

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**BİYOLOJİK MÜCADELE ETMENİ OLARAK
BACILLUS İZOLATLARININ EKONOMİK BİR
PROSESLE ÜRETİM OPTİMİZASYONU**

Derya MARAL GÜL

Danışman: Prof. Dr. Rengin ELTEM

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Doktora Programı

İzmir
2022

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Biyolojik Mücadele Etmeni Olarak *Bacillus* İzolatlarının Ekonomik Bir Prosesle Üretim Optimizasyonu” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08/08/2022

Derya MARAL GÜL

ÖZET**BİYOLOJİK MÜCADELE ETMENİ OLARAK *BACILLUS*
İZOLATLARININ EKONOMİK BİR PROSESLE ÜRETİM
OPTİMİZASYONU**

MARAL GÜL, Derya

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Rengin ELTEM

Ağustos 2022, 253 sayfa

Toprak dinamik bir yaşam alanıdır ve sadece tarım ve gıda güvenliğinde kritik bir kaynak olmakla kalmayıp aynı zamanda tüm yaşam sürecinin devamlılığını sağlamaktadır. Bitki sağlığını olumsuz etkileyen patojen mikroorganizmalar, dünya çapında sürdürülebilir tarım için büyük ve kronik bir tehdittir. Tarımsal üretimlerde verimi artırmak, patojenleri, zararlıları ve yabancı otları öldürmek için kullanılan tarım kimyasallarının ekosistem üzerinde büyük zararlı etkileri vardır. Bu kimyasalların yan etkileriyle ilgili mevcut kamu endişeleri nedeniyle, bitkiler ve rizosferdeki mikrobiyal popülasyon arasındaki işbirliğinin anlaşılması önem kazanmıştır. Bu nedenle, dünya çapında kabul gören biyolojik ajanların geliştirilmesi ihtiyacı doğmuştur. Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteri kullanımı bu sorunu çözmek için iyi bir alternatiftir. Çevre dostu sürdürülebilir tarımın geliştirilmesi için toprak verimliliğinin artışında, bitki büyümesinin teşvikinde ve fitopatojenin baskılanmasında önemli rol oynamaktadırlar.

Bu tez çalışmasında temel amaç, yerli ve özgün *Bacillus* izolatlarının fitopatojenik funguslara karşı antifungal etkilerinin belirlenmesi ve en etkili izolat kullanılarak maksimum canlı hücre sayısı elde edecek şekilde ekonomik bir üretim ortamının ve üretim parametrelerinin optimize edilmesidir. Bu amaçla, 1574 adet *Bacillus* izolatı *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* ve *Rhizoctonia solani* gibi fitopatojenik funguslara karşı antifungal etki bakımından in vitro koşullarda incelenmiştir. Her üç fitopatojene karşı da inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenen 118 adet *Bacillus* izolatı için yüzde büyüme inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. İncelenen izolatların gösterdiği maksimum yüzde büyüme inhibisyon değerlerinin

B.cinerea'ya karşı %65,6, *F.solani*'ye karşı %42,2 ve *R.solani*'ye karşı ise %55,6 olduğu belirlenmiştir. Hemolitik aktiviteleri de incelenen izolatlardan elde edilen antifungal lipopeptid ekstraktları için ise, bu değerlerin *B.cinerea*'ya karşı %60,0, *F.solani*'ye karşı %36,4 ve *R.solani*'ye karşı ise %37,9 olduğu belirlenmiştir.

İncelenen 77 *Bacillus* izolatından elde edilen proteaz, kitinaz ve kitosanaz için spesifik enzim aktivite değerleri sırasıyla 9.7-6652 U/mg, 0.22-46.64 U/mg ve 8,02-22.17 U/mg arasında belirlenmiştir. Ayrıca, bu izolatlardan 11 tanesinin HCN üreticisi olduğu belirlenirken 70 tanesinin ise siderofor üreticisi olduğu belirlenmiştir. Siderofor üreticisi izolatlar için siderofor indeks değerinin 1,22-3,11 arasında değiştiği gösterilmiştir. Koagülaz aktivitesi de incelenen izolatlar arasından iki tanesinin koagülaz pozitif olduğu belirlenmiştir. Biyokontrol mekanizmaları incelenerek biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabilecek antifungal etkisi en yüksek olan 19 izolat seçilmiş ve bu izolatlar için moleküler tanımlama ile tür tayini yapılmıştır.

