citratus*) yağlarından oluşmaktadır ve havada 6.3 µg ml⁻¹ dozu gelişmeyi engellemiştir ve daha sonra gelişim gözlenmemiştir. Üçüncü grup; Cinnamon bark (*Cinnamomum zeylanicum*) ve kekik yağlarından oluşmaktadır. Bu yağların havada 6.3 µg ml⁻¹ dozunda bulunması gelişmeyi geciktirmiştir, 63 µg ml⁻¹ dozunda ise durdurmuştur ama buhar uzaklaşınca gelişmeyi tam durdurmamıştır. Gaz kromotografik analizler eterik yağ buharlarının fungal miseller ve agar ortam tarafından adsorbe edildiğini ve bunun sırası ile en yüksek birinci grupta sonrada ikinci ve üçüncü

gruplarda olduğu gözlenmiştir. Bu sonucun bu grupların buharlaşabilme özelliği ile ilgili olduğu tespit edilmiştir.

Horváth vd (2002), ince tabaka kromatografisi yöntemi ile *Thymus* fenollerinin antibakteriyel özelliğini incelemişlerdir. Thymol ve Carvacrol'un *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* ve *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*'ya antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir.

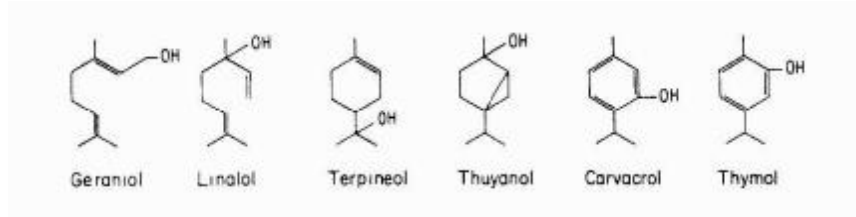
Inouye vd (2001a), çeşitli eterik yağların solunum yolu hastalıklarına neden olan bakterilere antibakteriyel etkisini seyreltme metodu ile araştırmışlardır. Eterik yağlardan aldehid veya phenol'u esas komponent olarak içerenler en yüksek antibakteriyel aktiviteye sahiptir, diğer eterik yağlar terpen keton veya eter içerenler daha düşük aktiviteye sahiptir. Bu verilerden yola çıkarak kekik, cinnamon bark, lemongrass, perilla ve nane yağları daha sonraki araştırmalar için seçilmiştir.

Inouye vd (2001b), eterik yağların ve bu yağların komponentlerinin gaz hallerinin çeşitli solunum yolu patojenlerine etkisini incelemişlerdir. Buhar etkisine göre minimum engelleme dozu (MED) tespit edilmiştir. Test edilen 14 eterik yağ içerisinde cinnamon bark, lemongrass ve kekik yağları en düşük MED'e sahiptir, onları ana içerik olarak terpen alkollerini içeren eterik yağlar takip etmektedir. Terpen keton, eter ve hidrokarbon içeren eterik yağlar yüksek MED'e sahiptir. Bu çalışma sonunda eterik yağın antibakteriyel etkinliği, en yüksek etkiye kısa bir süre için yüksek bir konsantrasyonda ulaşmaktadır.

Inouye vd (2001c), çeşitli eterik yağların *Trichophyton mentagrophytes* ve *T. rubrum*'a buhar etkisini ve Minimum engelleme dozunu incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonunda cinnamon bark yağının en az etkiye sahip olduğunu, ve onu sırası ile lemongrass, kekik ve perilla yağlarının izlediği belirtilmiştir. Lavanta ve çay ağacı yağı orta derecede MED'e sahiptir ve citron yağı en yüksek MED'e sahiptir. Cinnamon bark yağıyla kıyaslanınca 320 kat yüksek MED citron yağında mevcuttur. Buhar etkisinin daha detaylı incelenmesi sonucunda Lemongrass, kekik ve perilla yağının havada 1-4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'de mevcut olunca konidiyi öldürdüğu, tomurcuklanmayı engellediğini ve hif

gelişmesini engellediğini, buna karşın lavanta yağının havada 40-160 µg ml⁻¹ miktarda bulununca etkili olduğunu saptamışlardır.

Dorman ve Deans (2000), çeşitli bitki eterik yağlarının antibakteriyel özelliğini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonunda en geniş antibakteriyel etkinliğe *Thymus vulgaris* L. bitkisinden elde edilen eterik yağların sahip olduğu belirtilmiştir. Daha sonra etkinlik bakımından sırası ile *Origanum vulgare* spp. *hirtum*, *Syzygium aromaticum*, *Myristica fragrans*, *Piper nigrum*, *Pelargonium graveolens* eterik yağları gelmektedir. Bu eterik yağların bileşiklerinin de antibakteriyel etkisi incelenmiş ve thymol'un en yüksek etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra etkinlik bakımından sırası ile Carvacrol, α-terpineol, terpinen-4-ol, eugenol, (±)-linalool, (-)-thujone, δ-3-carene, cis-hex-3-an-1-ol, geranyl acetate, (cis+trans) citral, nerol, geraniol, menthone, β-pinene, R(+)-limonene, α-pinene, α-terpinene, borneol, (+)-sabinene, γ-terpinene, citronellal~terpinolene, 1.8-cineole, bornyl acetate, carvacrol metil eter, myrcene, β-caryophyllene, α-phellandrene, α-humulene, β-ocimene, aromadendrene ve p-cymene gelmektedir.



Şekil 2.1. Kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinde mevcut monoterpenlerin formülleri (Gouyon vd 1983)

Varel ve Miller (2001), yaptıkları bir çalışmada α-pinene, limonene, camphor, geraniol, borneol, fenchol, thymol ve carvacrol gibi bitkisel kökenli yağların depolanmış hayvan gübresindeki toplam anaerobik bakterilerin ve dışkısal koliformların gelişmesine etkisini incelemişlerdir. Thymol ve Carvacrol'un en etkili yağlar olduğu ve dışkısal koliformlarını tamamen yok ettiği ve toplam anaerobik bakterilerin sayısını azalttığı tespit edilmiştir.

Hammer vd (1999), çeşitli eterik yağların antimikrobiyal etkisini incelemiştir. Kekik eterik yağının 3/10000 (v/v) seyreltmede bile *Candida albicans* ve *Escherichia coli* gelişimi engellediğini saptamışlardır.

Pina-Vaz vd (2004), çeşitli kekik türlerinin antifungal etkisini incelemiştir. Kullanılan kekik türleri *Thymus vulgaris*, *T. zygis* subspecies *zygis* ve *T. mastichina* subspecies *mastichina*'dır. Yapılan bu çalışmanın sonunda antifungal etkinin yağların ana komponentlerini oluşturan carvacrol, thymol, p-cymene ve 1.8-cineole'den kaynaklandığını tespit etmişlerdir. *T. vulgaris* ve *T. zygis* yağlarının benzer antifungal aktiviteye sahip olduğu ve *T. mastichina* yağının bu iki yağa nazaran daha düşük etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Minimum engelleme değerinin üstünde fungusun gelişmesini önemli derecede engellediği tespit edilmiştir. Bu çalışma ile kekik yağlarının *Candida* spp'ye antifungal etkisi ve *Mucocutaneous candidosis*'e karşı gelecekte kullanılabilirliği incelenmiştir.

Abe vd (2003), *Candida albicans*'ın 100 µg/ml *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris*, *Pogostemon cablin* ve *Cedrus atlantica* eterik yağı içeren ortamlarda gelişmesinin engellendiği tespit edilmiştir.

Ultee vd (1999), farklı konsantrasyonlarda Carvacrol'un besin kökenli patojen *Bacillus cereus*'a etkilerini incelemiştir. 0,25 ve 1 mM Carvacrol'un hücrenin sitoplazmik membranında protonlar ve potasyum iyonları için geçirgenliğinde bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir.

Ultee vd (2000a), pirinçte Carvacrol uygulamasının *Bacillus cereus*'a etkisini incelemiştir. 0,15 mg/g ve üstü miktarların gelişmeyi engellediğini ve bu engellemenin aşılamanın inokulum miktarına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Carvacrol'un pirinçin tat ve aromasına etkisini azaltmak için yapısal olarak analogu olan cymene'le kombine edilmiştir. 0,30 mg/g Carvacrol ile 0,27 mg/g cymene kombine edildiği zaman bir sinerjistik etki saptanmıştır. Ayrıca soya sosu gibi bir tat düzenleyicisinde *Bacillus cereus*'a karşı Carvacrol'un antimikrobiyal etkinliğini arttırdığını saptamışlardır.

Ultee vd (2000b), besin kökenli patojen *Bacillus cereus*'un Carvacrol'e adaptasyonunu incelemişlerdir. *B. cereus*'un Carvacrol'u metabolize edemediğini ancak antibakteriyel etkisinden kurtulmak için hücre membranı yapısında değişiklikler oluşturduğunu belirtmişlerdir. Carvacrol içeren ortamlarda hücre membranının lipidlerinin faz değiştirme sıcaklığının (buharlaşma sıcaklığı) 20.5°C'den 12.6°C'ye düştüğünü ve 0.4 mM Carvacrol'e dayanabilen hücrelerin adaptasyon yapmayan hücrelere göre daha düşük bir membran lipid akışına sahip olduğunu saptamışlardır. Carvacrol'un ilk eklenmesi sonucunda hücre membranının lipidlerinin buharlaşma sıcaklığının 20.5°C'den 12.6°C'ye düştüğünü, daha sonra 0.4 mM Carvacrol'e adapte olan hücrelerde hücre membranı lipidlerinin buharlaşma sıcaklığının 20.5°C'den 28.3°C'ye yükseldiğini saptamışlardır. Ayrıca adaptasyon sırasında hücre membranı yağ asidi kompozisyonundaki değişikliklerde takip edilmiş ve iso-C_{13:0}, C_{14:0} ve iso-C_{15:0} miktarında bir artış ve cis-C_{16:1} ve C_{18:0} miktarında bir azalış tespit edilmiştir.

Fan ve Chen (2001), su ve etanolle hazırlanmış kekik ekstraktlarının, kekik eterik yağının, thymol ve carvacrol'un antimikrobiyal etkinliğini incelemişlerdir. Bütün bu maddelerin *Staphalococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli*'ye gelişme engelleyici yüksek bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Burt ve Reinders (2003), kekik ve yabancı mercanköşk eterik yağının *Escherichia coli*'ye bakterisit etkiye sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Elektron mikroskobu gözlemleri eterik yağa maruz *E. coli* hücrelerinde morfolojik değişiklikler göstermiştir.

Friedman vd (2002), çeşitli bitkisel eterik yağların bakterisit etkisini incelemişlerdir. İncelenen bitkiler arasında kekik eterik yağının da *E. coli*, *L. monocytogenes* ve *Salmonella enterica*'ya etkili olduğu bildirilmiştir.

Bagamboula vd (2004), kekik eterik yağının *Shigella sonnei* ve *S. flexneri* gelişimini engellediğini belirtmişlerdir.

Tabak vd (1996), sulu kekik ekstraktının insanlarda ülseri neden olan *Helicobacter pylori*'nin gelişimini engellediğini tespit etmişlerdir.

Manou vd (1998), kekik eterik yağının kozmetik ürünleri vb alanlarda antimikrobiyal koruyucu olarak etkinliğini incelemişlerdir. Eterik yağın *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bulaşmalarına karşı koruyucu olarak etkin görev yaptığını saptamışlardır.

Smith-Palmer vd (1998), kekik eterik yağının besin kökenli önemli patojenlerden *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes*'in gelişmesini engellediğini ve antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Smith-Palmer vd (2002), kekik eterik yağının insanlarda hastalık yapan *Listeria monocytogenes* bakterisine etkisini incelemişlerdir. Bakterinin enfeksiyon yapmak için salgıladığı ekstrasellüler proteinlerden listeriolysin O üretimini önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir.

Fabio vd (2003), çeşitli bitkilerin eterik yağlarının besin kökenli çeşitli patojen bakterilere etkisini incelemişlerdir. Kekik eterik yağının *Aeromonas hydrophila*'ya antibakteriyel etki gösterdiğini ve gelişmesini engellediğini tespit etmişlerdir.

2.2. *Enterobacter* spp. ile İlgili Çalışmalar

Mitzkat (2001), uçucu yağ komponentlerinin antibakteriyel etkili olduğunu fakat bazı bakterilerin bu yağ komponentlerini parçalayabildiğini tespit etmiştir. Bu bakteriler içerisinde Enterobacteriaceae familyasından da bakterilerin yer aldığı belirtilmiştir.

Burkhead vd (1998), *Fusarium sambucinum* Fuckel'la biyolojik mücadele de kullanılan *Enterobacter cloacae* S11:T:07 (NRRL B-21050) bakterisinin Sabouraud Maltose Broth ortamında yetiştirilince antifungal bir ürün olan fenilasetik asit ürettiği tespit edilmiştir. Üretilen bu bileşiğin aynı zamanda bitkilerde gelişme hormonu olarak görev aldığı belirtilmiştir.

Van Dijk ve Nelson (2000), *Enterobacter cloacae* strainlerinin ve *Pythium ultimum*'un, bitki tohumlarının toprakta çimlenme sırasında salgıladıkları doymamış, uzun zincirli yağ asitlerinden yararlanma durumları incelenmiş ve bakterinin bu asitlerden yararlanamayan mutantlarının *Pythium ultimum*'a etkili olamadıkları tespit edilerek, yağ asitlerinden yararlanma ile *Pythium ultimum*'a karşı toprakta baskın olma arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Kageyama ve Nelson (2003), *E. cloacae*'nin, farklı bitki türlerinde tohum salgılarının *Pythium ultimum* sporangiyum çimlenmesine uyarıcı etkisini durdurma yeteneği incelenmiştir. Biyolojik kontrol denemelerinde *E. cloacae*'nin havuç, pamuk, salatalık, marul, turp, domates ve buğdayda *Pythium* çürüklüğünün kontrolünde etkili olmuş ancak mısır ve bezelyenin korunmasında başarılı olamamıştır. Mısır ve bezelye gibi bitkilerin tohumlarında yüksek oranlarda salgılama vardır, oysaki pamuk ve salatalık tohumlarında çok düşük oranlarda salgılanım vardır. Test edilen çeşitli bitkilerde tohum salgılarından numunelerle *P. ultimum* sporangiyum çimlenmesi teşvik edilmiştir. Havuç, mısır, marul, bezelye, turp ve buğday gibi bitkilerin salgıları genellikle *P. ultimum*'u pamuk, salatalık, ayçiçeği ve domates'in salgılarından daha uyarıcıdır. Ama bu *E. cloacae*'nin salgının uyarıcı özelliğini önleyen ve *P. ultimum*'un sporangiyum çimlenmesini azaltıcı etkisiyle direkt olarak ilgili değildir. Toprakta tohum bölgesinde, *E. cloacae* mısır ve bezelye haricinde bütün bitki türlerinde tohum salgısının uyarıcı aktivitesini azaltmıştır. Mısır ve bezelye tohumlarını *Pythium* çürüklüğünden koruyamamasının nedeni direkt olarak tohum salgılarının uyarıcı aktivitesini engelleme yeteneği ile ilgilidir. Diğer test edilen bitkilerde *E. cloacae*, çürüklüğe ve tohum salgılarının uyarıcı etkisine baskın etki etmiştir.

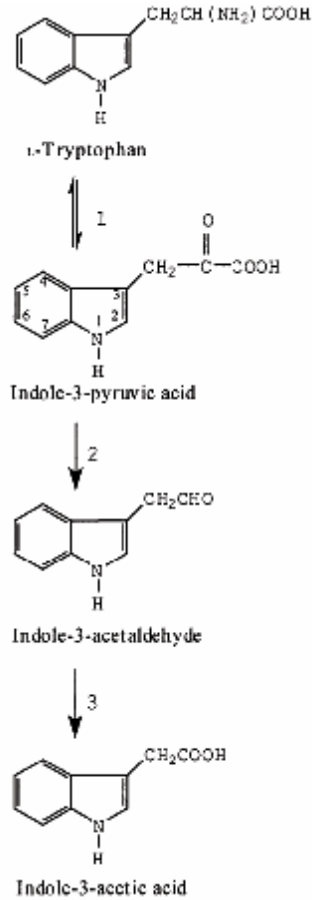
Roberts vd (1999), *Enterobacter cloacae* 501R3 ırkını ve onun hıyar tohumu etrafında kolonizasyon ve mevcut karbonhidratlardan faydalanma bakımından yetersiz transpozon mutanı A-11 ırkını incelemişlerdir. A-11 ırkı in vitro geliştirilmesinde, 501R3 ırkının gelişmesini destekleyen pek çok karbonhidratlardan faydalanamamıştır ama früktoz, gliserin ve test edilen diğer tüm aminoasitlerden ve organik asitlerden faydalanabilmiştir. A-11 ırkının, 501R3 ırkı ile kıyaslanınca hıyar ve turp tohumlarında önemli ölçüde kolonizasyonu da azalmıştır ama bezelye, soya fasulyesi, ayçiçeği ve

mısır tohumlarında kolonizasyonu azalmamıştır. Bezelye tohumları, toprağa hıyar ve turp tohumlarından daha fazla aminoasit, karbonhidrat ve yaklaşık 4000 kat daha fazla früktoz salgılamaktadır. Tohum eksüdatları içinde tespit edilen früktoz, A-11 ırkının in vitro da gelişmesi sonucunda doğal ırklar kadar kolonize olmasını sağlayan tek karbonhidrattır. Soya fasulyesi, ayçiçeği ve mısır tohumları da hıyar ve turp tohumlarına göre önemli miktarlarda früktoz, karbonhidrat ve aminoasit açığa çıkarmıştır. Hıyar ve turp tohumlarına, bezelye tohumlarının toprağa salgıladığı toplam karbonhidrat miktarına yakın miktarlarda früktozun dışarıdan ilavesi sonucunda steril toprakta 501R3 ırkının ulaştığı miktarlara A-11 ırkının populasyonları 96 saatte ulaşmıştır. A-11 ırkının moleküler karakterizasyonu, mini-Tn5 transpozonu mutasyonunun Fosfofrüktokinazı kodlayan pfkA ile önemli bir sekans benzerliği gösteren genomun bir bölgesinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bilinen bir pfkA mutanlığı olan *Escherichia coli* DF456 ile A-11 ırkının karşılaştırması beslenmeden kaynaklanan fenotiplerin kaybının aynı olduğunu göstermiştir. Daha sonra *E. cloacae* 501R3'den klonlanan pfkA homoloğu *E. coli* DF456 ve *E. cloacae* A-11'deki beslenme eksiklik fenotiplerini tamamlayıcı görev almıştır ve A-11'in kolonizasyonu doğal ırklarla aynı seviyeye ulaşmıştır. Bu genetik ve biyokimyasal deneyler, tohum eksüdatlarında indirgenmiş karbon kaynaklarının miktarları ve mikroorganizmaların tohum etrafında kolonizasyonunda bu bileşiklerden faydalanma yeteneği konusunda bir delil teşkil etmektedir.