Kitlesel üretim için uygun olduğu ve yüksek lipopeptid antibiyotik ürettiği belirlenen *Bacillus velezensis* 4-Ka-22 suşu üretim optimizasyonu amacıyla seçilmiştir. Bu izolat için melas, soya unu, CaCl₂ ve gliserol içeren üretim ortamı ve sıcaklık, çalkalayıcı hızı (rpm), pH ve inokülasyon oranı gibi üretim parametreleri klasik yöntemler ve RSM kullanılarak optimize edilmiştir. Optimize edilen üretim ortamı %0,1 melas, %1 soya unu, %0,5 CaCl₂ ve %1 gliserol içermektedir. Üretim sıcaklığı olarak 30°C belirlenmiştir. Ayrıca, üretim parametreleri için RSM ile gerçekleştirilen optimizasyon sonucunda çalkalayıcı hızı 195 rpm, pH 5,0 ve inokülasyon oranı ise %4,3 olarak belirlenmiştir. Optimizasyon sonucunda *Bacillus velezensis* 4-Ka-22 suşu için elde edilen canlı hücre sayısı 13,4 kat arttırılmıştır ve üretim ortamı bileşenlerinin maliyeti ise 467 kat azaltılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Bacillus velezensis*, biyokontrol etmeni, antifungal etki, lipopeptid antibiyotikler, üretim optimizasyonu, RSM

ABSTRACT**PRODUCTION OPTIMIZATION OF *BACILLUS* ISOLATES WITH
A COST EFFECTIVE PROCESS AS A BIOLOGICAL CONTROL
AGENT**

MARAL GÜL, Derya

PhD Thesis, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Rengin ELTEM

August 2022, 253 pages

Soil is a dynamic habitat and is not only a critical resource in agriculture and food security, but also ensures the continuity of the entire life process. Pathogenic microorganisms, which adversely affect plant health, are a major and chronic threat to sustainable agriculture worldwide. Agrochemicals used to increase productivity in agricultural production and to kill pathogens, pests and weeds have great harmful effects on the ecosystem. Due to current public concerns about the side effects of these chemicals, understanding the cooperation between plants and the microbial population in the rhizosphere has become important. Therefore, the need to develop biological agents that are accepted worldwide has arisen. The use of rhizobacteria that promote plant growth is a good alternative to solve this problem. They play an important role in increasing soil fertility, promoting plant growth and suppressing phytopathogen for the development of environmentally friendly sustainable agriculture.

The main purpose of this thesis study is to determine the antifungal effects of native and original *Bacillus* isolates against phytopathogenic fungi and to optimize the production parameters and an economical production medium to obtain maximum viable cell count by using the most effective isolate. For this purpose, 1574 *Bacillus* isolates were investigated in vitro for their antifungal effects against phytopathogenic fungi such as *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani*. Percent growth inhibition values were calculated for 118 *Bacillus* isolates, which were determined to form inhibition zones against all three

phytopathogens. It was determined that the maximum percent growth inhibition values of the examined isolates were 65.6% against *B.cinerea*, 42.2% against *F.solani* and 55.6% against *R.solani*. For antifungal lipopeptide extracts obtained from isolates whose hemolytic activities were also examined, these values were determined as 60.0% against *B.cinerea*, 36.4% against *F.solani* and 37.9% against *R.solani*.