Howell vd (1988), *Enterobacter cloacae* ırklarının fidelerde ve hasat sonrası hastalıklarda, fungal gelişimi engellediği tespit edilmiştir. Bakterinin amonyak gibi bazı uçucu bileşimler salgıladığını ve bakteri tarafından salgılanan bileşiklerin antifungal etkiye sahip oldukları belirlenmiş, *Pythium* ve *Rhizoctonia*'ya etkiye bulunduğu tespit edilmiştir. Özellikle dört ırktan üçünün 25°C'de metalaxyl kadar etkili olduğu belirlenmiştir.

Bitki hormonları bitki büyümesi ve gelişiminde önemli roller almaktadır. İlk tespit edilen bitki hormonu indol-3-asetik asittir (IAA) ve bitkiler ve bitkiyle yakın ilişkili bakteriler tarafından sentezlenmiştir. Pek çok IAA sentez yolu tanımlanmıştır, ve pek çoğu prekursor olarak L-tryptophan'la başlamaktadır. *Enterobacter cloacae*, IAA sentezinde tryptophan bağımlı biyosentez yollarından biri indolpyruvic asit yoludur. Bu

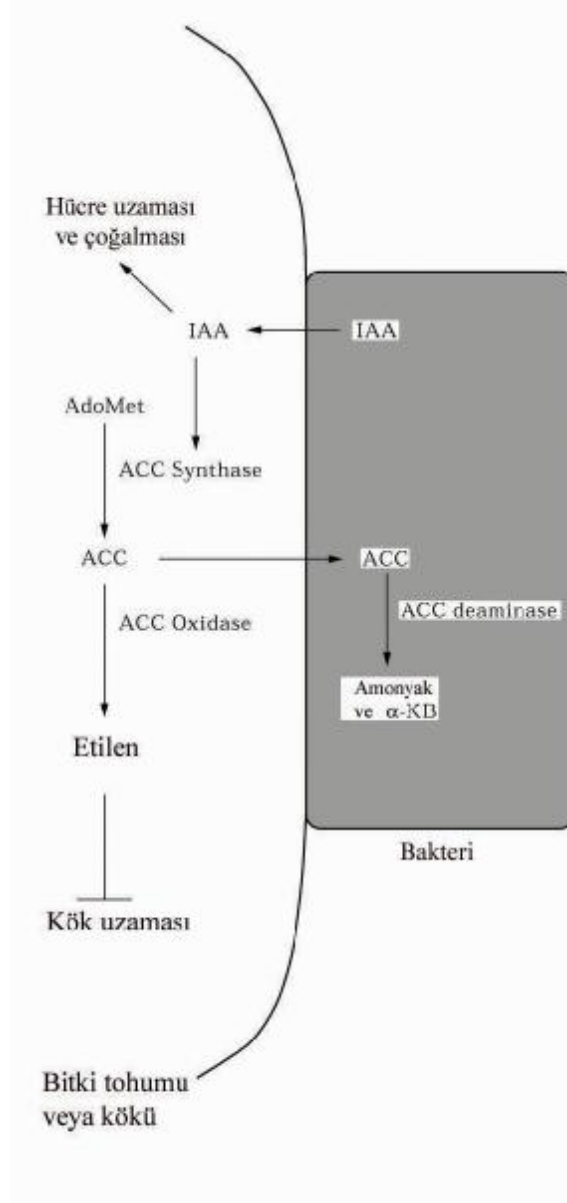
yol L-tryptophan'dan başlar ve üç adımda oluşur: a) tryptophan'ın indole-3-pyruvic aside çevrimi; b) indole-3-acetaldehyde'in oluşturulması; ve c) IAA'nın üretilmesi (Şekil 2.2.). Bu sentez yolunun ilk adımı L-tryptophan aminotransferase (Bir pyridoxal-5-phosphate-bağımlı enzim) tarafından katalizlenmektedir. Ortadaki adım, IPA, indolepyruvate decarboxylase (IPDC) tarafından dekarboksile olur ve sonuçta indole-3-acetaldehyde bir aldehyde oxidase tarafından oksitlenir ve IAA oluşur (Schütz vd 2003).



Şekil 2.2. *Enterobacter cloacae*'de bitki hormonu indole-3-asetik asidin biyosentezi için indole-3-pyruvic asit yolu. 1. L-tryptophan aminotransferase, 2. indolepyruvate decarboxylase, 3. indoleacetaldehyde oxidase (Schütz vd 2003)

Glick vd (1998), tarafından bakterilerin bitkilerde Etilen konsantrasyonlarını azaltmasının bitki gelişimini olumlu etkilediğinin belirtmişlerdir. Şekil 2.3.'de gösterildiği gibi bakteri bitki bünyesindeki etilen'in prekursoru, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate'i (ACC), bakteri tarafından ACC deaminase enzimiyle parçalanmakta ve

amonyak ve α -Ketobutyrate'a çevirilmektedir. Bakteri tarafından üretilen indole-asetik asit bitki bünyesine verilmektedir. Etilen'in miktarca azalması kök uzamasına engelleyici etkisini azaltmaktadır. Bitki bünyesine verilen IAA, ACC synthase enzimini teşvik etmektedir ve S-adenosyl-methionine'den ACC oluşumu ACC synthase enzimi aracılığıyla gerçekleşmektedir.



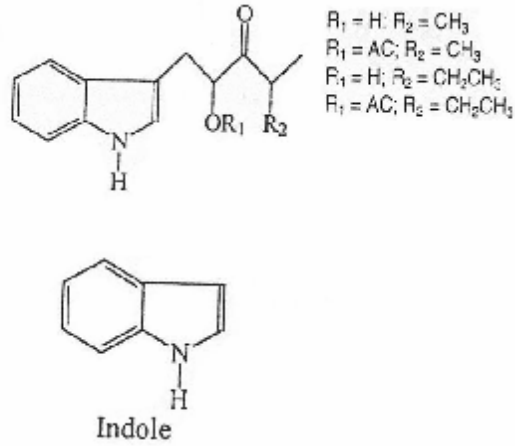
Şekil 2.3. Bitki tohumu veya kökü üzerinde bir bakterinin Etilen miktarını azaltması ve indole üretimi. Kısaltmalar: $\perp$ işareti etilenin kök uzamasını engellemesi anlamına gelmektedir. IAA, indoleasetik asit; ACC, 1 aminocyclopropane-1-carboxylic asit; AdoMet, S-adenosyl-methionine; α -KB, α -ketobutyrate (Glick vd (1998) değiştirilerek alınmıştır.)

Shah vd (1998), *Enterobacter cloacae* ırkında 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase enziminin bitki etilen derecelerinde bir azalmaya yol açarak köklerin uzamasına sebep olduğunu ve bu şekilde bitki gelişimini desteklediğini saptamışlardır.

Li vd (2000), *Enterobacter cloacae* ırkında ACC deaminase negatif bir mutantın kanola bitkisinde kök gelişimini artırmadığını saptamışlardır.

Mirza vd (2001), azot bağlayan, fitohormon üreten bir bakterinin, doku kültürü yöntemiyle üretilen şeker kamışı fidelerinde gelişime etkilerini incelemişlerdir. Tarlada gelişen bitkilerde saptan ve köklerden izole ettikleri azot bağlayan bakteriyel izolatlar morfolojik, karakteristik ve biyokimyasal testlere bağlı olarak *Enterobacter* sp. olarak tespit edilmiştir. Saptan izole edilen bir izolatın 16s rRNA sekans analizi yapılmış ve *Enterobacter cloacae* ve *Klebsiella oxytoca*'nın sekansı ile yüksek sekans benzerliği göstermiştir. Saf kültürlerde bütün izolatlar indolasetik asit (IAA) üretmiştir ve bu IAA üretimi triptofan içeren ortamda geliştirilince artmıştır. Bakteriyel izolatlar in vitro da doku kültürü yöntemiyle şeker kamışlarını aşılama için kullanıldı ve aşılama fidelerde kök ve sürgün ağırlığında kontrole göre önemli bir artış gözlenmiştir.

Enterobacteriaceae familyasından *Xenorhabdus* sp. ve *Photorhabdus* sp.'nin 30'dan fazla farklı kimyasal sınıflardan biyoaktif sekonder metabolitler ürettiği tespit edilmiştir (Webster vd 2002). Bu metabolitler arasında indole ve indole türevleri; 3-(2'-acetoxy-3'-keto-4'-methylhexyl)-indole, 3-(2'-acetoxy-3'-keto-4'-methylpentyl)-indole, 3-(2'-hydroxy-3'-keto-4'-methylhexyl)-indole ve 3-(2'-hydroxy-3'-keto-4'-methylpentyl)-indole (Şekil 2.4.) yer almaktadır ve indole ve türevlerinin antimikotik özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Ng ve Webster 1997, Webster vd 2002).



Şekil 2.4. İndole ve türevleri (Webster vd 2002)

Xenorhabdus ve *Photorhabdus* türlerinin kitinaz aktivitesine sahip olduğu da bildirilmiştir (Chen vd 1996, Isaacson ve Webster 2002).

Enterobacteriaceae familyasından *Erwinia herbicola* ırkında IAA üretimi tespit edilmiştir ve IAA üretiminde görev alan genler izole edilmiştir (Brandl ve Lindow, 1996, 1998).

Ryu vd (2003), *Enterobacter gergoviae* JM22 ırkının 2,3-butanediol ve acetoin gibi bakteriyel uçucu bileşikler salgıladığı ve bu bileşiklerin *Arabidopsis thaliana* bitkisinde gelişmeyi teşvik ettiği tespit edilmiştir.

Converti ve Perego (2002), tarafından *Enterobacter aerogenes*'in glikozu parçaladığı ve fermentasyon ürünü olarak 2,3-butanediol ve etanol ürettiği tespit edilmiştir.

Hu vd (2000), *Enterobacter cloacae*'nin azot bağlayan bir bakteri olduğu belirtilmiştir ve azot bağlamasında görev alan genleri incelemiştir.

Nie vd (2002), *Enterobacter cloacae* CAL2 ırkının arsenate bulaşmış topraklarda yetiştirilen transgenik kanola bitkilerinde gelişmeyi pozitif yönde etkilediği saptanmıştır.

Kitin, doğada en bol bulunan doğal polimerlerden biridir ve böceklerin kutikulasında, kabuklular sınıfındaki canlıların kabuklarında ve pek çok fungusun hücre duvarında yer almaktadır (Watanabe vd 1999).

Kitinazlar, kitinin indirgenmesini sağlayan glikosilhidrolazlardır. Kitinazlar, doğada organizmalar arasında geniş bir alanda yayılmıştır. Bu organizmalar kendileri kitin içermezler. Kitinazlar; bakteriler, virüsler, çok yıllık bitkiler ve hayvanlarda mevcuttur ve fizyolojik ve ekolojik önemli rolleri vardır (Watanabe vd 1999).

Chernin vd (1995), *Enterobacter agglomerans*'ın kitinolitik aktiviteye sahip proteinler ürettiğini ve salgıladığını saptamışlardır. Bakterinin Kitinolitik aktivitesinin, karbon kaynağı olarak kitin'in bulunduğu ortamda teşvik edildiğini belirtmişlerdir. Kitinaz aktivitesi N-acetylglucosamine'nin disakkarit, trisakkarit ve tetrasakkarit türevlerinin kromogenik p-nitrophenyl analaogları kullanılarak ölçülmüştür. Bu çalışma sonunda *Enterobacter* ırklarında kompleks kitinolitik enzimlerin mevcudiyetiyle ilgili deliller elde edilmiştir ve dört enzim tespit edilmiştir: iki tane 89 ve 67 kDa moleküler ağırlığa sahip N-acetyl-β-D-glucosaminidase, 59 kDa moleküler ağırlığa sahip bir endochitinase ve 50 kDa bir chitobiosidase. Bitki denemeleri sonucunda bakterinin pamukta *Rhizoctonia solani* zararını %64 ila %86 arasında azalttığı tespit edilmiştir. Tn5 mutasyonuna uğramış ırklarda kitinolitik aktivite gözlenmemiştir.

Bouvet vd (1995), Enterobacteriaceae familyasında 128 taxa içinde toplam 1123 strain (isimlendirilmiş türler veya alttürler ve genomik türler) gliserin dehidrogenazlar ve 1,3-propanediol dehidrogenaz'ın mevcudiyeti bakımından incelenmiştir. Sadece sekiz taxa, *Citrobacter freundii sensu stricto*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *Citrobacter genomospecies* 10 ve 11, *Enterobacter gergoviae* ve *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, gliserinde fermentatif gelişebilmektedir ve anaerobik gliserin farklılaştırma yolu için tipik enzimlerden gliserin dehidrogenaz tip I'e (gliserin ve dihidroksiaseton'la teşvik edilen) ve 1,3-propanediol dehidrogenaz'a sahiptir. Altı tür, *C. koseri*, *E. aerogenes*, *E. intermedium*, *K. oxytoca*, *K. planticola* ve *K. terrigena* gliserinde fermentatif gelişmemiştir ve gliserin dehidrogenaz tip I'e sahiptir ama 1,3-

propanediol dehidrogenaz'a sahip değildir. Bu çalışma sonunda ayrıca başka gliserin dehidrogenazlar bulunmuştur tip II (gliserin ve hidroksiaseton tarafından teşvik edilen), tip III (sadece gliserin tarafından teşvik edilen) ve tip IV (sadece hidroksiasetonla teşvik edilen). Bunlar Enterobacteriaceae içerisinde geniş bir alanda yayılmıştır.

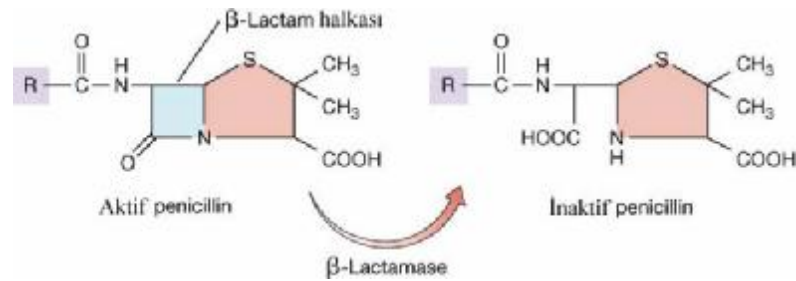
Beunink ve Rehm (1988), tarafından, *Enterobacter cloacae* ırkının insektisit DDT'yi parçalama kabiliyetine sahip olduğu bildirilmiştir.

Enterobacter gergoviae CECT 875'in uridine'den Purine nükleosid'i sentezlediği tespit edilmiştir (Trelles vd 2003).

Kumar ve Das (2000), *Enterobacter cloacae*'nin Cellobiose, L-arabinose, früktoz, maltoz, patates nişastası, selüloz, D-xylose, dekstroz, sakkaroz'u karbon kaynağı olarak kullanarak geliştiğini ve hidrojen ürettiğini tespit etmişlerdir.

Penicillium spp. tarafından Beta-Lactam halkasına sahip antibiyotikler üretilmektedir. Bu antibiyotikler bakterinin hücre duvarı sentezini engelleyerek görev yapmaktadır (Deacon 2004).

Enterobacter spp.'nin Beta-Lactamase üreterek β -lactam halkasında değişiklik yaparak direnç kazandıkları bilinmektedir (Şekil 2.5.)(Stock vd 2001).



Şekil 2.5. β -lactam halkasının β -lactamase tarafından parçalanması (Anonymous (2004) değiştirilerek alınmıştır.)

2.3. Eterik Yağ ve Benzeri Kimyasalları Parçalayan Mikroorganizmaların Ürettikleri Ürünlerle İlgili Çalışmalar

Chamberlain ve Dagley tarafından bir *Pseudomonas* ırkının Thymol'u tamamen parçalayabildiği ve Carvacrol'u kısmen parçalayabildiği belirtilmiştir. Thymol'un parçalanması bir trihydric fenol'un meta-halkasının açılması ile gerçekleşmektedir ve 3-hydroxythymol-1,4-quinol, 3,7-dimethyl-2,4,6-trioxo-octanoate'a dönüşmektedir. Daha sonraki aşamada ketolase enzimiyle hidroliz gerçekleşmekte ve asetat, 2-ketobutyrate ve isobutyrate oluşmaktadır (Schwämmle vd 2001).

Schwämmle vd (2001), yabani mercanköşk, kekik ve çam ağacında (reçineden, kabuktan ve iğnelerden) Carvacrol'den yararlanabilen mikroorganizmalar izole etmeye çalışmışlardır. Carvacrol'den (0.3 g/L) faydalanabilen toplam 6 bakteriyel ve 2 fungal izolat tespit etmişlerdir. Sadece Carvacrol'u karbon kaynağı olarak içeren sıvı besi ortamında 5 günlük yetiştirme sonucunda bakteriyel izolatların Carvacrol'u % 19-22 civarında tükettiği saptanmıştır. Fungal izolatlar çok daha yavaş gelişmiştir ve 13 günlük yetiştirme sonucunda Carvacrol'un % 7.1-11.4'ü tüketilmiştir. Ayrıca saf kültürlerden bakteriyel izolatlardan *Bacterium* sp., *Bacillus* sp. ve *Pseudomonas* sp. ve fungal izolatlardan *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* ve *Geotrichum candidum*'un carvacrol içeren ortamda gelişmesi incelenmiştir. Bütün bu izolatlar arasında sadece *Bacterium* sp. ve *Pseudomonas* sp.'nin Carvacrol'den faydalandığı gözlenmiştir. *Pseudomonas* sp.'nin Carvacrol'un % 19'unu tükettiği belirtilmiştir.

Harder ve Probian (1995), yaptıkları çalışmalarda *Pseudomonas citronellolis* bakterisinin anaerobik ortamlarda farklı doğal monotерpenleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımı incelenilmiştir. Bakterinin anaerobik olarak 3,7-dimethyl-1-octanol ve citronellol'den faydalanabildiği saptanmıştır. Ayrıca pek çok a-, mono- ve bicyclic monotерpenlerin mikrobiyal gelişimi ve denitrifikasyonu desteklediği de saptanmıştır.

Heyen ve Harder (2000), denitrifikasyon yapan β -proteobacterium *Alcaligenes defragrans* tarafından doymamış hidrokarbon yapısına sahip monotерpenlerin anaerobik olarak mineralize edildiği tespit edilmiştir. *A. defragrans*'ın hücrelerinde ve kültür

ortamında oluşan organik asitler monoterpen aktivasyon reaksiyonunun potansiyel ürünlerini tanımlamak için incelenilmiştir. Nitrat sınırlandırması altında α -phellandrene'le gelişmiş hücrelerde Geranic asit (E,E-3,7-dimethyl-2,6-octadienoic asit) 0,5 mM'a kadar birikmiştir. *A. defragrans* 65Phen'in hücre süspansiyonları geranic asidi β -myrcene, α -phellandrene, limone veya α -pinene'in mevcudiyetinde sentezlenmiştir. Myrcene en yüksek dönüşüm oranlarına ulaşmıştır. Karbon sınırlandırmasında hücre süspansiyonları tarafından alisiklik asit tüketilmiştir. Myrcene'den geranic asit oluşumu hücre sıvısı ekstraktlarında sıcaklığa hassas maddeler tarafından katalizlenmiştir. Bu sonuçlar *A. defragrans* içinde yeni bir monoterpen parçalama yolunun olduğuna işaret etmektedir.

Probian vd (2003), pivalic asidin parçalanabildiğini *Zoogloea resiniphila*, *Thauera*, *Herbaspirillum*, *Comamonadaceae* [*Aquaspirillum*], *Acidovorax* ve Nitrat indirgeyen *Moraxella osloensis*'e çok yakın bir bakteri gibi pek çok fakültatif denitrifikasyon yapan bakteriyel ırkların izolasyonu ile tespit edilmiştir. Pivalic asit tamamen karbondioksitde mineralize olmuştur. Katabolik yollar dimethylmalonate'in oksidasyonunu veya varsayılan bir 2,2-dimethylpropionyl koenzim A mutase tarafından bir karbon iskeletinin yeniden düzenlenmesini içerebilmektedir.

Harder vd (2000), doğada büyük bir karbon kaynağı olan bitkisel uçucu organik bileşikler incelemiştir. Organik maddeler olarak numune eterik yağlar ve nitrat içeren geliştirme ortamlarında, anaerobik mikroorganizmalar tarafından bu maddelerin parçalanabilirliğini çalışmışlardır. Ortamda bulunan Limon ve çam iğnesi yağının mikrobiyal gelişimi desteklediğini, oysaki maydanoz tohumu, kafur, adaçayı, rezene ve nane yağının ancak yüzeyde örten bir tabaka olarak 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane içinde çözünmüş olduğu zaman gelişimi desteklediğini tespit etmişlerdir. Kekik yağı denitrifikasyonu desteklememiştir. Mikrobiyal parçalanmış yağların analizleri monoterpenlerin, pek çok monoterpenoidlerin ve apiole ve myristicin'i de içermek üzere, methoxypropenyl-benzenlerin azaldığını göstermiştir. Bu çalışma, çevresel olarak önemli olan bitki uçucu organik bileşiklerinin toprakta anaerobik dönüşümü ile ilgili deliller teşkil etmektedir.

Limonene (4-isopropenyl-1-methylcyclohexene), bir monosiklik monoterpendir ve 300'den fazla bitki tarafından oluşturulan ve dünyada en fazla yaygınlık gösteren terpendir (Van der Werf vd 1999a).

Van der Werf vd (1999a), *Rhodoccus erythropolis* DCL 14 ırkının limonene'i bir karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiğini ve geliştiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca *R. erythropolis* DCL 14 ırkının limonene-1,2-epoxide, limonene-1,2-diol, carveol, carvone ve (-)-menthol'ü de sindirebildiğini ancak perilly alkolden yararlanamadığını belirtmişlerdir.

De Carvalho vd (2000), tarafından yapılan çalışmalarla da *R. erythropolis* DCL 14 ırkının Limonene-1,2-epoxide'i Limonene-1,2-diol'e çevirdiği tespit edilmiştir.

Van der Werf vd (1999b), *Rhodoccus erythropolis* DCL 14 ırkında carveol'un carvone'a dönüşümünü sağlayan carveol dehydrogenase enzimi üretimi tespit edilmiştir.

Barbirato vd (1998), *Rhodoccus erythropolis* DCL 14 ırkında limonene'in indirgenmesinde etkin rol alan limonene-1,2-epoxide hydrolase enziminin saflaştırılmasını ve bu enzimin üretiminden sorumlu genin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Van der Werf vd (1998), yaptıkları bir çalışma ile *Rhodoccus erythropolis* DCL 14 ırkının limonene-1,2-epoxide'i limonene-1,2-diol'e çevirmek için ürettiği bir enzim olan limonene-1,2-epoxide hydrolase'in epoxide hydrolase enzimleri içinde yapı olarak farklı olduğunu ve yeni bir sınıfa üye olduğunu belirtmişlerdir.

Van der Werf ve Boot (2000), *Rhodoccus erythropolis* DCL 14'ün carveol ve dihydrocarveol'u parçalama metabolizmasını ve bu parçalanma metabolizmasındaki ara ürünleri incelemişlerdir. Parçalanma metabolizmasında oksidasyonun yer aldığını belirtmişlerdir.

De Carvalho ve Da Fonseca (2003), *Rhodococcus opacus* PW4 ırkının limonene'i metabolik olarak parçaladığı ve metabolik ürün olarak trans ve cis-carveol veya carvone oluşturduğu tespit edilmiştir.

Van der Werf vd (2000), tarafından *Xanthobacter* sp. 20 ırkının limonene'i limonene-8,9-epoxide'e çevirdiği tespit edilmiştir. (4R)-limonene'den sadece (4R,8R)-limonene-8,9-epoxide oluşmuştur ancak (4S)-limonene bir (4S,8R)- ve (4S,8S)-limonene-8,9-epoxide karışımına dönüştürülmüştür. Maksimum limonene substrat konsantrasyonu 12 mM olarak saptanmıştır, oluşan limonene-8,9-epoxide 0.8 g l⁻¹ olarak bulunmuştur.

Pineneler, bitkiler aleminde Pineaceae familyası tarafından üretilen bisiklik monoterpenlerdir. Savithiry vd (1998) yapmış oldukları bir çalışma ile *Bacillus pallidus* BR425 ırkının α -pinene, β -pinene ve limonene'i parçalama yeteneğinde olduğunu ve bu parçalanma sonucunda carveol ve carvone'nin genel bir metabolit olarak çıktığını tespit etmişlerdir.

Misra vd (1996), hidrokarbon monoterpen; d-limonene, α -pinene, γ -terpinene ve terpinolene ve alkol monoterpenler; arbanol, linalool, plinol ve α -terpineol'un hem orman-toprak ekstraktı, hem de mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş kültürlerde aerobik olarak parçalanmasını incelemişlerdir. Hidrokarbon monoterpenlerin ve alkollerden linalool ve terpineol'un parçalandığını tespit etmişlerdir ancak plinol parçalanmamıştır ve arbanol çok yavaş parçalanmıştır.

Pavlostathis ve Misra (1999), hidrokarbon monoterpen olarak α -pinene ve alkol monoterpen olarak arbanol, linalool, plinol, α -terpineol'un 23°C'de nitrat indirgenilen koşullarda parçalanma potansiyellerini ve nitrat indirgeme işlemine etkilerini incelemişlerdir. Elektron verici olarak etanol kullanılarak zenginleştirilmiş bir orman toprağı ekstraktından hazırlanan nitrat indirgenen mikroorganizma kültürü bu çalışmada kullanılmıştır. α -pinene, bu koşullarda parçalanmıştır ayrıca mikroorganizmaların etanol ve nitrattan yararlanmasını engellemiştir. Alkol monoterpenlerin kısmen parçalanması

tespit edilmiştir ancak bu parçalanma nitrat indirgeme işleminin engellenmesi ve eklenen monoterpenlerden faydalanmanın durdurulması ile sonuçlanmıştır. Parçalanma ürünleri çoğunlukla hidrokarbon monoterpenleri; örnek olarak camphene, β -myrcene ve d-limonene olarak tespit edilmiştir. Oluşan bu hidrokarbon monoterpenlerin, nitrat indirgeme işleminin engellenmesinden ve alkol monoterpenlerin tam olarak parçalanmamasından sorumlu olabileceği tespit edilmiştir.

Gilbert ve Crowley (1997), bahçe nanesinde (*Mentha spicata*) bulunan bir kimyasal bileşiğin; l-carvone'un, *Arthrobacter* sp. B1B ırkının PCB yapısındaki maddeleri parçalamasını teşvik ettiğini saptamışlardır. *Arthrobacter* sp. B1B ırkı l-carvone ve yapısal olarak ona benzer limonene, p-cymene ve isoprene içeren ortamlarda yetiştirilince PCB parçalanması teşvik edilmiştir.

β -Myrcene, şerbetçiotu, defne, mineçiçeği ve lemongrass gibi pek çok faydalı bitkide bulunan bir asiklik monoterpendir. Iurescia vd (1999) *Pseudomonas* sp. M1 ırkının β -myrcene'ini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilme yeteneğinde olduğunu keşfetmişlerdir. Ayrıca bu bakteride β -myrcene'in parçalanmasında etkili genleri izole etmişlerdir.

Amaral vd (1998), çeşitli monoterpenlerin *Methylosinus trichosporium* OB3b ve *Methylobacter luteus* tarafından metanın oksitlenmesinin engellendiği tespit edilmiştir. 1.1 mM (-)- α -pinene 2 günden fazla bir süre metan oksidasyonunu engellemiştir. Monoterpenlerin çeşitli bakterilerde aerobik metabolizmasına olan etkileri incelenmiştir ve *Escherichia coli*'nin 7.3 mM (-)- α -pinene'den etkilenmediği tespit edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia marcescens*'de ise gelişmeye pozitif bir etki mevcuttur. Monoterpenlerin metan oksitlenmesini engelleyici etkisi doymamış cyclic hidrokarbon formlarında örnek olarak (-)- α -pinene, (s)-(-)-limonene, (R)-(+)-limonene ve γ -terpinene'de yüksek çıkmıştır. Daha az derecede engelleme etkisi oksit ve alkol türevlerinde örnek olarak (R)-(+)-limonene oxide, α -pinene oxide, linalool, α -terpineol ve noncyclic bir hidrokarbonda (β -myrcene) tespit edilmiştir.

Fungal mikroorganizmalar tarafından da monoterpenlerin parçalandığı bilinmektedir (Duetz vd 2003). Van Dyk vd (1998) *Hormonema* sp. ırkının (+) limonene’i trans-isopiperitenol’a, (-) α -pinene’i de verbenone ve trans-verbenol’a çevirdiği ve (-) β -pinene’i pinocamphone’a çevirdiği bildirilmiştir.

Duetz vd (2003), tarafından bildirildiğine göre; Dhavalikar ve Bhattacharyya tarafından *Pseudomonas*’ın, Bowen tarafından *Penicillium digitatum*’un, Noma vd tarafından *Aspergillus cellulosae*’un, Cheong ve Oriel tarafından *Escherichia coli*’nin limonene’i carveol’a çevirdiği bildirilmiştir.

Van Rensburg vd (1997), *Arxula adenivorans* ve *Yarrowia lipolytica* ırkı fungusların (+)limonene’i perillic aside ve (-)piperitone’ı 7-hydroxy-piperitone’a çevirdiğini ve 2 sınıflandırılmamış basidiomycotina; *Trichosporon* ırkının (+)limonene’i isopiperitenone’a, trans-1,2-dihydroxy-limonene’e ve (-)piperitone’i trans-6-hydroxy-piperitone’a ve 2-isopropyl-5-methyl-hydroquinone’e çevirdiği tespit edilmiştir.

Van Dyk ve Thomas (1998), çeşitli fungusların monoterpen alkollerden rac-linalyl acetate ve rac- α -terpinyl acetate’ı hidrolizasyonunu incelemişlerdir. *Geotrichum capitatum*, *Geotrichum klebahnii*, *Geotrichum spicifer*, *Geotrichum sericeum*, *Rhodotorula ferulica*, *Trichosporon* sp. *Geotrichum fragrans*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodospiridium sphaerocarpum*, *Pichia pini*’in rac-linalyl acetat’ı hidrolize edebildiğini ve sınıflandırılmamış bir fungal izolatın rac- α -terpinyl acetat’ı hidrolize ettiği tespit edilmiştir.

Botes vd (1998), funguslar tarafından 1,2-epoxyoctane’in hidrolizini incelemişlerdir. *Rhodotorula araucariae*, *Rhodospiridium toruloides*, *Trichosporon* sp., *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula* sp. tarafından 1,2-epoxyoctane’in hidrolize edildiği tespit edilmiştir.

Onken ve Berger (1999), Basidiomycotina’ya bağlı *Pleurotus sapidus* ırkının limonene’i parçalaması sonucunda cis/trans carveol ve carvone’un ana ürünler olarak oluştuğu tespit edilmiştir. Bu parçalanmanın 2.gününde substratın %97’si miselyumda

birikmiştir fakat sadece %3'ü kültür ortamında mevcut bulunmuştur. Daha evvelden az miktarda substrat verilen kültürlerin adaptasyonu sonucunda carveol konsantrasyonu ikiye katlanmıştır ve carvone konsantrasyonu 3-4 kat azalmıştır.

Abraham vd (1985), gamma-terpinene, alpha-terpinene, limonene ve alpha-phellandrene gibi 1-menthene'lerin mikrobiyal çevrimi sonucunda 1,2-trans-dioller oluştuğunu belirtmişlerdir. Bu mikrobiyal çevrimde *Corynespora cassicola* veya *Diplodia gossypina* kullanılmıştır. (4R)-Limonene, *Gibberella cyanea* tarafından (1S, 2S, 4R)-p-menth-8-en-1,2-diol'e çevrilmiştir ama 3,3,5,5-tetramethyl-limonene, 6-monohidroksilasyona uğramış bir ürün ve 6-hidroxy-8,10-epoxy yapısına sahip, 6-10-dihydroxylasyona uğramış bir ürün oluşturmuştur. Terminal isoprenoid gruplarındaki reaksiyonla aliphatic terpenlerden Vicinal dioller de oluşmuştur. Longifolene'in *Corynespora cassicola* tarafından hidroksile edildiği bildirilmiştir.

Citronellal (3,7-Dimethyl-6-octanal), L veya D formunda bulunan bir monoterpendir ve *Eucalyptus citriodora* bitkisinin eterik yağlarında bulunan bir bileşendir. Citronellal, daha sonra hidrojen uygulaması ile ticari olarak daha değerli Citronellol'e (3,7-Dimethyl-6-octanol) dönüştürülebilmektedir. Velankar ve Heble (2003) serbest ve hareketsiz *Rhodotorula minuta* kullanılarak (L)-citronellal'ın (L)-citronellol'a biyotransformasyonunu tespit etmişlerdir.

Resin asitleri ağaçlar tarafından sentezlenen trisiklik diterpenoidler grubundandır. Resin asitlerinin ağaçları mikrobiyal patojenlerden ve zararlılardan koruma özelliği vardır ancak kağıt sanayi için önemli bir kirlilik oluşturur. Yu ve Mohn (2001) yapmış oldukları çalışmalarla *Pseudomonas abitaniphila* BKME-9 ve *Zoogloe resiniphila* DhA-35 bakterilerinin resin asitlerini parçalama yeteneğinde olduklarını saptamışlardır.

Banchio ve Gramajo (1997), *Streptomyces coelicolor* ırkı bakterilerin palmitate gibi uzun ve octanoate gibi orta zincirli yağ asitlerini bünyelerine alma ve yararlanma yetenekleri incelenilmiştir. Bu araştırmalar sonucunda bakterinin C4'den C18'e kadar değişik uzunlukta yağ asidinden yararlanabildikleri tespit edilmiştir.

Kaneshiro vd (1999), soya fasulyesi yağı içeren bir kompost karışımını doymamış yağ asitlerini (DYA) değiştiren mikroorganizmalar bakımından incelemişlerdir. Oleik asit veya 10-ketostearik asit seçici yağ asidi olduğu zaman *Spingobacterium thalpophilum*, *Acinetobacter* spp. ve *Enterobacter cloacae* hidrosistearik asit, ketostearik asit veya tamamlanmamış dekarboksilasyonlar üreten izolatlar göstermişlerdir. Ricinoleic (12-hidroksi-9-octadecenoic) asit seçici DYA olduğu zaman, *Enterobacter cloacae* ve *Escherichia* sp. karbon-12 ve karbon-14'ü birbirine benzer bileşikler meydana getirmiştir ve *Pseudomonas aeruginosa* ricinolate'ı bir trihidroksioktadesenoate ürününe çevirmiştir. Ayrıca mevcut *Enterobacter*, *Pseudomonas* ve *Serratia* spp. linoleate maddesini tam olmasa da dekarboksile ettiği gözlenmiştir. Bu saprofitik, kompost bakterileri aerobik veya fakültatif anaerobik gram-negatif ve DYA'ları dekarboksilasyon, hidroksilasyon ve hidroperoksidasyon mekanizmaları aracılığıyla ayırtmışlardır.

Hwang vd (2002), pirinç kepek yağının ve pirinç kepek ekstraktının içeriğini ve *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinsi bakterilerin çoğalmasına olan etkilerini incelemişlerdir. Bu araştırmalar sonucunda pirinç kepek yağının oleic, linoleic, palmitic vb yağ asitlerinden oluştuğunu ve *Bifidobacterium bifidum* ve *Bifidobacterium longum*'un çoğalmasını arttırdığı tespit edilmiştir.

Slininger ve Shea-Wilbur (1995), *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ile biyolojik mücadelede kullanılan *Pseudomonas fluorescens* 2-79 ırkının ürettiği bir antibiyotik olan phenazine-1-karboksilik asidin (PCA) üretiminin sıvı kültür pH'sı, sıcaklık ve karbon kaynağına bağlı olduğu tespit edilmiştir. Bakterinin en yüksek PCA üretimine karbon kaynağı olarak sırası ile glukoz, gliserin ve xylose ve früktoz'da ulaştığı belirlenmiştir. Ortamda kullanılan azot kaynağının ise bakterinin PCA üretimi üzerine önemli bir etkisi olmadığı da tespit edilmiştir.

Keudell vd (2000), *Pseudomonas aeruginosa* 2HS ırkının, 12-hidroksistearic, ricinoleic, oleic, palmitic, stearic vb çeşitli yağ asitlerinin bulunduğu ortamlarda yetiştirilmesi ile bakterinin tubermicin B (Phenazine-1-Karboksilik asit) (PCA) üretimi arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Ortamda yağ asitlerinin bulunması ile üretilen ürün

arasında doğrusal bir ilişki olduğunu ve en yüksek PCA üretimi sırası ile 12-hidroxysearic, ricinoleic ve oleic asitte tespit edilmiştir.

Cromwick vd (1996), *Pseudomonas oleovorans*, *P. resinovorans*, *P. putida* ve *P. citronellis* bakterilerinin mum yağının serbest yağ asitlerini ve mum yağının trigliseridini karbon kaynağı olarak kullandıklarını ve poly(hydroxyalkanoates) (PHA) ürettikleri tespit edilmiştir.

Torres-Rubio vd (2000), Pirinç rizosferinden izole ettikleri *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ırklarının yetiştirildikleri ortamda tryptophan bulunduğunda indol-3-asetik asit ürettiklerini TLC ve salkowski reagent kullanarak ve *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas putida* ırklarının *Phytophthora infestans*'ın gelişimini siderophor üreterek engellediği tespit edilmiştir.