The specific enzyme activity values for protease, chitinase and chitosanase which obtained from the examined 77 *Bacillus* isolates were determined respectively between 9.7-6652 U/mg, 0.22-46.64 U/mg and 8, 02-22.17 U/mg. In addition, 11 of these isolates were determined to be HCN producers, while 70 of them were determined to be siderophore producers. It has been shown that the siderophore index value for siderophore producing isolates varies between 1.22 and 3.11. Among the isolates whose coagulase activity was also examined, two of them were found to be coagulase positive. By examining the biocontrol mechanisms, 19 isolates were selected among those with the highest antifungal effect which can be used as a biological control agent and for these isolates species determination was made by molecular identification.

Bacillus velezensis 4-Ka 22 strain, which was determined to be suitable for mass production and to produce high lipopeptide antibiotics, was selected for production optimization. For this isolate, the production medium containing molasses, soy flour, CaCl₂ and glycerol, and production parameters such as temperature, shaker speed (rpm), pH and inoculation rate were optimized using conventional methods and RSM. The optimized production medium contains 0.1% molasses, 1% soy flour, 0.5% CaCl₂ and 1% glycerol. The production temperature was determined as 30°C. In addition, as a result of the optimization performed with RSM for the production parameters, the shaker speed was determined as 195 rpm, pH 5.0 and the inoculation rate was 4.3%. As a result of the optimization, the number of viable cells obtained for the *Bacillus velezensis* 4-Ka-22 strain was increased by 13.4 times and the cost of the production media components was reduced by 467 times.

Keywords: *Bacillus velezensis*, biocontrol agent, antifungal effect, lipopeptid antibiotics, production optimization, RSM

ÖNSÖZ

Ülkemiz sahip olduğu coğrafi yapı ve ekolojik koşullar sayesinde, ürün çeşitliliği ve miktarı yönünden tarımsal üretimde büyük bir potansiyele sahiptir. Son yıllarda gerek çevre bilincinin artması gerekse de insanların organik ürünlere olan talebinin artması sonucu tarımsal verimliliği arttırmak amacıyla kullanılan pestisitlerin olumsuz etkileri daha sık gündeme gelmektedir. Tüm dünyada bu olumsuzlukların önüne geçebilmek için kimyasal mücadeleye alternatif mücadele yöntemleri üzerinde kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır. Bu yöntemler içerisinde biyolojik mücadele insan sağlığı ve çevreye zararsız olması ve organik tarımda kullanılabilirliği gibi avantajları nedeniyle oldukça dikkat çekmektedir.

Tez konusunun belirlenmesinde dünyadaki bu değişim göz önünde bulundurulmuştur ve gerçekleştirilen çalışmada, yerli ve özgün *Bacillus* izolatlarının antifungal etki göstermelerine sebep olan farklı etki mekanizmaları incelenmiştir. Bu izolatların birçoğunun biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. İzolatlar arasından seçilen en etkili izolat için kitlesel üretim optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu sayede, ülkemizde ithal olarak kullanılan bu tarz ürünlerin yerine geçebilecek yerli bir biyokontrol ürünü geliştirilmesi için temel adım atılmıştır. İleride gerçekleştirilecek detaylı çalışmalar ile birlikte ülkemizde yeni bir biyolojik mücadele preparatının yerini alması ümitvar gözükmektedir.

İZMİR

08/08/2022

Derya MARAL GÜL



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK	(i)
KABUL ONAY SAYFASI	(iii)
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	(v)
ÖZET	(vii)
ABSTRACT	(ix)
ÖNSÖZ	(xi)
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	(xiii)
ŞEKİLLER DİZİNİ	(xxi)
ÇİZELGELER DİZİNİ	(xxvii)
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	(xxxiii)
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarımsal Üretimde Yaşanan Sıkıntılar ve Kullanılan Kimyasal Ürünlerin Yol Açtığı Sorunlar	4
2.2. Biyolojik Kontrol ve Entegre Zararlı Yönetimi (IPM)	9
2.3. Biyopestisitler	11

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.3.1. Mikrobiyal pestisitler	12
2.3.2. Biyokimyasallar	14
2.3.3. Semiyokimyasallar	14
2.4. <i>Bacillus</i> Türleri	14
2.5. <i>Bacillus</i> Türlerinin Biyolojik Mücadele Etmeni Olarak Etki Mekanizmaları.....	17
2.5.1. Antibiyozis	17
2.5.2. Litik enzimler	24
2.5.3. Rekabet	26
2.5.4. İndüklenmiş sistemik direnç	27
2.6. <i>Bacillus</i> Türlerinin Sıvı Kültür Fermentasyonu ile Üretimi	30
2.7. <i>Bacillus</i> Türlerinin Sıvı Kültür Fermentasyonu ile Üretimini Etkileyen Faktörler.....	32
2.7.1. Fermentasyon tipi	32
2.7.2. Besiyeri bileşenleri	33
2.7.3. Üretim parametreleri	35
2.8. <i>Bacillus</i> Türleri ile Üretim Optimizasyonu	37

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.9. <i>Bacillus</i> Türlerinin Ticarileştirilmesi	40
2.10. Ticari <i>Bacillus</i> Biyopreparatları	42
2.11. Gelecekteki Durumu	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM	50
3.1. Gereç	50
3.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	50
3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler	50
3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar	59
3.2. Yöntem	61
3.2.1. Kullanılan mikroorganizmaların saflık kontrolü ve aktifleştirilmesi	61
3.2.2. <i>Bacillus</i> izolatlarının in vitro koşullarda antifungal etkisinin incelenmesi..	61
3.2.3. <i>Bacillus</i> izolatları tarafından antifungal lipopeptid üretiminin incelenmesi.....	63
3.2.4. <i>Bacillus</i> izolatlarının litik enzim üretimlerinin incelenmesi.....	65
3.2.5. HCN üretiminin belirlenmesi	69
3.2.6. Siderofor üretiminin belirlenmesi	69

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.7. <i>Bacillus</i> izolatlarının patojenitesinin incelenmesi	70
3.2.8. <i>Bacillus</i> izolatlarının moleküler tanımlanması	70
3.2.9. Seçilen <i>Bacillus</i> izolatlarının biyokütle üretiminin incelenmesi	70
3.2.10. Seçilen suş için büyüme eğrisinin belirlenmesi	71
3.2.11. Seçilen suş için laboratuvar ölçeğinde üretim ortamı optimizasyonu.....	71
3.2.12. Seçilen suş için laboratuvar ölçeğinde üretim parametrelerinin optimizasyonu	75
3.2.13. Üretim ortamı bileşenleri için maliyet hesabı	77
3.2.14. İstatistiksel analiz	77
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	78
4.1. <i>Bacillus</i> İzolatlarının in vitro koşullarda Antifungal Etkisinin İncelenmesi.....	78
4.1.1. Dörtlü ekim tekniği ile ön tarama	78
4.1.2. İkili kültür testi yöntemi ile yüzde (%) büyüme inhibisyon değerlerinin belirlenmesi	82
4.2. <i>Bacillus</i> İzolatları Tarafından Üretilen Antifungal Lipopeptidlerin İncelenmesi	110
4.2.1. Ön tarama testi olarak hemolitik aktivitenin belirlenmesi	111

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.2.2. Antifungal lipopeptidlerin üretimi	121
4.2.3. Antifungal lipopeptidlerin etil asetat kullanılarak ekstraksiyonu	122
4.2.4. Antifungal lipopeptidlerin HCl-Metanol kullanılarak ekstraksiyonu.....	122
4.2.5. Antifungal lipopeptid ekstraktlarının agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile antifungal etkisinin belirlenmesi	124
4.2.6. Sürfaktin ve İturin A için Kuadropol Uçuş Zamanlı (Q-TOF) Kütle Kromatografisi ile kantitatif analiz	145
4.3. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Litik Enzim Üretimlerinin İncelenmesi	153
4.3.1. <i>Bacillus</i> izolatlarının proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	153
4.3.2. <i>Bacillus</i> izolatlarının kitinaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	156
4.3.3. <i>Bacillus</i> izolatlarının kitosanaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	159
4.4. <i>Bacillus</i> İzolatlarının HCN Üretiminin Belirlenmesi	162
4.5. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Siderofor Üretiminin Belirlenmesi	164
4.6. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Patojenitesinin İncelenmesi	168
4.7. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Moleküler Tanımlaması	168
4.8. Seçilen <i>Bacillus</i> İzolatlarının Biyokütle Üretiminin İncelenmesi	171