Lejbolle (2000), *Pseudomonas fluorescens* ırkı bakterilerin Polychlorinated biphenyl (PCB) gibi yağlarla bulaşmış topraklarda PCB'yi parçalayabildikleri tespit edilmiştir.

3.6. Bakterinin Toprak Kökenli Bazı Fungal Patojenlere Olan Etkisi

3.6.1. Araştırmada kullanılan toprak kökenli bazı fungal patojenler

İzole edilen bakterinin bitki patojeni olan funguslar arasında antagonistik etkiyi araştırmak için denemede kullanılan funguslar Akd. Üniv. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'ndeki stok kültürlerden alınarak bir hafta süre ile hazır patates dekstroz agar (PDA) ortamında yetiştirilmiştir. Bu denemede kullanılan funguslar aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir.

Patojen Funguslar	Yaptığı Hastalıklar
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon	Bitkilerde kök çürüklüğü solgunluk
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	Bitkilerde kök çürüklüğü solgunluk
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Sap ve kök boğazı çürüklüğü
<i>Phytophthora capsici</i> Leonian	Biberde kök ve kökboğazı yanıklığı

3.6.2. Bakterinin toprak kökenli bazı fungal patojenlere olan etkisi

Eterik yağı parçalayan bakteri Bölüm 3.2.'de anlatıldığı gibi eterik yağ, gliserin ve eterik yağ, gliserin karışımında bir hafta süre ile geliştirilmiştir. Bir hafta sonunda steril edilmiş 734 ml saf su içerisinde 39 g PDA içeren besi ortamına sıcaklığı 45-50°C civarında iken 266 ml bakterili veya bakterisiz (kontrol) gruplarından ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 1000 ml'ye tamamlanan bu besi ortamları her bir petride 15 ml katı besi ortamı içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bir grup petriye normal PDA hiçbir şey ilave edilmeden (39 g PDA/Lt) kontrol grubu olarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan bu ortamlar üzerine, toprak kökenli fungal patojenlerin miselleri aşılanmış, 3 gün süre ile 27°C'de inkübe edilmiştir. Tüm denemeler beşer tekerrürlü olarak düzenlenmiş ve ölçümler fungus misel koloni çapının birbirine dik iki ayrı yönde ölçülmesi ve ortalamasının alınması şeklinde 3 gün sonunda tespit edilmiştir. Tüm denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Muameleler beşer

tekerrürlü hazırlanmış, varyans analizi yapıldıktan sonra istatistiksel farklılık için LSD testi uygulanmıştır ($P<0.05$).

3. 7. Bakterinin Bitki Aktivatörü Olarak Etkinliğinin Belirlenmesi

Denemede kullanılan bitkisel materyalin yetiştirilmesi için 2/5 oranında torf, 2/5 oranında toprak ve 1/5 oranında perlit karışımı kullanılmıştır. Bu karışıma mikrobiyal yapısının bozulmaması için sterilizasyon yapılmamıştır.

Bu karışım her biri 100 adet çukur içeren 3 adet plastik fideliklerde, her bir çukura homojen olacak şekilde dağıtılmıştır.

Yüksel tohumculuk Tarım San. ve Tic. Ltd. firması tarafından sağlanan, daha önce ilaçlama yapılmamış, işlenmemiş ham salatalık (*Cucumis sativus*) tohumu her bir çukura 1 adet yerleştirilmiştir.

Denemede piyasada ticari olarak satılan AkseBio preparatı ve otoklavda 121°C 1 atm. basınçta 20 dakika otoklav yapılarak steril edilmiş AkseBio preparatı ve kontrol olarak musluk suyu kullanılmıştır.

AkseBio ve steril edilmiş AkseBio tavsiye edilen şekilde 1/1000 oranında su ile seyreltilmiş ve 2 gün ara ile fideliklere sulama suyu olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna sadece musluk suyu uygulanmıştır.

26±°C sıcaklık, %60± nisbi nem ve 14 saatlik ışıqlanma periyoduna sahip iklim odalarında 20 gün süreyle yetiştirilen bitkilerde bu sürenin sonunda her gruptan tesadüfi olarak seçilen 10 adet bitkinin tüm bitki yaş ağırlığı, yaprak yaş ağırlığı, yaprak kuru ağırlığı, kök yaş ağırlığı, kök kuru ağırlığı, kök uzunluğu ve yaprak alanları ölçülmüştür.

Yaprak alan değeri ölçümünde Sheffield Üniversitesi, Karşılaştırmalı bitki ekolojisi bölümü tarafından geliştirilen bir bilgisayar programı kullanılmıştır.

Bütün denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre yapılmış, elde edilen sonuçlar LSD çoklu karşılaştırma testine göre değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. AkseBio Preparatından Eterik Yağı Parçalayan Mikroorganizmanın İzolasyonu

İçeriği Çizelge 3.1’de izah edilen A Besi ortamı pH seviyesi 7.2 seviyesinde ayarlanarak 500 ppm eterik yağ içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Bitki aktivatörü mikroorganizma, hazırlanan besiy ortamına AkseBio preparatından bir öze yardımı ile tek koloni çizim tekniği ile aşılanmış ve 25°C’de 48 saat bekletilen ortamda bakteri kolonileri tespit edilmiştir (Lederberg ve Lederberg, 1952).

Çizelge 3.1. Denemelerde kullanılan A besiy ortamının içeriği (Krieg ve Holt 1984)

Pepton	20 g
K ₂ SO ₄ (anhidrat)	10 g
MgCl ₂ (anhidrat)	1.4 g
Gliserin	10 ml/L
Agar	13.6 g
Saf Su	1000 ml

3.2. Bakterinin Karbon Kaynağı Olarak Eterik Yağ, Gliserin ve Carvacrol Kullanılan Ortamda Yetiştirilmesi

A besiy ortamı agar içermeyecek şekilde ve karbon kaynağı modifiye edilerek kullanılmıştır. Bakterinin karbon kaynağı farklı besiy ortamlarında yetiştirilmesinde 3 farklı karbon kaynağı kullanılmıştır.

Denemelerde kullanılan karbon kaynakları ve besiy ortamındaki miktarları şunlardır:

1. Deneme: a) Gliserin 10 ml/L,
b) *T.spicata* eterik yağı 500 mg/L
c) Carvacrol 500 mg/L
2. Deneme: a) Gliserin 10 ml/L
b) *T.spicata* eterik yağı 500 mg/L
c) 5 ml/L Gliserin ve 250 mg/L *T.spicata* eterik yağı karışımı.

Bakterinin besi ortamlarına aşılmasında bakteri sayısı 3.9×10^9 /ml bakteri olan bakteri süspansiyonu kullanılmıştır. 125'şer ml karbon kaynağı farklı steril sıvı A besi ortamlarına ayrı ayrı yukarıda izah edilen konsantrasyondaki süspansiyondan 1000 µl alınarak koyulmuştur. Bu denemede kontrol olarak farklı karbon kaynakları içeren steril ortamlar kullanılmış fakat bakteri süspansiyonu ilave edilmemiştir.

3.3. Bakterinin Yetiştirildiği Karbon Kaynağına Bağlı Olarak Ürettiği Ürünlerin İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemi ile Saptanması ve Fungitoksik Etkisinin İncelenmesi

125 ml'lik ortamlar 144 saat boyunca bakterilerin gelişimi için $26 \pm ^\circ\text{C}$ 'de çalkalama aletinde 105 dev/dak hızda tutulmuştur. 144 saat boyunca bakterilerin farklı karbon kaynağı içeren ortamlarda ürettiği ürünlerin takibi için, inokule edilmiş ve kontrol ortamlarından inokulasyondan sonra, 48., 96. ve 144. saatlerde (40'ar ml) numune alınmıştır. Numunelerin bakteri sayısı/ml ve pH değerleri ölçülmüştür. Bakteri sayısı tespiti spektrofotometrik yöntemle (Shimadzu UV-160 A) 686 nm'de ölçülmüştür. Numunelerin pH seviyesi, seyreltilmiş NaOH ve HCl kullanılarak 3 seviyesinde ayarlanarak, her pH ayarlanmış numuneden 8 ml alınmıştır ve 1.5 ml etil asetat ilave edilmiştir ve karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra numuneler 9500 rpm'de 20 dk. 5°C santrifüj edilmiştir (Burkhead vd 1995).

Santrifüj edilen numunelerden 400 µl etil asetat fazı zaman kaybedilmeden adsorbent olarak, 20x20 cm ebatlarında alüminyum tabakalar üzerine 0.2 mm kalınlığında dökülmüş Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Aluminium sheets, Katalog no.

1.05554) floresan indikatöre sahip hazır TLC tabakalarına 1.0 cm aralıklarla verilmiştir.

Her bir numunenin etil asetat fazı verilmiş bu tabakalar 21x21x9 cm ebatlarındaki kapalı bir geliştirme kabini içerisine daha önce konulan mobil faz 100 ml kloroform : aseton (9:1) (Burkhead vd 1995) veya toluen : etilasetat : formik asit (5:4:1) (Janicsák ve Máthé 1997) çözücüsünde 15 cm yüksekliğe kadar geliştirilmiştir.

Tabakalar yaklaşık 60 dakika süren geliştirme işleminden sonra, geliştirme kabininden çıkarılmış ve tabakalardan çözücünün buharlaşarak uçması beklenmiştir.

Geliştirilen tabakalar üzerindeki ayrılan fraksiyonlar 254 ve 365 nm UV ışığı (Vilber Lourmat CN-15LC) altında gözlenmiş ve 254 nm UV ışığında gözüken lekeler kurşun kalemle işaretlenmiştir.

Daha sonra bu tabakalara Sülfürik asit-Metanol karışımı (1 ml Sülfürik asit + 19 ml Metanol) bir püskürtücü yardımı ile püskürtülmüş ve tabakalar daha sonra 100°C'deki bir etüve yerleştirilerek üzerindeki lekeler görünür hale gelinceye kadar bekletilmiştir. Bu deneme 3 tekerrürlü olarak yapılmış ve bakterinin ürettiği maddelerin ortalama Rf değerleri belirtilmiştir (Wedge ve Nagle 2000).

Bakterinin yetiştirildiği karbon kaynağına bağlı olarak ürettiği ürünlerin fungitoksik etkisinin incelenmesi için kloroform : aseton çözücüsünde geliştirilen tabakalar geliştirme kabininden çıkarılmış ve çözücünün buharlaşarak uçması beklenmiştir. Bu sırada petride PDA ortamlarında 7 gün geliştirilmiş *Fusarium moniliforme* Sheldon'nın miselleri homojenizatör (Janke&Kunkel, Ultra-Turrax T25) kullanılarak 100 ml steril saf su içerisinde hasat edilmiş ve bir tülbent ile süzülerek agar parçaları uzaklaştırılmıştır. Kalan süzüntü 100 ml'ye tamamlanmış ve 0.5 gram dekstroz ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen süspansiyon plakalara püskürtülmüştür. Süspansiyonun hazırlanması ve plakalara püskürtülmesi istenmeyen bulaşmaların engellenmesi amacı ile eldiven kullanılarak

yapılmıştır. Püskürtücü kullanılmadan önce %70'lik etanolla ve ardından steril su ile yıkanmıştır.

Fungus süspansiyonu püskürtülmüş olan tabakalar, 25x22x9.5 cm ebatlarında %100 oranında nem içeren bir plastik kutuya yerleştirilmiş ve 4 gün 25°C'de karanlıkta tutulmuştur. Bu sürenin sonunda tabakalar çıkarılmış ve tabakalar üzerinde gelişme olmayan bölgelerin ortalama Rf değerleri belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma da 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Bakterinin ürettiği ürünlerin, şüphelendiğimiz kimyasal maddelerle karşılaştırılması için geliştirme kabinine konulmadan evvel yapılan bütün işlemler tekrarlanmış ancak kontrol grupları yerine metanolda hazırlanmış % 1'lik Rosmarinic asid, Phenazine ve Indole-3-Asetik Asit çözeltilerinden 10 µl tabakaya verilmiştir. Daha sonra daha evvel anlatıldığı gibi çözücüde geliştirilmiş, UV'de gözlenmiş ve Sülfürik asit-Metanol çözeltisi ile görünür hale getirilmiştir. Yapılan bu çalışma da 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

3.4. Bakterinin Yetiştirildiği Karbon Kaynağına Göre İndol-3-asetik Asit Üretiminin Tespiti

Bakterinin yetiştirildiği karbon kaynağına bağlı olarak indole-3-asetik asit üretiminin tespitinde ve miktar tayininde Torres-Rubio vd (2000) izledikleri metod değiştirilerek uygulanmıştır.

İndol-3-asetik asidin ışıktan etkilendiği ve yapısının bozulduğu bilindiği için bütün işlemler loş ışıktaki veya karanlıkta yapılmıştır (Glickmann ve Dessaux 1995).

Bölüm 3.2'de anlatıldığı gibi farklı karbon kaynaklarında 144 saat boyunca geliştirilen bakterili ve bakterisiz ortamlardan 48., 96. ve 144. saatlerde numuneler alınmış ve 9500 rpm'de 20 dk. 5°C'de santrifüj edilmiştir.

Santrifüj edilen numunelerin dibe çöken kısımları uzaklaştırıldı ve kalan sıvı kısımdan 2 ml alınarak, 4ml içeriği ve hazırlanışı aşağıda belirtilmiş olan Salkowski reagent 2 ml'lık numuneye ilave edilmiştir.

Salkowski reagent; 2.03 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 500 ml saf su içerisinde çözülerek ve bu karışım 300 ml konsantre H_2SO_4 (yoğunluğu 1.840) ile karıştırılarak hazırlanmıştır (Ehmann 1977).

Salkowski reagent ilave edilmiş numuneler 30 dk süre ile karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. 30 dk bekletilen numuneler 530 nm dalga boyunda spektrometrede (Shimadzu UV-160 A) ölçülmüştür. Yapılan bu çalışma da 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Miktar tayininde Salkowski reagent'la yukarıdaki gibi reaksiyona girmiş farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış sentetik indol-3-asetik asidin 530 nm'de ölçülmesi ile hazırlanmış kalibrasyon kurvesi kullanılmıştır.

3.5. Bakterinin Yetiştirildiği Karbon Kaynağına Göre Kitinaz Aktivitesinin Tespiti

Denemede karbon kaynağı olarak carvacrol (500 mg/L), gliserin (10 ml/L), eterik yağ (500 mg/L) ve gliserin+carvacrol (5 ml/L gliserin ve 250 mg/L carvacrol) karışımı içeren sıvı A besi ortamı kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak bakteri aşılammamış ortamlar kullanılmıştır.

Aşılamayı takiben gelişen bakteri kültürlerinde 48, 96, 154 ve 240 saatlerinde numune alınmış ve pH, bakteri sayısı ve kitinaz aktiviteleri ölçülmüştür.

Bakterinin gliserinli ortamda yetiştirilmesi sırasında ortamın pH'sının zamanla düştüğü bilindiği için ve düşük pH'nın kitinaz aktivitesine negatif etkide bulunabileceği dikkate alınarak gliserin içeren numune ikiye ayrılarak bir kısmının pH'sı 7.00 düzeyinde ayarlanmıştır.

Besi ortamlarından alınan numunelerin bir grubu 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerin içerisinde 9500 rpm'de 20 dk santrifuj edilmiş ve böylelikle bakteri ve besi ortamı iki ayrı faz haline gelmiştir. Üstte kalan besi ortamı fazı, sonradan kullanılmak üzere yeni steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır.

Üstte kalan besi ortamı kısmından ayrıştırılan bakteri çöküntüsü içeren tüplere, ayrılan besi ortamı kadar steril saf su ilave edilmiş, bakterilerin bu tüpte dağıtılması (süspanse olması) sağlanmış, tekrar santrifuj yapılmıştır. Üstte kalan su tekrar uzaklaştırılarak bakterinin besi ortamından arı olması garanti altına alınmıştır. Son olarak tekrar ayrıştırılan besi ortamı miktarı kadar su eklenerek, yalnız bakteri fazı da analizler için kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Kitinaz aktivitesinin ölçümü için Isaacson ve Webster (2002) izlediği yol modifiye edilerek uygulanmıştır. Kitinaz aktivitesinin temelini p-nitrophenol'un, p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma N-9376) substratından enzim aktivitesi sonucu ayrılması ve 410 nm'de meydana getirdiği absorbans değişimi oluşturmaktadır. Kitinaz aktivitesinin tespiti için 1 mM substrat, solusyonu p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma N-9376)(0.34 mg/ml), 50 mM pH 6.7 Potasyum Fosfat tampon çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Bütün ölçümler 410 nm'de ThermoLabsystems firmasının Multiskan Spectrum Eliza plate okuyucusunda 41 °C 120 dakika inkubasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Eliza plate üzerindeki bir grup çukurcuğa 180 μ l 1 mM substrat + buffer solüsyon konulmuş, bir gruba kontrol olarak sadece 180 μ l buffer ilave edilmiştir.

Bu çukurcukların 180 μ l substrat içerenlerin bir grubuna 20 μ l bakterili besi ortamı, bir gruba sadece su içerisindeki bakteri solüsyonu ve bir gruba da sadece bakterisi uzaklaştırılmış besi ortamı ilave edilmiştir. Ayrıca, kontrol grupları 180 μ l substrat ve 20 μ l bakteri aşılınmamış besi ortamlarından oluşmaktadır.

Hesaplamalarda kullanılmak üzere geri plan (kör) olarak sadece 180 μ l buffer ve 20 μ l besi ortamı içeren çukurcuklar hazırlanmıştır. Hesaplamalar Excel bilgisayar programında yapılmıştır.