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.9. <i>Bacillus velezensis</i> 4-Ka-22 Suşu için Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi.....	179
4.10. <i>Bacillus velezensis</i> 4-Ka-22 Suşu için Üretim Ortamı Optimizasyonu.....	182
4.10.1. Çeşitli karbon ve azot kaynakları ile diğer besiyeri bileşenlerinin hücre büyümesi ve antifungal etki üzerindeki etkilerinin incelenmesi.....	182
4.10.2. Seçilen besiyeri bileşenlerinin <i>Bacillus velezensis</i> 4-Ka-22 suşunun hücre büyümesi ve antifungal aktivitesi üzerindeki birlikte etkisinin incelenmesi	187
4.10.3. Seçilen besiyeri bileşenlerinin RSM ile optimizasyonu	188
4.10.4. Besiyeri tasarımı için validasyon	204
4.10.5. Besiyerine gliserol eklenmesinin canlı hücre sayısına ve antifungal etkiye olan etkisinin incelenmesi	205
4.11. <i>Bacillus velezensis</i> 4-Ka-22 Suşu için Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu	206
4.11.1. <i>Bacillus velezensis</i> 4-Ka-22 suşu için sıcaklık optimizasyonu	206
4.11.2. <i>Bacillus velezensis</i> 4-Ka-22 suşu için üretim parametrelerinin RSM ile optimizasyonu	209
4.11.3. Üretim parametreleri tasarımı için validasyon	219

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.12. Üretim Ortamı Bileşenleri için Maliyet Hesabı	220
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	221
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	224
TEŞEKKÜR.....	248
ÖZGEÇMİŞ.....	249



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. İkili kültür testi için şematize gösterim	62
3.2. Kitinaz enzim aktivitesi için standart eğri grafiği	68
3.3. Kitosanaz enzim aktivitesi için standart eğri grafiği	68
3.4. Protein miktarı için standart eğri grafiği	69
4.1. Fitopatojenik fungusların 10.gündeki koloni morfolojileri; a) <i>Botrytis cinerea</i> , b) <i>Fusarium solani</i> , c) <i>Rhizoctonia solani</i>	78
4.2. Antifungal etkinin sınıflandırılmasında kullanılan etkileşim şekilleri için örnekler	78
4.3. Antifungal etkileri incelenen bazı <i>Bacillus</i> izolatlarının fitopatojenik funguslara karşı gösterdikleri etki şekilleri (Fitopatojenik funguslar soldan sağa doğru sırasıyla; A) <i>Botrytis cinerea</i> , B) <i>Fusarium solani</i> , C) <i>Rhizoctonia solani</i>)	79
4.4. Fitopatojenik funguslara karşı gösterdikleri etki şekillerine göre <i>Bacillus</i> izolatı sayıları	80
4.5. Çalışmada kullanılan fitopatojenik fungusların 7. gündeki kontrol petrileri (Soldan sağa; <i>B.cinerea</i> , <i>F.solani</i> ve <i>R.solani</i>)	83
4.6. <i>Bacillus</i> izolatlarının ikili kültür testi yöntemi ile belirlenen antifungal etkilerinin petri görüntüleri (7.gün)	90
4.7. Çalışmada kullanılan <i>Bacillus</i> izolatlarının hemolitik aktivite sonuçları (üçüncü gün)	114