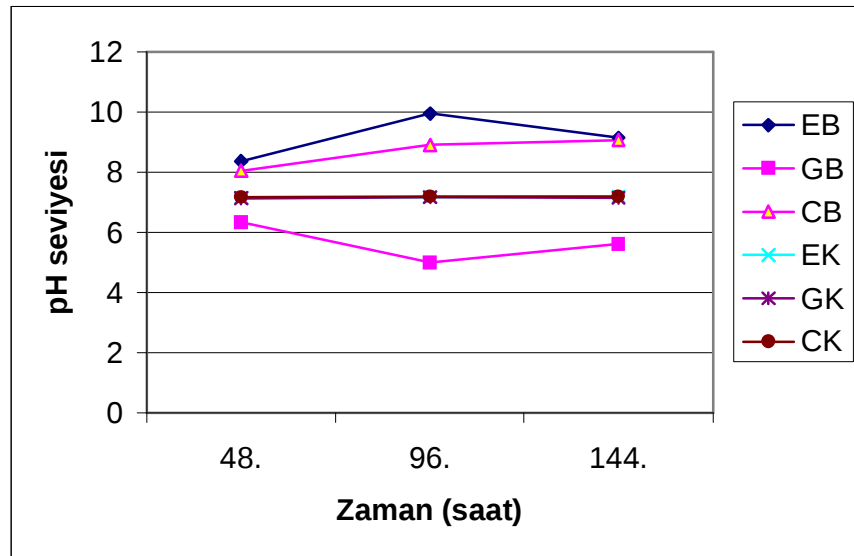
4. BULGULAR

4.1. AkseBio Preparatında Eterik Yağı Parçalayan Mikroorganizmaların Tanısı

Mikroorganizmanın tanısı DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) firması tarafından yapılmıştır ve % 99.8 kesinlikle *Enterobacter gergoviae* olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Bakterinin Karbon Kaynağı Olarak Eterik Yağ, Gliserin ve Carvacrol Kullanılan Ortamda Yetiştirilmesine Bağlı Olarak Ürettiği Ürünlerin İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemi ile Saptanması ve Fungitoksik Etkisinin İncelenmesi

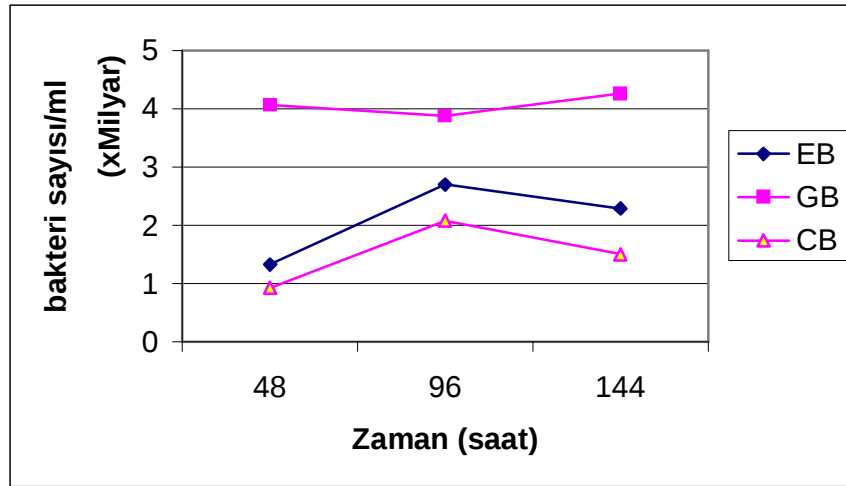
Bakteri, bölüm 3.2’de belirtildiği gibi karbon kaynakları 1. deneme için hazırlanmış besi ortamlarında yetiştirilmiş ve 48., 96. ve 144. saatlerde alınan numunelerden pH seviyesi ve bakteri sayısı tespit edilmiştir (Şekil 4.1, Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Bakterili ve bakterisiz ortamların zamana bağlı olarak pH seviyelerindeki değişim. Kısaltmalar: EB, eterik yağ içeren bakterili ortam, GB, gliserin içeren bakterili ortam, CB, carvacrol içeren bakterili ortam, EK, eterik yağ içeren bakterisiz kontrol ortamı, GK, gliserin içeren bakterisiz kontrol ortamı, CK, carvacrol içeren bakterisiz kontrol ortamı

Çizelge 4.1. Bakterili ve bakterisiz deneme 1 ortamlarında zamana bağlı olarak pH seviyelerindeki değişim. Kısaltmalar: Şekil 4.1’le aynıdır. (sd=standart deviation=standart sapma)

Zaman	EB± sd	GB± sd	CB± sd	EK± sd	GK± sd	CK± sd
48. Saat	8,37±0,051	6,32±0,024	8,05±0,016	7,15±0,012	7,12±0,018	7,16±0,026
96. Saat	9,95±0,025	5,00±0,026	8,91±0,014	7,16±0,016	7,16±0,016	7,19±0,021
144. Saat	9,14±0,016	5,62±0,028	9,07±0,20	7,18±0,014	7,14±0,017	7,18±0,022



Şekil 4.2. Karbon kaynağına bağlı olarak zamana göre bakteri sayısındaki değişim. Kısaltmalar: Şekil 4.1’le aynıdır

Bölüm 3.3’de belirtildiği gibi bakterinin ürettiği ürünler 48. saatten itibaren, mobil faz olarak kloroform : aseton (9:1) (Solvent A) kullanılarak TLC plakası üzerinde tespit edilmiştir.

144. saat sonunda bakterili ortamlardan karbon kaynağı olarak eterik yağ içeren ortam, gliserin içeren ortam ve carvacrol içeren ortamdan 245 nm UV ışığında sırası ile 0.32, 0.37 ve 0.31 Rf değerine sahip maddeler tespit edilmiştir, kontrol gruplarında aynı Rf değerinde bir madde saptanmamıştır (Şekil 4.3, Ok 2). Kontrol ortamlarında ve bakterili ortamlarda carvacrol 0.80 Rf değerine sahiptir (Şekil 4.3, Ok 1).

Şekil 4.3. Deneme 1'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü. Kısaltmalar: a) eterik yağ içeren bakterili ortam (EB), b) gliserin içeren bakterili ortam (GB), c) carvacrol içeren bakterili ortam (CB), d) eterik yağ içeren bakterisiz kontrol ortamı (EK), e) gliserin içeren bakterisiz kontrol ortamı (GK), f) carvacrol içeren bakterisiz kontrol ortamı (CK)

Bölüm 3.3'de belirtildiği gibi 254 nm UV ışığı altında kurşun kalemle, görülen maddeler işaretlenmiş ve TLC tabakalarına *Fusarium moniliforme* süspansiyonu püskürtülmüştür.

Bölüm 3.3'de belirtilen koşullarda 4 gün muhafaza edilen, üzerine fungus süspansiyonu püskürtülmüş plakalar 254 nm UV ışığında gözlenmiş ve fungusun gelişmediği bölgelerin ortalama Rf değerleri tespit edilmiştir. Bakterili ortamlardan karbon kaynağı olarak sırası ile eterik yağ içeren ortam, gliserin içeren ortam ve carvacrol içeren ortamdaki sırası ile 0.49, 0.49 ve 0.49 Rf değerine sahip fungitoksik etki gösteren maddeler tespit edilmiştir (Şekil 4.4, Ok 2). Kontrol ortamlarında ve bakterili ortamlarda carvacrol bölgesinde (Rf 0.8) fungitoksik etki gözlenmiştir (Şekil 4.4, Ok 1).

Şekil 4.4. Üzerine fungus süspansiyonu püskürtülmüş, deneme 1'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü. Kısaltmalar: a) EB, b) GB, c) CB, d) EK, e) GK, f) CK

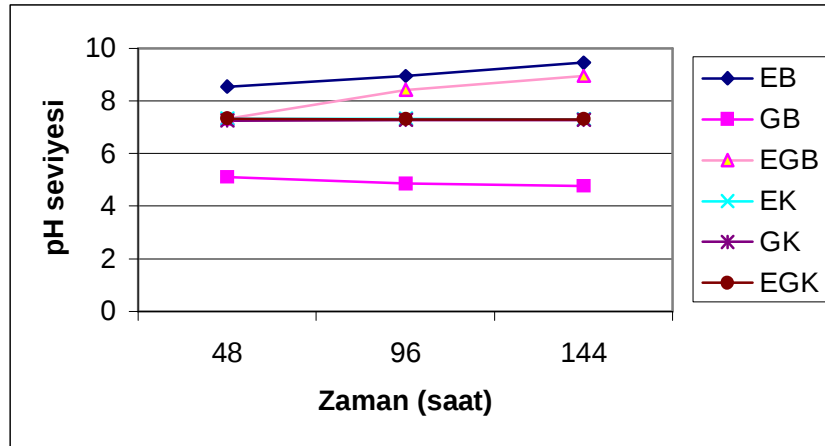
Mobil faz olarak Solvent A kullanılarak geliştirilmiş plakalara, çözücünün uçmasından sonra Bölüm 3.3'de belirtildiği gibi, Sülfürik asit-Metanol (1:19) karışımı püskürtülmüştür. 100°C'de etüvde bekletilen plakalar üzerinde bakterili ortamlarda mevcut, ancak kontrol ortamlarında bulunmayan maddeler tespit edilmiş ve bakterinin ürettiği bu maddelerin ortalama Rf değerleri tespit edilmiştir. Bakterili ortamlardan karbon kaynağı olarak; eterik yağ içeren ortam, gliserin içeren ortam ve carvacrol içeren ortamdan sırası ile 0.46, 0.51 ve 0.46 Rf değerine sahip maddeler tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

Şekil 4.5. Üzerine Sülfürik asit-Metanol karışımı püskürtülmüş, deneme 1'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının görüntüsü
Kısaltmalar: a) EB, b) GB, c) CB, d) EK, e) GK, f) CK

Bölüm 3.3'de belirtildiği gibi kontrol grubu yerine kimyasal yapısı bilinen maddeler konularak plakalar mobil faz olarak Solvent A kullanılarak geliştirilmiş ve daha sonra 254 nm UV ışığı altında gözlenmiştir. Bakterinin ürettiği ürünler ile kimyasal yapısı bilinen maddeler içinde aynı Rf değerine sahip madde bulunamamıştır (Şekil 4.6).

Şekil 4.6. Deneme 1'e göre hazırlanmış bakterili ortamların ve kimyasal yapısı bilinen maddelerin, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü. Kısaltmalar: a) EB, b) GB, c) CB, g) Rosmarinic acid, h) Phenazine, i) Indol-3-asetik asit (IAA)

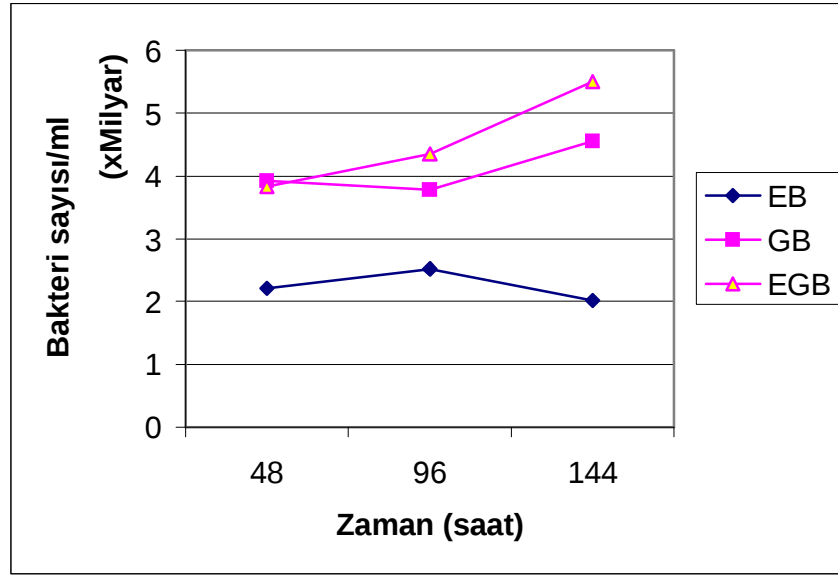
Bakteri, bölüm 3.2'de belirtildiği gibi karbon kaynakları 2. deneme için hazırlanmış besi ortamlarında yetiştirilmiş ve 48., 96, ve 144. saatlerde alınan numunelerden pH seviyesi ve bakteri sayısı tespit edilmiştir (Şekil 4.7, Çizelge 4.2 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Bakterili ve bakterisiz deneme 2 ortamlarında zamana bağlı olarak pH seviyelerindeki değişim. Kısaltmalar: EB, eterik yağ içeren bakterili ortam, GB, gliserin içeren bakterili ortam, EGB, eterik yağ+gliserin karışımı içeren bakterili ortam, EK, eterik yağ içeren bakterisiz kontrol ortamı, GK, gliserin içeren bakterisiz kontrol ortamı, EGK, eterik yağ+gliserin karışımı içeren bakterisiz kontrol ortamı

Çizelge 4.2. Bakterili ve bakterisiz deneme 2 ortamlarında zamana bağlı olarak pH seviyelerindeki değişim. Kısaltmalar: Şekil 4.7 ile aynıdır (sd=standart deviation=standart sapma)

Zaman	EB± sd	GB± sd	EGB± sd	EK± sd	GK± sd	EGK± sd
48. saat	8,53±0,070	5,10±0,020	7,31± 0,290	7,32±0,025	7,26±0,034	7,31± 0,015
96. saat	8,94±0,041	4,84±0,005	8,41±0,115	7,32± 0,025	7,26±0,023	7,3±0,036
144. saat	9,44±0,072	4,77	8,95±0,055	7,31±0,017	7,26±0,023	7,3±0,036



Şekil 4.8. Deneme 2 karbon kaynağına göre hazırlanmış ortamlarda bakteri gelişiminin zamana göre değişimi. Kısaltmalar: Şekil 4.7 ile aynıdır

Bölüm 3.3’de belirtildiği gibi bakterinin ürettiği ürünler 48. saatten itibaren, mobil faz olarak Solvent A kullanılarak TLC tabakası üzerinde tespit edilmiştir.

144. saat sonunda bakterili ortamlardan karbon kaynağı olarak eterik yağ içeren ortam, gliserin içeren ortam ve eterik yağ+gliserin karışımı içeren ortamdaki 254 nm UV ışığında sırası ile 0.26, 0.38 ve 0.36 Rf değerine sahip maddeler tespit edilmiştir, kontrol gruplarında aynı Rf değerinde bir madde saptanmamıştır (Şekil 4.9, Ok 2). Kontrol ortamlarında ve bakterili ortamlarda carvacrol 0.8 Rf değerine sahiptir (Şekil 4.9, Ok 1).

Şekil 4.9. Deneme 2'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü. Kısaltmalar: a) eterik yağ içeren bakterili ortam (EB), b) gliserin içeren bakterili ortam (GB), j) eterik yağ+gliserin karışımı içeren bakterili ortam (EGB), d) eterik yağ içeren bakterisiz kontrol ortamı (EK), e) gliserin içeren bakterisiz kontrol ortamı (GK), k) eterik yağ+gliserin karışımı içeren bakterisiz kontrol ortamı (EGK)

Bölüm 3.3'de belirtildiği gibi 254 nm UV ışığı altında kurşun kalemle, görülen maddeler işaretlenmiş ve TLC tabakalarına *Fusarium moniliforme* süspansiyonu püskürtülmüştür.

Bölüm 3.3'de belirtilen koşullarda 4 gün muhafaza edilen, üzerine fungus süspansiyonu püskürtülmüş plakalar 254 nm UV ışığında gözlenmiş ve fungusun gelişmediği bölgelerin ortalama Rf değerleri tespit edilmiştir. Bakterili ortamlardan karbon kaynağı olarak sırası ile eterik yağ içeren ortam, gliserin içeren ortam ve eterik yağ+gliserin karışımı içeren ortamdan 254 nm UV ışığında sırası ile 0.56, 0.52 ve 0.61 Rf değerine sahip fungitoksik etki gösteren maddeler tespit edilmiştir (Şekil 4.10, Ok 2 ve Şekil 4.11). Kontrol ortamlarında ve bakterili ortamlarda carvacrol bölgesinde (Rf 0.8) fungitoksik etki gözlenmiştir (Şekil 4.10, Ok 1).

Şekil 4.10. Üzerine fungus süspansiyonu püskürtülmüş, deneme 2'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü. Kısaltmalar: Şekil 4.9 ile aynıdır

Şekil 4.11. Üzerine fungus süspansiyonu püskürtülmüş, deneme 2'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent A'da geliştirilmiş plakalarının normal ışık altında görüntüsü

Bölüm 3.3’de belirtildiği gibi kontrol grubu yerine kimyasal yapısı bilinen maddeler konularak plakalar mobil faz olarak Solvent A kullanılarak geliştirilmiş ve daha sonra 254 nm UV ışığı altında gözlenmiştir. Bakterinin ürettiği ürünler ile kimyasal yapısı bilinen maddeler içinde aynı Rf değerine sahip madde bulunamamıştır (Şekil 4.12).

Şekil 4.12. Deneme 2’e göre hazırlanmış bakterili ortamların ve kimyasal yapısı bilinen maddelerin, Solvent A’da geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü. Kısaltmalar: a) EB, b) GB, j) EGB, g) Rosmarinic acid, h) Phenazine, i) Indol-3-asetik asit (IAA)

Bir sonraki aşama olarak daha detaylı analiz için Bölüm 3.3’de belirtildiği gibi mobil faz olarak toluen : etilasetat : formik asit (5:4:1) (Solvent B) kullanılarak tabakalar geliştirilmiştir.

Bakterili ortamlardan karbon kaynağı olarak eterik yağ içeren ortam ve eterik yağ+gliserin karışımı içeren ortamdan 254 nm UV ışığında sırası ile 0.63 ve 0.62 Rf değerine sahip maddeler tespit edilmiştir, kontrol gruplarında aynı Rf değerinde bir

madde saptanmamıştır (Şekil 4.13, Ok 2). Kontrol ortamlarında ve bakterili ortamlarda carvacrol 0.89 Rf değerine sahiptir (Şekil 4.13, Ok 1).

Şekil 4.13. Deneme 2'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent B'de geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü. a) EB, b) GB, j) EGB, d) EK, e) GK, k) EGK

Daha sonra plakalara Bölüm 3.4'de içeriği belirtilmiş olan salkowski reagent püskürtülmüş ve bakterili ortamlarda mevcut olan, ancak kontrol ortamlarında bulunmayan maddeler tespit edilmiş ve bakterinin ürettiği bu maddelerin ortalama Rf değerleri tespit edilmiştir. Eterik yağ içeren ortam ve eterik yağ+gliserin karışımı içeren ortamda sırası ile 0.63 ve 0.62 Rf değerine sahip maddeler tespit edilmiştir (Şekil 4. 14).

Şekil 4.14. Üzerine Salkowski reagent püskürtülmüş, deneme 2'e göre hazırlanmış ortamların, Solvent B'de geliştirilmiş plakalarının görüntüsü. Kısaltmalar: a) EB, b) GB, j) EGB, d) EK, e) GK, k) EGK

Bölüm 3.3'de belirtildiği gibi kontrol grubu yerine kimyasal yapısı bilinen maddeler konularak plakalar mobil faz olarak Solvent B kullanılarak geliştirilmiş ve daha sonra 254 nm UV ışığı altında gözlenmiştir. Bakterinin ürettiği ürünler ile kimyasal yapısı bilinen maddelerden indol-3-asetik asit (IAA) aynı Rf değerine (0.62) sahip bulunmuştur (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

Şekil 4.15. Deneme 2'e göre hazırlanmış bakterili ortamların ve kimyasal yapısı bilinen maddelerin, Solvent B'de geliştirilmiş plakalarının UV altında görüntüsü. Kısaltmalar: a) EB, b) GB, j) EGB, g) Rosmarinic acid, h) Phenazine, i) Indol-3-asetik asit (IAA)

Şekil 4.16. Deneme 2'e göre hazırlanmış bakterili ortamların ve kimyasal yapısı bilinen maddelerin, Solvent B'de geliştirilmiş plakalarının normal ışık altında görüntüsü

Daha sonra plakalar üzerine sülfürik asit-metanol (1:19) karışımı püskürtülmüştür. 100°C’de etüvde bekletilen plakalar üzerinde eterik yağ içeren ortam, eterik yağ+gliserin karışımı içeren ortam ve IAA aynı Rf değerine (0.62) sahip bulunmuştur (Şekil 4.17).

Şekil 4.17. Üzerine Sülfürik asit-Metanol karışımı püskürtülmüş, deneme 2’e göre hazırlanmış bakterili ortamların ve kimyasal yapısı bilinen maddelerin, Solvent B’de geliştirilmiş plakalarının görüntüsü. Kısaltmalar: Şekil 4.15’le aynıdır

Son olarak eterik yağ içeren bakterili ortamdan ve eterik yağ+gliserin içeren bakterili ortamdan alınan numuneler ve farklı konsantrasyonlarda IAA içeren numuneler aynı plakalarda geliştirilmiştir. Geliştirilen bu plakalar 254 nm UV ışığı altında incelenilerek, mukayese edilmiştir (Şekil 4.18).

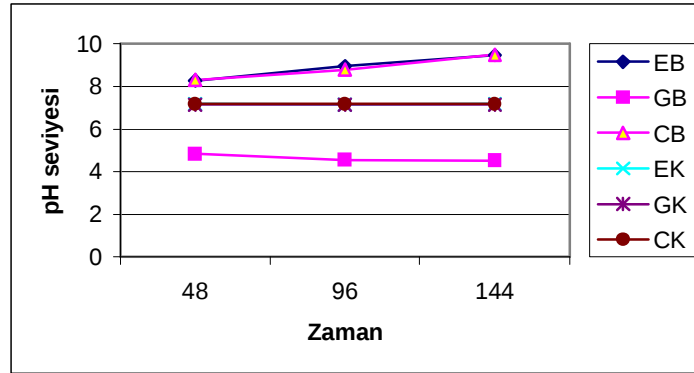
Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonlarda IAA'nın ve bakterinin ürettiği indole'un karşılaştırması. a) EB, j)EGB

4.3. Bakterinin Yetiştirildiği Karbon Kaynağına Göre İndol-3-asetik Asit Üretiminin Tespiti

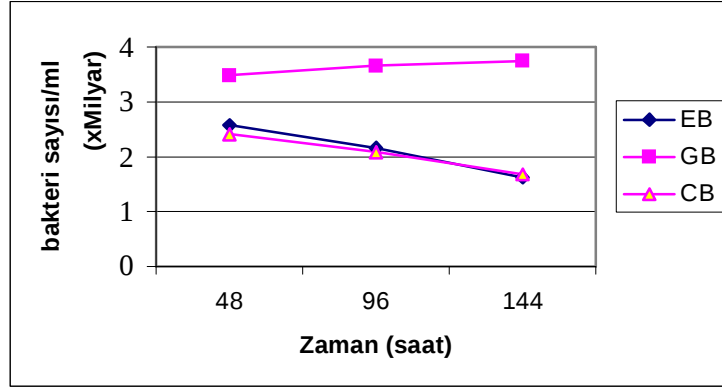
Bakteri, bölüm 3.2’de belirtildiği gibi karbon kaynakları 1.deneme için hazırlanmış besi ortamlarında yetiştirilmiş ve 48. 96. ve 144 saatlerde alınan numunelerden pH seviyesi (Çizelge 4.3, Şekil 4.19), bakteri sayısı/ml (Şekil 4.20) ve indol miktarı/ml (Çizelge 4.4) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Karbon kaynağına bağlı olarak ortamların pH’larının zamanla değişimi. Kısaltmalar: EB, eterik yağ içeren bakterili ortam, GB, gliserin içeren bakterili ortam, CB, carvacrol içeren bakterili ortam, EK, eterik yağ içeren bakterisiz kontrol ortamı, GK, gliserin içeren bakterisiz kontrol ortamı, CK, carvacrol içeren bakterisiz kontrol ortamı (sd=standart deviation=standart sapma)

Zaman	EB± sd	GB± sd	CB± sd	EK± sd	GK± sd	CK± sd
48. Saat	8,28±0,11	4,83±0,04	8,31±0,12	7,17±0,01	7,14±0,01	7,18±0,01
96. Saat	8,95±0,38	4,54±0,01	8,78±0,09	7,16±0,01	7,14±0,01	7,17±0,01
144. Saat	9,47±0,19	4,52±0,03	9,48±0,17	7,17±0,01	7,15±0,01	7,17±0,01



Şekil 4.19. Karbon kaynağına bağlı olarak ortamların pH’larının zamanla değişimi. Kısaltmalar: Çizelge 4.3’le aynıdır



Şekil 4.20. Karbon kaynağına bağlı olarak ortamlardaki bakteri sayısının zamanla değişimi. Kısaltmalar: Çizelge 4.3’le aynıdır

Çizelge 4.4. Karbon kaynağına bağlı olarak ortamlardaki indol miktarının zamanla değişimi (mg/ml). Kısaltmalar: Çizelge 4.3’le aynıdır (sd=standart deviation=standart sapma)

İndol miktarı (mg/ml)						
Zaman	EB± sd	GB± sd	CB± sd	EK± sd	GK± sd	CK± sd
48.Saat	0,0107±0,0004	0	0,0121±0,0008	0	0	0
96.Saat	0,0204±0,0016	0	0,0205±0,0022	0	0	0
144.Saat	0,0197±0,0013	0	0,0192±0,0013	0	0	0

Bakteri, bölüm 3.2’de belirtildiği gibi karbon kaynakları 2.deneme için hazırlanmış besi ortamlarında yetiştirilmiş ve 48. 96. ve 144 saatlerde alınan numunelerden indol miktarı/ml (Çizelge 4.5) tespit edilmiştir. pH seviyesi (Çizelge 4.2., Şekil 4.7), bakteri sayısı/ml (Şekil 4.8) bölüm 4.2’deki analiz sırasında belirtilmiştir.

Karbon kaynakları 2.deneme için hazırlanmış, bakterili ve bakterisiz ortamlardan alınan numunelerde Salkowski reagent uygulaması sonucu indol miktarına göre renk değişimi Şekil 4.21’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Karbon kaynağına bağlı olarak ortamlardaki indol miktarının zamanla değişimi (mg/ml). Kısaltmalar: EB, eterik yağ içeren bakterili ortam, GB, gliserin içeren bakterili ortam, EGB, eterik yağ+gliserin karışımı içeren bakterili ortam, EK, eterik yağ içeren bakterisiz kontrol ortamı, GK, gliserin içeren bakterisiz kontrol ortamı, EGK, eterik yağ+gliserin karışımı içeren bakterisiz kontrol ortamı (sd=standart deviation=standart sapma)

İndol miktarı (mg/ml)						
Zaman	EB± sd	GB± sd	EGB± sd	EK± sd	GK± sd	EGK± sd
48. Saat	0,008±0,0011	0	0,007±0,0016	0	0	0
96. Saat	0,0143±0,0013	0	0,0180±0,0028	0	0	0
144. Saat	0,0158±0,0005	0	0,0650±0,0162	0	0	0

Şekil 4.21. Karbon kaynakları 2.deneme için hazırlanmış bakterili ve bakterisiz ortamlardan alınan numunelerde Salkowski reagent uygulaması sonucu indole miktarına göre renk değişimi. a) Gliserinli bakterisiz kontrol, b) eterik yağlı bakterisiz kontrol, c) eterik yağ+gliserinli bakterisiz kontrol, d) gliserinli bakterili ortam, e) eterik yağlı bakterili ortam, f) eterik yağ+gliserinli bakterili ortam

4.4. Bakterinin Yetiştirildiği Karbon Kaynağına Göre Kitinaz Aktivitesinin Tespiti

48. saat sonunda elde edilen sonuçlar incelenilince (Çizelge 4.6) bakteri içeren ortamlarda kitinaz aktivitesi tespit edilmiştir ancak bakterisi uzaklaştırılmış ortamlarda (gliserin hariç) düşük bir kitinaz aktivitesi gözlenmiştir. Sadece bakterisi uzaklaştırılmış gliserin içeren ortamda kitinaz aktivitesi bulunamamıştır.

96. saat sonunda elde edilen sonuçlar incelendiğinde (Çizelge 4.6) ancak bu zamandan itibaren bakterisi uzaklaştırılmış ortamda kitinaz enzimi olduğunu görüyoruz, bakteri içeren ortamlarda kitinaz aktivitesi devam etmektedir. Sadece gliserin içeren bakterisi uzaklaştırılmış ortam hariç, diğer tüm bakterisi uzaklaştırılmış besi ortamlarında kitinaz aktivitesinin yükseldiği gözlenmiştir. Bu besi ortamları içerisinde en yüksek absorbans değerine bakterili veya bakterisi uzaklaştırılmış gliserin+carvacrol içeren ortam ulaşmıştır. Daha sonra sırası ile bakterili veya bakterisi uzaklaştırılmış eterik yağ içeren ortam ve bakterili veya bakterisi uzaklaştırılmış carvacrol içeren ortam ulaşmıştır.

154. saat ve 240. saat sonunda elde edilen sonuçlar incelenilince (Çizelge 4.6) bakteri içeren ortamlarda kitinaz aktivitesi tespit edilmiştir. Sadece gliserin içeren bakterisi uzaklaştırılmış ortam hariç diğer tüm bakterisi uzaklaştırılmış besi ortamlarında kitinaz aktivitesinde yükselme tespit edilmiştir.

Sonuç olarak ölçüm yapılan tüm zamanlarda (48. 96. 154. ve 240. saat) gliserin içeren bakterisi uzaklaştırılmış ortam hariç, bakterili veya bakterisi uzaklaştırılmış tüm ortamlarda kitinaz aktivitesi gözlenmiştir. Bütün ölçümlerde en yüksek kitinaz aktivitesine (bakterili veya bakterisi uzaklaştırılmış) gliserin+carvacrol içeren ortam ulaşmıştır.

Eterik yağlı ortamlarda pH seviyesinin bazik yönde kaydığı, gliserin içeren ortamlarda pH seviyesinin asidik yönde kaydığı tespit edilmiştir.

Kontrol ortamlarında ölçüm zamanlarının hiç birinde kitinaz aktivitesi saptanamamıştır.

Çizelge 4.6. Bakterinin kitinaz aktivitesine göre absorbands değerindeki değişim. Bakterinin kitinaz aktivitesinin incelenmesi için numune alınması zamanına kadar yetiştirildiği Karbon kaynakları Çizelgenin Sol kenarında belirtilmiştir, Muameleler ölçüm zamanının altında bildirilmiştir. Kısaltmalar: Bakteri, sadece bakteri içeren muamele, Be.O, bakterisi uzaklaştırılmış besi ortamı, Bak+Be.O, bakteri ve besi ortamı, GliCarvacrol, gliserin+carvacrol karışımı içeren ortam, pH.D.Gli, pH düzenlemesi yapılmış gliserinli ortam

<u>48.Saat</u>				
	Bakteri	Be.O	Bak+Be.O	Bak+Be.O pH Seviyesi
Eterik	0,376	0,072	0,454	8,067
Gliserin	0,294	0,004	0,409	5,310
pH.D.Gli	0,392	0,002	0,394	7,177
Carvacrol	0,257	0,099	0,354	8,107
GliCarvacrol	0,490	0,048	0,565	6,853
<u>96.Saat</u>				
	Bakteri	Be.O	Bak+Be.O	Bak+Be.O pH Seviyesi
Eterik	0,296	0,411	0,745	8,603
Gliserin	0,277	0,011	0,267	4,657
pH.D.Gli	0,276	0,025	0,370	7,303
Carvacrol	0,207	0,359	0,628	8,773
GliCarvacrol	0,389	0,796	1,024	8,503
<u>154.Saat</u>				
	Bakteri	Be.O	Bak+Be.O	Bak+Be.O pH Seviyesi
Eterik	0,253	0,395	0,775	9,333
Gliserin	0,419	0,026	0,409	4,733
pH.D.Gli	0,437	0,067	0,605	7,183
Carvacrol	0,176	0,463	0,669	9,340
GliCarvacrol	0,443	0,935	1,357	9,150
<u>240.Saat</u>				
	Bakteri	Be.O	Bak+Be.O	Bak+Be.O pH Seviyesi
Eterik	0,302	0,484	0,927	9,483
Gliserin	0,532	0,055	0,496	4,717
pH.D.Gli	0,549	0,097	0,767	7,153
Carvacrol	0,216	0,567	0,907	9,407
GliCarvacrol	0,542	1,018	1,527	9,520

4.5. Bakterinin Toprak Kökenli Bazı Fungal Patojenlere Olan Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi.

Bakterinin *R. solani*'ye etkisi incelendiğinde; eterik yağ, gliserin ve bakteri içeren ortamda fungusun hiç gelişemediğini görüyoruz. Aynı grubun bakteri içermeyen kontrol grubunda ise az bir engelleme gözükmemektedir. Engelleme durumuna göre daha sonra sırası ile eterik yağ ve bakteri içeren grup ve gliserin ve bakteri içeren grup gelmektedir. Bu gruplarda eterik yağ içeren kontrol grubu ve gliserin içeren kontrol grubu ile kıyaslanınca bakterinin etkisi istatistiki olarak önemli çıkmaktadır (Çizelge 4.7.) (Şekil 4.22).

Şekil. 4.22. *Rhizoctonia solani* denemesi. Kısaltmalar: a) Normal PDA kontrol grubu, b) Eterik yağlı bakterisiz kontrol grubu, c) Gliserinli bakterisiz kontrol grubu, d) Eterik yağ ve gliserinli bakterisiz kontrol grubu, e) Eterik yağ ve bakterili ortam, f) Gliserinli bakterili ortam, g) Eterik yağ ve gliserinli bakterili ortam

Mikroskopta yapılan gözlemler eterik yağın, *R. solani*'nin morfolojik yapısında bozulmalara yol açtığını göstermiştir (Şekil 4.22 ve Şekil 4.24).

Şekil 4.23. Normal *Rhizoctonia solani* misellerinin mikroskopta incelenmesi

Şekil 4.24. Eterik yağ içeren ortamda *Rhizoctonia solani* misellerinin mikroskopta incelenmesi

Bakteri içeren ortamda ise bakterinin, *R. solani*'nin miselleri etrafında bulunduğu ve kitini parçaladığı gözlenmiştir (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26).

Şekil 4.25. Bakteri içeren ortamda *Rhizoctonia solani* misellerinin mikroskopta incelenmesi

Şekil 2.26. Bakteri içeren ortamda *Rhizoctonia solani* misellerinin mikroskopta incelenmesi

Bakterinin *F. moniliforme*'ye etkisi denendiğinde bakterili grupların kontrol gruplarına kıyasla gelişmeyi istatistiki olarak ($P<0.05$) önemli derecede gelişmeyi engellediği gözlenmiştir (Çizelge 4.7).

Bakteri içeren gruplar kendi içlerinde kıyaslanınca en yüksek engellemeye eterik yağ ve gliserin içeren grup, daha sonra sadece gliserin içeren grup ve sonra da eterik yağ içeren grup sahiptir (Şekil 4.27).

Kontrol grupları kendi içlerinde incelenilince sadece eterik yağın engelleyici etkisi gözlenmektedir.

Şekil. 4.27. *Fusarium moniliforme* denemesi. Kısaltmalar: a) Normal PDA kontrol grubu, b) Eterik yağlı bakterisiz kontrol grubu, c) Gliserinli bakterisiz kontrol grubu, d) Eterik yağ ve gliserinli bakterisiz kontrol grubu, e) Eterik yağ ve bakterili ortam, f) Gliserinli bakterili ortam, g) Eterik yağ ve gliserinli bakterili ortam

Bakterinin *S. sclerotiorum*'a etkisi denendiğinde fungusun bakterili ortamlarda ve kontrol gruplarından eterik yağ içeren grup ve gliserin içeren grupta gelişmediği gözlenmiştir. Ancak eterik yağ ve gliserin içeren kontrol grubunda Normal PDA kontrol grubu kadar iyi geliştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Bakterinin *P. capsici*'ye etkisi denendiğinde bakteri içeren grupların kontrol gruplarına kıyasla istatistiki olarak ($P<0.05$) önemli derecede gelişmeyi engellediği gözlenmiştir. Bakteri içeren gruplar kendi içlerinde kıyaslanınca gelişmeyi engelleme bakımından eterik yağ, gliserin içeren grubun en yüksek misel çap azaltıcı etkisi olduğu gözlenmiştir. Daha sonra sırası ile eterik yağ içeren grup ve gliserin içeren grup gelmektedir (Çizelge 4.7)(Şekil 4.28).

Kontrol grubu gelişmeyi engelleme bakımından incelenilince eterik yağı içeren grupta misel çap azaltıcı etki gözlenmiştir, daha sonra eterik yağ, gliserin içeren kontrol grubu gelmektedir.

Şekil 4.28. *Phytophthora capsici* denemesi. Kısaltmalar: Şekil 4.27 ile aynıdır

Çizelge 4.7. Bakterinin toprak kökenli bazı fungal patojenlere olan antagonistik etkisinin istatistiki incelenmesi (sd=standart deviation=standart sapma)

Misel Çapı (mm) *								
<u>FUNGUSLAR</u>	Eterik yağ- Bakteri ±sd (EB)	Gliserin- Bakteri±sd (GB)	Eterik yağ- Gliserin- Bakteri ±sd (EGB)	Eterik yağ- Kontrol±sd (EK)	Gliserin- Kontrol±sd (GK)	Eterik yağ- Gliserin- Kontrol±sd (EGK)	Normal PDA Kontrol	LSD
<i>Rhizoctonia solani</i>	22.2±7.45 D	29.0±4.73 C-D	0 E	33.7±3.89 C	76.6±0.89 A	51.8±11.97 B	77.0 A	7.5201
<i>Fusarium moniliforme</i>	6.6±9.03 C	2.2±1.48 C	0 C	24.3±8.32 B	52.5±3.80 A	47.5±8.40 A	43.6±8.24 A	8.9589
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0 B	0 B	0 B	15.4±34.4 B	0 B	61.6±34.4 A	77.0 A	25.952
<i>Phytophthora capsici</i>	5.4±0.65 D	18.6±4.23 C	1.5±1.17 E	19.5±2.73 C	43.6±1.98 A	26.6±1.88 B	42.0±1.83 A	3.036

* Aynı sıra içinde farklı harfle gösterilen gruplar arasında fark LSD (P<0.05) testine göre önemli bulunmuştur.

4.6. Bakterinin Bitki Aktivatörü Olarak Etkinliğinin Belirlenmesi

Tüm bitki yaş ağırlığı bakımından AkseBio uygulanmış grup, steril edilmiş AkseBio uygulanmış grup ve kontrol grubu arasında istatistiki olarak ($P<0.05$) farklılıklar mevcuttur, en yüksek bitki yaş ağırlığına AkseBio uygulanmış grup ulaşmıştır (Çizelge 4.8) (Şekil 4.29).