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.8. HCl-Metanol yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktların <i>R.solani</i> 'ye karşı antifungal etkisinin belirlendiği ön deneme sonuçları	123
4.9. Çalışmada kullanılan fitopatojenik fungusların kontrol petrileri	124
4.10. HCl-Metanol yöntemi kullanılarak elde edilen <i>Bacillus</i> ekstraktlarının fitopatojenik funguslar üzerindeki antifungal etkileri	130
4.11. <i>Bacillus</i> sp. 4-Ka-22 izolatında Sürfaktin için elde edilen kromatogram ..	149
4.12. <i>Bacillus</i> sp. 4-Ka-22 izolatında İturin A için elde edilen kromatogram	150
4.13. <i>Bacillus</i> sp. T-4-14-a izolatında Sürfaktin için elde edilen kromatogram .	151
4.14. <i>Bacillus</i> sp. T-4-14-a izolatında İturin A için elde edilen kromatogram ...	152
4.15. Bazı <i>Bacillus</i> izolatları tarafından HCN üretime ait örnek görseller	163
4.16. Bazı <i>Bacillus</i> izolatları tarafından siderofor üretimi	167
4.17. Koagülaz pozitif izolatlarda oluşan pıhtı görüntüleri (A: Ö-2-61-a, B: T-4-14-b, C: Negatif Kontrol)	168
4.18. Moleküler tanılaması yapılan <i>Bacillus</i> suşları için filogenetik ağaç	169
4.19. <i>B.velezensis</i> 4-Ka-22 suşu için pH değeri, absorbans ve canlı sayım sonuçları	179

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.20. <i>B.velezensis</i> 4-Ka-22 suşundan ekstrakte edilen lipopeptid antibiyotiklerin <i>Botrytis cinerea</i> (Bc), <i>Rhizoctonia solani</i> (Rs) ve <i>Fusarium solani</i> 'ye karşı zamanla değişen etkisi	181
4.21. Farklı karbon kaynaklarının canlı hücre sayısına ve siklik lipopeptid üretimi sonucu % büyüme inhibisyon değerine etkisi	183
4.22. Farklı azot kaynaklarının canlı hücre sayısına ve siklik lipopeptid üretimi sonucu % büyüme inhibisyon değerine etkisi	184
4.23. Farklı besiyeri bileşenlerinin canlı hücre sayısına ve siklik lipopeptid üretimi sonucu yüzde büyüme inhibisyon değerine etkisi	185
4.24. Canlı hücre sayısına ait linear model için Design Expert programı ANOVA çıktısı	190
4.25. Canlı hücre sayısı için hata dağılım grafiği	191
4.26. Canlı hücre sayısı için pertürbasyon grafiği (A: Melas, B: Soya unu, C: CaCl_2)	191
4.27. Canlı hücre sayısı ile melas miktarı ve soya unu miktarı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği	192
4.28. Canlı hücre sayısı ile CaCl_2 miktarı ve soya unu miktarı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği	192
4.29. Canlı hücre sayısı ile CaCl_2 miktarı ve melas miktarı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği	193

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.30. Yüzde büyüme inhibisyon değerine ait ikinci dereceden model için Design Expert programı ANOVA çıktısı	194
4.31. Yüzde büyüme inhibisyon değeri için hata dağılım grafiği	195
4.32. Yüzde büyüme inhibisyon değeri için pertürbasyon grafiği (A: Melas, B: Soya unu, C: CaCl_2)	195
4.33. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ile soya unu miktarı ve melas miktarı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği	196
4.34. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ile melas miktarı ve CaCl_2 miktarı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği	197
4.35. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ile CaCl_2 miktarı ve soya unu miktarı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği	197
4.36. Canlı hücre sayısını maksimize etmeye yönelik sayısal optimizasyon sonuçları	199
4.37. Yüzde büyüme inhibisyon değerini maksimize etmeye yönelik sayısal optimizasyon sonuçları	200
4.38. Canlı hücre sayısını ve yüzde büyüme inhibisyon değerini maksimize etmeye yönelik sayısal optimizasyon sonuçları	202
4.39. Canlı hücre sayısına ait ikinci derece model için Design Expert programı ANOVA çıktısı	211
4.40. Canlı hücre sayısı için hata dağılım grafiği	211