Şekil. 4.29 Salatalık bitkilerinde bitki gelişmesindeki farklılıklar. a) Aksebio uygulanmış grup, b) Steril edilmiş Aksebio uygulanmış grup, c) Kontrol grubu (musluk suyu)

Yaprak yaş ağırlığı bakımından steril edilmiş AkseBio uygulanmış grup ve kontrol grubu arasında istatistiki olarak ($P<0.05$) bir fark bulunmamıştır ancak AkseBio uygulanmış grup ile steril edilmiş AkseBio uygulanmış grup ve kontrol grubu arasında istatistiki olarak önemli ($P<0.05$) farklılıklar gözlenmiştir ve en yüksek yaş ağırlığına AkseBio uygulanmış grup sahiptir (Çizelge 4.8) (Şekil 4.32).

Yaprak kuru ağırlığı bakımından steril edilmiş AkseBio uygulanmış grup ve kontrol grubu arasında istatistiki olarak ($P<0.05$) bir fark bulunmamıştır ancak AkseBio uygulanmış grup ile steril edilmiş AkseBio uygulanmış grup ve kontrol grubu arasında istatistiki olarak önemli ($P<0.05$) farklılıklar gözlenmiştir ve en yüksek kuru ağırlığa AkseBio uygulanmış grup sahiptir (Çizelge 4.8) (Şekil 4.33).

Kök yaş ağırlığı bakımından steril edilmiş AkseBio uygulanmış grup ve kontrol grubu arasında istatistiki olarak ($P<0.05$) bir fark bulunmamıştır ancak AkseBio uygulanmış grup ile steril edilmiş AkseBio uygulanmış grup ve kontrol grubu arasında istatistiki olarak önemli ($P<0.05$) farklılıklar gözlenmiştir ve en yüksek kök yaş ağırlığına AkseBio uygulanmış grup sahiptir (Çizelge 4.8) (Şekil 4.34).

Kök kuru ağırlığı bakımından steril edilmiş AkseBio ve AkseBio uygulanmış grup arasında istatistiki olarak ($P<0.05$) bir fark bulunmamıştır ancak kontrol grubuyla bu iki grup arasında istatistiki olarak önemli ($P<0.05$) bir fark mevcuttur ve en yüksek kuru ağırlığa bu iki grup sahiptir (Çizelge 4.8).

Bitkilerin kök uzunlukları bakımından AkseBio uygulanmış grup ve steril edilmiş AkseBio uygulanmış grup arasında istatistiki olarak ($P<0.05$) bir fark mevcut değildir ancak kontrol grubu ile karşılaştırılınca en uzun kök uzunluğuna bu iki grup sahiptir (Çizelge 4.8) (Şekil 4.30).

Yaprak alanı bakımından steril edilmiş AkseBio uygulanmış grup ile kontrol grubu arasında istatistiki olarak ($P<0.05$) bir fark bulunmamıştır ancak AkseBio uygulanmış grup ile steril edilmiş AkseBio ve kontrol grubu arasında önemli ($P<0.05$) bir fark mevcuttur ve en geniş yaprak alanına AkseBio uygulanmış grup sahiptir (Çizelge 4.8) (Şekil 4.35). Şekil 4.31’de gruplar arasındaki fark açıktır.

Çizelge 4.8. Salatalık bitkisine AkseBio, Steril edilmiş AkseBio ve Kontrol (musluk suyu) uygulaması sonucunda elde edilen verilerin istatistiki incelenmesi. (sd=standart deviation=standart sapma)

*	<u>AkseBio±sd</u>	<u>Steril AkseBio±sd</u>	<u>Kontrol±sd</u>	<u>LSD</u>
Tüm Bitki Yaş Ağırlığı (g/bitki)	1,93±0,33 A	1,37±0,14 B	1,16±0,15 B	0,223
Yaprak Yaş Ağırlığı (g/bitki)	0,33232±0,037 A	0,20629±0,036 B	0,18963±0,034 B	0,034
Yaprak Kuru Ağırlığı (g/bitki)	0,03589±0,008 A	0,02573±0,006 B	0,02411±0,005 B	0,005
Kök Yaş Ağırlığı (g/bitki)	0,09278±0,041 A	0,05495±0,024 B	0,02988±0,008 B	0,026
Kök Kuru Ağırlığı (g/bitki)	0,01602±0,0049 A	0,01576±0,0028 A	0,00896±0,0022 B	0,0036
Kök Uzunluğu (mm/bitki)	144,6±45,9 A	145±23,2 A	99,6±31,2 B	28,99
Yaprak Alan Değeri (mm²/yaprak)	2945,46±343,13 A	1699,53±215,83 B	1725,03±265,17 B	228,69

* Aynı sıra içinde farklı harfle gösterilen gruplar arasında fark LSD (P<0.05) testine göre önemli bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Kuramsal bilgilerde bölüm 2.1’de belirtildiği gibi kekik eterik yağının funguslara ve bakterilere antimikrobiyal etkinliği vardır.

Bu antimikrobiyal özellik mikroorganizmaların hücre yapılarında değişikliğe sebep olarak etkisini göstermektedir (Ultee vd 1999, Aras ve Usai 2001, Burt ve Reinders 2003).

Doğada çeşitli bitkilerin eterik yağlarını ve bu eterik yağların komponentlerini parçalayan mikroorganizmalar olduğu bildirilmiştir (Harder ve Probian 1995, Savithiry vd 1998, Pavlostathis ve Misra 1999, Keudell vd 2000, Heyen ve Harder 2000, Harder vd 2000, Schwämmle vd 2001) ancak bu çalışmalardan elde edilen sonuçların tarım alanında kullanımına rastlanılmamıştır.

Yapılmış olan bu çalışmada eterik yağı ve eterik yağını parçalayan bir mikroorganizma aynı anda kullanılmış ve bitki patojeni funguslara etki mekanizması incelenilmiştir.

Bu amaçla Bölüm 3.2’de belirtildiği gibi bakteri farklı karbon kaynaklarıyla yetiştirilmiş ve bu yetiştirme sonucunda yapılan mobil faz Solvent A ile geliştirilmiş TLC çalışmalarında, bakterinin eterik yağ, gliserin ve carvacrol’u parçalayarak fungitoksik maddeler ürettiği UV altında tespit edilmiştir (Şekil 4.4 ve 4.10). Bu maddeler yapısı gereği UV ışığında gözükmemekte ancak Sülfürik asit: Metanol (1:19) karışımı püskürtülünce görülebilmektedir (Şekil 4.5) ve sırası ile 0.46, 0.51 ve 0.46 Rf değerleri vermektedir. Bu maddelerin Rf değerleri arasında az bir fark vardır ve bakteri yetişirken gliserinli ortamın pH’sını asidik yönde, eterik yağlı ve carvacrol’lu ortamın pH’sını bazik yönde değiştirmektedir.

Daha sonra yapılan indol analizi ve kitinaz enzimi aktivitesi sonuçları da gliserinli ortamda yetişen bakterinin bu maddeleri üretmediğini göstermiştir. Bu veriler bize bakterinin eterik yağı parçalarken farklı, gliserini parçalarken farklı metabolik işlemlerden geçirdiği yolunda ipucu sağlayabilir.

Solvent A ile yapılan çalışmalar bakterinin ürettiği tüm metabolitleri göstermemektedir. Özellikle bakterinin bitki aktivatörü olarak etki göstermesinde görev aldığından şüphelenilen indol-3-asetik asit Solvent A ile yapılan çalışmalarda TLC’de geliştirilememektedir (Şekil 4.6) bu bakımdan mobil faz Solvent B ile değiştirilerek çalışmalara devam edilmiş ve bakterinin eterik yağ içeren ortamlarda ürettiği ürünler ile indol-3-asetik asit’le aynı Rf değerinde (0.62) tespit edilmiştir.

Daha sonra bakterinin ürettiği ürünün indol-3-asetik asit olduğundan emin olmak için içeriği daha evvelden belirtilmiş indikatör Salkowski reagentla reaksiyona girmesi ve renk değişikliği incelenilmiştir (Şekil 4.21).

Bölüm 3.4’de belirtildiği gibi bakterinin ürettiği IAA miktarı tayin edilmeye çalışılmış ve ortamdaki bakteri sayısı ve pH seviyesine de bağlı olarak, 144 saat sonunda eterik yağlı ortamda 0.0158 mg/ml, carvacrol’lu ortamda 0.0192 mg/ml ve eterik yağ+gliserin karışımı içeren ortamda 0.065 mg/ml IAA ürettiği tespit edilmiştir.

Bakterinin yetiştirildiği karbon kaynağına göre kitinaz aktivitesinin tespiti sonucunda elde edilen sonuçlar bölüm 4.5’de bakterinin fungal patojenlere olan antagonistik etkisinin belirlenmesi sonuçlarıyla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir ve bakterinin kitinolitik enzimler ürettiği tespit edilmiştir.

Bakterinin 240 saatlik gelişmesi incelendiğinde 48. saatte düşük enzim aktivitesi tespit edilmiştir, 96. saatten itibaren ortamda önemli düzeyde kitinolitik enzim biriktiğini gözlüyoruz, (Gliserinli ortam hariç) bakteri ortamdan uzaklaştırılınca enzimlerin tek başlarına substratı parçaladıkları tespit edilmiştir. 96.saatten 240. saat sonuna kadar (gliserinli ortam hariç) bakterisi uzaklaştırılmış ortamlarda enzim tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Eterik yağlı bakteriden ari ortam, carvacrol’lu bakteriden ari ortam ve gliserin+carvacrol karışımı içeren bakteriden ari ortamda tespit edilen absorbans değerleri ve aynı ortamların sadece bakteri içeren ortamlarının absorbans değerlerinin toplamı, belirtilen ortamların bakterili olanlarına (Çizelge 4.6, Bak+Be.O) yakın değerler göstermektedir. Bu sonucun eldesinde ortamda birikmiş enzimler ve bakterinin aktif olarak ürettiği enzimlerin etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

Gliserin parçalanması sonucu ortam pH'sının düşük olmasının enzim aktivitesini etkileyebileceğini düşünerek pH seviyeleri 7.00 civarında numuneler hazırlanmış ancak bu numunelerde enzim aktivitesi tespit edilmemiştir. Ancak ortamdan gliserin uzaklaştırılması durumunda bakteri kitinolitik enzimler üretmektedir.

Gliserinli ortamda bakterinin kitinolitik enzimler üretmemesinin sebebi olarak gliserini parçalamak için farklı bir metabolizma yaptığı düşünülebilir.

Bölüm 4.5'de elde edilen sonuçlara göre bakterinin toprak kökenli fungal patojenlere etkisi incelendiğinde ortamda mevcut olan eterik yağın tek başına antifungal etkisi olduğu tespit edilmiştir ancak bakterinin bulunması durumunda etkinin arttığı görülmüştür. Mikroskopta yapılan incelemeler bakterinin özellikle *R. solani*'nin kitin yapısını parçaladığını göstermiştir, bu da bakterinin kitinolitik enzimler ürettiği konusunda delil teşkil etmektedir.

Bakterinin *S. sclerotiorum*'a etkisi denendiğinde bakterili ortamlarda ve eterik yağ içeren kontrol grubu ve gliserin içeren kontrol grubunda gelişme gözlenmemiştir ancak eterik yağ ve gliserin karışımı içeren kontrol grubunda normal PDA kontrol grubu kadar iyi geliştiği tespit edilmiştir. Bu sonucun eldesinde düşük miktarda eterik yağın *Sclerotinia* için uyarıcı etkisi olduğu ve fungusun kısa sürede adapte olduğu düşünülebilir.

Bakterinin bitki aktivatörü olarak etkinliğinin belirlenmesi sonucunda, içerisinde eterik yağ ve canlı bakteri içeren AkseBio uygulanmış grupta, bitkinin gelişmesinin, steril AkseBio uygulanmış grup ve kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak önemli düzeyde etkilediği tespit edilmiştir. Özellikle yaprak yaş ağırlığı, yaprak kuru ağırlığı, kök yaş ağırlığı ve yaprak alanı ölçümlerinde gelişmeyi arttırıcı etki barizdir. Bu sonucun eldesinde daha evvel bölüm 4.3'de tespit edilen bakterinin indol-3-asetik asit üretiminin etkisi olduğu düşünülebilir.

6. SONUÇ

Yaşadığımız çağda, hastalık ve zararlılarla mücadelede kimyasallara alternatif çözümler aranmaktadır. Bu çözümler arasında bitkilerden elde edilen yağlar oldukça ümit verici sonuçlar göstermektedir.

Yeryüzünde mevcut olan bütün organik ve inorganik maddeler parçalanma ve dönüşüm döngüsü içerisinde yer almaktadır.

Bu yapılan çalışmada “AkseBio” isimli, içeriğini *T. spicata* uçucu eterik yağı, bitkisel yağlar ve bitki özleri oluşturan preparatın doğada mikrobiyolojik olarak parçalanması sonucunda oluşan maddeler ve oluşan bu maddelerin bitki patojeni funguslara etkisi tespit edilmiştir.

Eterik yağı veya carvacrol’u karbon kaynağı olarak kullanan bakterinin TLC yöntemi kullanılarak fungitoksik etkiye sahip metabolit üretimi ve indol-3-asetik asit üretimi tespit edilmiştir. Ayrıca eterik yağın, bakterinin, fungusların yapısındaki kitini parçalayıcı kitinolitik enzim üretimine olumlu etkide bulunduğu da tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, geçmiş yıllarda bölümümüzde yapılmış olan çalışmalardan elde edilen verilerin ve bu çalışmadan elde edilen verilerin ışığında “AkseBio” preparatının toprağa uygulandığı andan itibaren eterik yağın antimikrobiyal etkinliği ile ortamdaki potansiyel fungal patojenleri azaltarak, bakterinin gelişimi lehine bir ortam hazırladığını söyleyebiliriz.

Bu ortamda bakteri, kekik yağını parçalayarak hem gelişimine devam etmekte, hem de ortama kitinolitik enzimler ve indol-3-asetik asit salgılamaktadır. Salgılanan kitinolitik enzimlerle bitki funguslara karşı korunmakta ve indol-3-asetik asit üretimiyle bitki gelişimi teşvik edilmektedir.

Bu çalışma, bu konuda yapılan ülkemizdeki ilk çalışmayı temsil etmektedir. Mevcut bilgiler dahilinde “AkseBio” preparatının geliştirilmesi ile, pratikte bu preparatı

kullanıcıların daha bilinçli bir yaklaşımla sonuç alıp, sentetik tarım ilacı kullanımının minimum düzeyde tutulması ve daha kaliteli ve bol ürün alınmasına yardımcı olunabilir.

7. KAYNAKLAR

- ABE, S., SATO, Y., INOUE, S., ISHIBASHI, H., MARUYAMA, N., TAKIZAWA, T., OSHIMA, H. and YAMAGUCHI, H. 2003. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi = Japanese Journal of Medical Mycology*, 44 (4): 285-291.
- ABRAHAM, W.R., HOFFMANN, H.M., KIESLICH, K., RENG, G. and STUMPF, B. 1985. Microbial transformations of some monoterpenoids and sesquiterpenoids. Enzymes in organic chemistry. Ciba Foundation Symposium III. Pitman, London. 146-160.
- AMARAL, J.A., EKINS, A., RICHARDS, S.R. and KNOWLES, R. 1998. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2): 520-525.
- ANONYMOUS. 2004. History and development of antimicrobial drugs. <http://www.lcsc.edu/msattern/drugs.htm>.
- ARRAS, G. and USAI, M. 2001. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection*, 64 (7): 1025-1029.
- BAGAMBOULA, C.F., UYTENDAELE and M., DEBEVERE, J. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, etragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21 (1): 33-43.
- BANCHIO, C. and GRAMAJO, H.C. 1997. Medium and long chain fatty acid uptake and utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2): first characterization of a Gram positive bacterial system. *Microbiology*, 143: 2439-2447.
- BARBİRATO, F., VERDOES, J.C., DE BONT, J.A.M. and VAN DER WERF, J.M. 1998. The *Rhodococcus erythropolis* DCL14 limonene-1,2-epoxide hydrolase gene encodes an enzyme belonging to a novel class of epoxide hydrolases. *FEBS Letters*, 438: 293-296.
- BASIM, H., YEĞEN, O. and ZELLER, W. 2000. Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* on some plant pathogenic bacteria. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz (Journal of Plant Disease and Protection)*, 279 (3): 279-284.

- BAYSAL, Ö. 1997. Karabaş kekiği (*Thymbra spicata* L. var. *spicata*) uçucu yağını parçalayan mikroorganizmaların saptanması ve bu mikroorganizmaların toprak kökenli bazı bitki patojenlerine olan etkisinin araştırılması. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Antalya, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. 44 s.
- BAYSAL, Ö. und YEĞEN, O. 1997. Determination of Microorganisms Decomposing Essential Oils of *Thymbra spicata* L. var *spicata* and Effect of some of the Soil-Borne Pathogens on these Microorganisms. 5. Symposium über Wissenschaftliche ergebnisse Deutsch-Türkischer Universitetspartner schaften im Agrarbereich. Kurzfassung der Vortraege. S. 77.
- BEUNINK, J. and REHM, H.J. 1988. Synchronous anaerobic and aerobic degradation of DDT by an immobilized mixed culture system. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 29: 72-80.
- BOTES, A.L., WEIJERS, C.A.G.M. and VAN DYK, M.S. 1998. Biocatalytic resolution of 1,2-epoxyoctane using resting cells of different yeast strains with novel epoxide hydrolase activities. *Biotechnology Letters*, 20 (4): 421-426.
- BOUCHRA, C., ACHOURI, M., IDRISSE HASSANI, L.M. and HMAMOUCHE, M. 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology*, 89 (1): 165-170.
- BOUVET, O.M., LENORMAND, P., AGERON, E. and GRIMONT, P.A.D. 1995. Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the Enterobacteriaceae. *Research in Microbiology*, 146 (4): 279-290.
- BRANDL, M.T. and LINDOW, S.E. 1996. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (11): 4121-4128.
- BRANDL, M.T. and LINDOW, S.E. 1998. Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9): 3256-3263.
- BURKHEAD, K.D., SCHISLER, D.A. and SLININGER, P.J. 1995. Bioautography shows antibiotic production by soil bacterial isolates antagonistic to fungal dry rot of potatoes. *Soil Biol. Biochem.*, 27 (12): 1611-1616.
- BURKHEAD, K.D., SLININGER, P.J. and SCHISLER, D.A. 1998. Biological control bacterium *Enterobacter cloacae* S11:T:07 (NRRL B-21050) produces the antifungal compound phenylacetic acid in Sabouraud maltose broth culture. *Soil Biol. Biochem.*, 30 (5): 665-667.

- BURT, S.A. and REINDERS, R.D. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* 0157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36 (3): 162-168.
- CHEN, G., ZHANG, Y., LI, J., DUNPHY, G.B., PUNJA, Z.K. and WEBSTER, J.M. 1996. Chitinase activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species, bacterial associates of entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 68: 101-108.
- CHERNIN, L., ISMAILOV, Z., HARAN, S. and CHET, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (5): 1720-1726.
- CONVERTI, A. and PEREGO, P. 2002. Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 303-309.
- CROMWICK, A.M., FOGLIA, T. and LENZ, R.W. 1996. The microbial production of poly(hydroxyalkanoates) from tallow. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46: 464-469.
- ÇAKIR, C. 1992. Antalya ve çevresinde doğal olarak yetiştirilen bazı bitkilerin fungitoksik potansiyellerinin araştırılması. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Antalya, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. 91 s.
- ÇAKIR, C. ve YEĞEN, O. 1991. Antalya ve çevresindeki bazı bitkilerin uçucu yağlarının fungitoksik potansiyellerinin araştırılması. Türkiye Fitopatoloji Derneği Yayınlar No: 6: 213-218.
- DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N. and POLISSIOU, M.G. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (6): 2576-2581.
- DE CARVALHO, C.C.R., VAN KEULEN, F. and DA FONSECA, M.M.R. 2000. Biotransformation of Limonene-1,2-epoxide to Limonene-1,2-diol by *Rhodococcus erythropolis* cells. *Food Technol. Biotechnol.*, 38 (3): 181-185.
- DE CARVALHO, C.C.R.C. and DA FONSECA, M.M.R. 2003. Towards the bio-production of trans-carveol and carvone from limonene: induction after cell growth on limonene and toluene. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14: 3925-3931.
- DEACON, J. 2004. The microbial world, Penicilin and other antibiotics. <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/penicill.htm>

- DORMAN, H.J.D. and DEANS, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
- DUETZ, W.A., BOUWMEESTER, H., VAN BEILEN, J. B. and WITHOLT, B. 2003. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61: 269-277.
- EHMANN, A. 1977. The van urk – salkowski reagent – a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *Journal of Chromatography*, 132: 267-276.
- FABIO, A., CORONA, A., FORTE, E. and QUAGLIO, P. 2003. Inhibitory activity of spices and essential oils on psychrotrophic bacteria. *New Microbiologica*, 26 (1): 115-120.
- FAN, M. and CHEN, J. 2001. Studies on antimicrobial activity of extracts from thyme. *Wei sheng wu xue bao = Acta Microbiologica Sinica*, 41 (4): 499-504.
- FRIEDMAN, M., HENIKA, P.R. and MANDRELL, R.E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65 (10): 1545-1560.
- GIAMPERI, L., FRATERNALE, D. and RICCI, D. 2002. The in vitro action of essential oils on different organisms. *Journal of Essential Oil Research*, 14 (4): 312-318.
- GILBERT, E.S. and CROWLEY, D.E. 1997. Plant compounds that induce Polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (5): 1933-1938.
- GLICK, B.R., PENROSE, D.M. and LI, J. 1998. A Model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.*, 190: 63-68.
- GLICKMANN, E. and DESSAUX, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (2): 793-796.
- GOUYON, P.H., FORT, P.H. and CARAUX, G. 1983. Selection of seedlings of *Thymus vulgaris* by grazing slugs. *Journal of Ecology*, 71: 299-306.
- GUYNOT, M.E., RAMOS, A.J., SETÓ, L., PURROY, P., SANCHIS, V. and MARIN, S. 2003. Antifungal activity of volatile compound generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, 94 (5): 893-900.

- GÜMRÜKÇÜ, E. 2001. Toprak sterilantı olarak kullanılan Metil Bromid'e alternatif bazı yöntemlerin karşılaştırılması. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Antalya, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. 85 s.
- HAMMER, K.A., CARSON, C.F. and RILEY, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985-990.
- HANDELSMAN, J. and STABB, E.V. 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant Cell*, 8: 1855-1869.
- HARDER, J. and PROBIAN, C. 1995. Microbial degradation of Monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (11): 3804-3808.
- HARDER, J., HEYEN, U., PROBIAN, C. and FOß, S. 2000. Anaerobic utilization of essential oils by denitrifying bacteria. *Biodegradation*, 11: 55-63.
- HEYEN, U. and HARDER, J. 2000. Geranic acid formation, an initial reaction of anaerobic monoterpene metabolism in denitrifying *Alcaligenes defragrans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (7): 3004-3009.
- HORVÁTH, G.Y., KOCSIS, B., BOTZ, L., NÉMETH, J. and SZABÓ, L.G.Y. 2002. Antibacterial activity of *Thymus* phenols by direct bioautography. *Acta Biologica Szegediensis*, 46 (3-4): 145-146.
- HOWELL, C.R., BEIER, R.C. and STIPANOVIC, R.D. 1988. Production of Ammonia by *Enterobacter cloacae* and it's possible role in biological control of *Pythium* preemergence Damping-off by the bacterium. *Phytopathology*, 78: 1075-1078.
- HU, B., ZHU, J., SHEN, S.C. and YU, G.Q. 2000. A promoter region binding protein and DNA Gyrase regulate anaerobic transcription of nifLA in *Enterobacter cloacae*. *Journal of Bacteriology*, 182 (14): 3920-3923.
- HWANG, Y-H., JANG, Y-S., KIM, M-K. and LEE, H-S. 2002. Fatty acid composition of Rice Bran Oil and growth-promoting effect of Rice Bran Extract and Rice Bran Oil on *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. *Agric. Chem. Biotechnol.*, 45 (3): 121-124.
- INOUE, S., TSURUOKA, T., WATANABE, M., TAKEO, K., AKAO, M., NISHIYAMA, Y. and YAMAGUCHI, H. 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses*, 43: 17-23.
- INOUE, S., YAMAGUCHI, H. and TAKIZAWA, T. 2001 a. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J. Infect. Chemother.*, 7: 251-254.

- INOUE, S., TAKIZAWA, T. and YAMAGUCHI, H. 2001 b. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47 (5): 565-573.
- INOUE, S., UCHIDA, K. and YAMAGUCHI, H. 2001 c. In vitro and in vivo anti-*Trichophyton* activity of essential oils by vapour contact. *Mycoses*, 44: 99-107.
- ISAACSON, P.J. and WEBSTER, J.M. 2002. Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. RIO (Enterobacteriaceae) symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 79: 146-153.
- IURESCIA, S., MARCONI, A.M., TOFANI, D., GAMBACORTA, A., PATERNO, A., DEVIRGILIIS, C., VAN DER WERF, M.J. and ZENNARO, E. 1999. Identification and Sequencing of β -Myrcene catabolism genes from *Pseudomonas* sp. strain M1. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7): 2871-2876.
- JANICSÁK, G. and MÁTHÉ, I. 1997. Parallel determination of Rosmarinic acid and Caffeic acids by TLC-Densitometry. *Chromatographia*, 46 (5/6): 322-324.
- KAGEYAMA, K. and NELSON, E.B. 2003. Differential inactivation of seed exudate stimulation of *Pythium ultimum* sporangium germination by *Enterobacter cloacae* influences biological control efficacy on different plant species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2): 1114-1120.
- KANESHIRO, T., KOU, T.M. and NAKAMURA, L.K. 1999. Conversion of unsaturated fatty acids by bacteria isolated from compost. *Current Microbiology*, 38: 250-255.
- KEUDELL, K.C., HUANG, J-K., WEN, L., KLOPFENSTEIN, W.E., BAGBY, M.O., LANSER, A.C., PLATTNER, R.D., PETERSON, R.E. and WEISLEDER, D. 2000. Fatty acids enhanced tubercin production by *Pseudomonas* strain 2HS. *Microbios*, 102: 27-38.
- KRIEG, R.N. and HOLT, G.J. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1: 964 pp.
- KUMAR, N. and DAS, D. 2000. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochemistry*, 35: 589-593.
- LEDERBERG, J. and LEDERBERG, E.M. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*, 63 (3): 399-406.

- LEJBØLLE, K.B. 2000. Risk assessment of genetically modified derivatives of *Pseudomonas fluorescens* F 113 for use in bioremediation of PCB contaminated soil. Ministry of Environment and Energy Denmark. <http://www.sns.dk/natur/bioteknologi/Risk>
- LI, J., OVAKIM, D.H, CHARLES, T.C. and GLICK, B.R. 2000. An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. *Current Microbiology*, 41: 101-105.
- MANOU, I., BOUILLARD, L., DEVLEESCHOUWER, M.J. and BAREL, A.O. 1998. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 368-376.
- MIRZA, M.S., AHMAD, W., LATIF, F., HAURAT, J., BALLY, R., NORMAND, P. and MALIK, K.A. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*, 237: 47-54.
- MISRA, G., PAVLOSTATHIS, S.G., PERDUE, E.M. and ARAUJO, R. 1996. Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45: 831-838.
- MITZKAT, L. 2001. Die Optimierung des mikrobiellen Abbaus von Limonen in Biofiltern. Ph. D. Thesis (unpublished), University of Leipzig, 104 pp.
- MÜLLER-RIEBAU, F., BERGER, B. und YEĞEN, O. 1994. Untersuchungen zur fungitoxischen Wirkung von etherischen Ölen aus türkischen Wildkrautern auf phytopathogene. *Pilze. Mitt. a. d. Biol. Bundesant. H.*, 301-385.
- MÜLLER-RIEBAU, F., BERGER, B. and YEĞEN, O. 1995. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2262-2266.
- MÜLLER-RIEBAU, F., BERGER, B., YEĞEN, O. und ÇAKIR, C. 1996. Fungitoxische etherische Ole in türkischen Wildkrautern: Einfluss von Standort und Jahreszeit auf Gehalt, Zusammensetzung und Konzentration der Inhaltsstoffe. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Fortwirtschaft. Berlin – Dahlem. Heft 321. 424.
- NG, K.K. and WEBSTER, J.M. 1997. Antimycotic activity of *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) metabolites against *Phytophthora infestans* on potato plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 125-132.

- NIE, L., SHAH, S., RASHID, A., BURD, G.I., DIXON, D.G. and GLICK, B.R. 2002. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 355-361.
- ONKEN, J. and BERGER, R.G. 1999. Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *Journal of Biotechnology*, 69 (2-3): 163-168.
- PAVLOSTATHIS, S.G. and MISRA, G. 1999. Biotransformation of selected monoterpenes under nitrate-reducing conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 63-68.
- PINA-VAZ, C., GONÇALVES RODRIGUES, A., PINTO, E., COSTA-DE-OLIVEIRA, S., TAVARES, C., SALGUEIRO, L., CAVALEIRO, C., GONÇALVES, M.J. and MARTINEZ DE OLIVEIRA, J. 2004. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology*, 18 (1): 73-79.
- PROBIAN, C., WULFING, A. and HARDER, J. 2003. Anaerobic mineralization of Quaternary carbon atoms: Isolation of denitrifying bacteria on Pivalic acid (2,2-Dimethylpropionic acid). *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (3): 1866-1870.
- ROBERTS, D.P., DERY, P.D., YUCEL, I., BUYER, J., HOLTMAN, M.A., and KOBAYASHI, D.Y. 1999. Role of pfkA and general carbohydrate catabolism in seed colonization by *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (6): 2513-2519.
- RYU, C.M., FARAG, M.A., HU, C.H., REDDY, M.S., WEI, H.X., PARÉ, P.W. and KLOPPER, J.W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *P.N.A.S.*, 100 (8): 4927-4932.
- SAVITHIRY, N., GAGE, D., FU, W. and ORIEL, P. 1998. Degradation of Pinene by *Bacillus pallidus* BR425. *Biodegradation*, 9: 337-341.
- SCHÜTZ, A., SANDALOVA, T., RICAGNO, S., HÜBNER, G., KÖNIG, S. and SCHNEIDER, G. 2003. Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.*, 270: 2312-2321.
- SCHWÄMMLE, B., WINKELHAUSEN, E., KUZMANOVA, S. and STEINER, W. 2001. Isolation of carvacrol assimilating microorganisms. *Food Technol. Biotechnol.*, 39 (4): 341-345.

- SHAH, S., LI, J., MOFFATT, B.A. and GLICK, B.R. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.*, 44: 833-843.
- SLININGER, P.J. and SHEA-WILBUR, M.A. 1995. Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 43: 794-800.
- SMITH-PALMER, A., STEWART, J. and FYFE, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 118-122.
- SMITH-PALMER, A., STEWART, J. and FYFE, L. 2002. Inhibition of listeriolysin O and phosphatidylcholine specific production in *Listeria monocytogenes* by subinhibitory concentrations of plant essential oils. *Journal of Medical Microbiology*, 51 (7): 567-574.
- SOLIMAN, K.M. and BADEAA, R.I. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food & Chemical Toxicology*, 40 (11): 1669-1676.
- STOCK, I., GRÜGER, T. and WIEDEMANN, B. 2001. Natural antibiotic susceptibility of strains of the *Enterobacter cloacae* complex. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18: 537-545.
- SUHR, K.I. and NIELSEN, P.V. 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 94 (4): 665-675.
- TABAK, M., ARMON, R., POTASMAN, I. and NEEMAN, I. 1996. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of Thyme. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 667-672.
- TORRES-RUBIO, M.G., VALENCIA-PLATA, S.A., BERNAL-CASTILLO, J. and MARTINEZ-NIETO. 2000. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of Indole-3-Acetic Acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 42: 171-176.
- TRELLES, J.A., FERNÁNDEZ, M., LEWKOWICZ, E.S., IRIBARREN, A.M. and SINISTERRA, J.V. 2003. Purine nucleoside synthesis from uridine using immobilised *Enterobacter gergoviae* CECT 875 whole cells. *Tetrahedron Letters*, 44: 2605-2609.

- ULTEE, A., KETS, E.P. and SMID, E.J. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10): 4606-4610.
- ULTEE, A., SLUMP, R.A., STEGING, G. and SMID, E.J. 2000 a. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, 63 (5): 620-624.
- ULTEE, A., KETS, E.P.W., ALBERDA, M., HOEKSTRA, F.A. and SMID, E.J. 2000 b. Adaptation of the food borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.*, 174: 233-238.
- ÜNLÜ, A. 1995. Karabaş (*Thymbra spicata* L. var. *spicata*) ve Adi (*Satureja thymbra* L.) kekiklerinden elde edilen uçucu yağların toprak mikroorganizmalarına ve toprağın Antifitopatojen potansiyeline olan etkileri. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Antalya, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. 58 s.
- VAN DER WERF, M.J. and BOOT, A.M. 2000. Metabolism of carveol and dihydrocarveol in *Rhodococcus erythropolis* DCL14. *Microbiology*, 146: 1129-1141.
- VAN DER WERF, M.J., KEIJZER, P.M. and VAN DER SCHAFT, P.H. 2000. *Xanthobacter* sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene. *Journal of Biotechnology*, 84: 133-143.
- VAN DER WERF, M.J., OVERKAMP, K.M. and DE BONT, J.A.M. 1998. Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases. *Journal of Bacteriology*, 180 (19): 5052-5057.
- VAN DER WERF, M.J., SWARTS, H.J. and DE BONT, J.A.M. 1999 a. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for Limonene. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (5): 2092-2102.
- VAN DER WERF, M.J., VAN DER VEN, C., BARBIRATO, F., EPPINK, M.H.M., DE PONT, J.A.M. and VAN BERKEL, W.J.H. 1999 b. Stereoselective carveol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (37): 26296-26304.
- VAN DIJK, K. and NELSON, E.B. 2000. Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (12): 5340-5347.
- VAN DYK, M.S. and THOMAS, E. 1998. Hydrolysis of linalyl acetate and α -terpinyl acetate by yeasts. *Biotechnology Letters*, 20 (4): 417-420.

- VAN DYK, M.S., VAN RENSBURG, E. and MOLELEKI, N. 1998. Hydroxylation of (+)limonene, (-) α -pinene and (-) β -pinene by a *Hormonema* sp. *Biotechnology Letters*, 20 (4): 431-436.
- VAN RENSBURG, E., MOLELEKI, N., VAN DER WALT, J.P., BOTES, P.J. and VAN DYK, M.S. 1997. Biotransformation of (+)limonene and (-)piperitone by yeasts and yeast like fungi. *Biotechnology Letters*, 19 (8): 779-782.
- VAREL, V.H. and MILLER, D.N. 2001. Plant-derived oils reduce pathogens and gaseous emissions from stored cattle waste. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (3): 1366-1370.
- VELANKAR, H.R. and HEBLE, M.R. 2003. Biotransformation of (L)-citronellal to (L)-citronellol by free and immobilized *Rhodotorula minuta*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6 (2): 90-103.
<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue2/full/2>
- VELLUTI, A., SANCHIS, V., RAMOS, A.J., EGIDO, J. and MARIN, S. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B₁ production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, 89: 145-154.
- VELLUTI, A., SANCHIS, V., RAMOS, A.J., TURON, C. and MARIN, S. 2004. Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 716-724.
- VOKOU, D. and LIOTIRI, S. 1999. Stimulation of soil microbial activity by essential oils. *Chemoecology*, 9: 41-45.
- WATANABE, T., KANAI, R., KAWASE, T., TANABE, T., MITSUTOMI, M., SAKUDA, S. and MIYASHITA, K. 1999. Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology*, 145: 3353-3363.
- WEBSTER, J. M., CHEN, G., HU, K. and LI, J. 2002. Bacterial metabolites. Entomopathogenic Nematology. Ed. R. Gaugler. CAB International. 99-114.
- WEDGE, D.E. and NAGLE, D.G. 2000. A new 2D-TLC bioautography method for the discovery of novel antifungal agents to control plant pathogens. *J. Nat. Prod.*, 63 (8): 1050-1054.
- YEĞEN, O., BASIM, H., LAUX, P. and ZELLER, W. 2002. Biocontrol of *Erwinia amylovora* with a natural product. Seventh Meeting of the WG: Influence of A-Biotic Factors on Biocontrol Agents. Pine Bay, Kuşadası, Turkey, 22-25 May 2002, Program and Abstracts, 56.

- YEĞEN, O., BERGER, B. und HEITEFUSS, R. 1992. Untersuchungen zur fungitoxischen Wirkung der Extrakte sechs ausgewählter Pflanzen aus der Türkei auf phytopathogene Pilze. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 99 (4): 349-359.
- YEĞEN, O., ÜNLÜ, A. und BERGER, B.M. 1998. Einsatz und Nebenwirkungen auf bodenmikrobielle Aktivitäten des ätherischen Öls aus *Thymbra spicata* bei der Bekämpfung der Wurzelhalskrankheiten an Paprika *Phytophthora capsici*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 105 (6): 602-610.
- YU, Z. and MOHN, W.W. 2001. Bioaugmentation with Resin-acid-degrading bacteria enhances Resin acid removal in sequencing batch reactors treating pulp mill effluents. *Wat. Res.*, 35 (4): 883-890.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılı Isparta doğumlu. İlk ve orta öğrenimini Antalya’da tamamladı. 1997-2001 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. Eylül 2001 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı ve Ağustos 2002 yılında bu bölümde açılan araştırma görevlisi kadrosuna atandı. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmalarını yürütmektedir.