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.41. Canlı hücre sayısı için pertürbasyon grafiği (A: Çalkalayıcı hızı (rpm), B: pH, C: inokülasyon oranı)212
- 4.42. Canlı hücre sayısı ile çalkalayıcı hızı (rpm) ve pH değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği212
- 4.43. Canlı hücre sayısı ile çalkalayıcı hızı (rpm) ve inokülasyon oranı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği213
- 4.44. Canlı hücre sayısı ile pH ve inokülasyon oranı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği213
- 4.45. Yüzde büyüme inhibisyon değerine ait ikinci derece model için Design Expert programı ANOVA çıktısı214
- 4.46. Yüzde büyüme inhibisyon değeri için hata dağılım grafiği215
- 4.47. Yüzde büyüme inhibisyon değeri için pertürbasyon grafiği (A: Çalkalayıcı hızı (rpm), B: pH, C: inokülasyon oranı)215
- 4.48. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ile çalkalayıcı hızı (rpm) ve pH değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği216
- 4.49. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ile çalkalayıcı hızı (rpm) ve inokülasyon oranı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği216
- 4.50. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ile pH ve inokülasyon oranı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği217
- 4.51. Canlı hücre sayısını maksimize etmeye yönelik sayısal optimizasyon sonuçları218



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bitki patojenlerinin <i>Bacillus</i> türleri ile biyokontrolü (Dame et al., 2021).....	6
2.2. Antifungal aktivite gösteren <i>Bacillus</i> suşlarının etki şekilleri (Lopes et al., 2018)	19
2.3. Farklı patojenlere karşı lipopeptidlerin antimikrobiyal etkisi (Penha et al., 2020)	20
2.4. Lipopeptidlerin belirlenmesi ve saflaştırılması için yöntemler (Penha et al., 2020)	22
2.5. <i>Bacillus</i> türleri tarafından üretilen fungal fitopatojenlere karşı biyokontrol aktivitesine sahip enzimler (Dimkiç et al., 2022)	25
2.6. Farklı konukçu bitkilerde etkili bazı <i>Bacillus</i> türleri tarafından üretilen litik enzimler (Aloo et al., 2019)	26
2.7. <i>Bacillus</i> türlerinin neden olduğu indüklenmiş sistemik direnç ile kontrol edilen patojenler ve sebep oldukları hastalıklar (Miljaković et al., 2020).....	28
2.8. <i>Bacillus</i> türleri tarafından gösterilen etki mekanizmaları (Miljaković et al., 2020; Soni and Keharia, 2021)	29
2.9. Çeşitli çevresel ve biyoteknolojik uygulamalar için ticari ölçekte biyosüpfektan ürünleri geliştiren firmalara örnekler (Jimoh and Lin, 2019).....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.10. Çeşitli <i>Bacillus</i> türlerini içeren ticari biyokontrol preparatları (Aloo et al., 2019; Miljaković et al., 2020; Saxena et al., 2020; Anckaert et al., 2021).....	43
3.1. Çalışmamızda kullanılan numunelerin kaynakları ve kodları (Işıkcı, 2014).....	51
3.2. CAS Agar besiyeri içeriği ve hazırlanışı	55
3.3. Hazırlanan besiyerlerinde bulunan karbon ve azot kaynakları ile diğer besiyeri bileşenlerinin miktarları	73
3.4. Üç değişkenli Box-Behnken deney tasarımında kullanılan besiyeri bileşenlerinin miktarları	74
3.5. Üç değişkenli Box-Behnken deney tasarımında kullanılan üretim parametreleri için değerler	76
4.1. Dörtlü ön tarama testi sonucunda her üç fitopatojene karşı da inhibisyon zonu oluşturan <i>Bacillus</i> izolatlarının kodları	81
4.2. Her üç fitopatojenik fungusa karşı etkili çıkan <i>Bacillus</i> izolatlarının fitopatojenik funguslar üzerindeki yüzde büyüme inhibisyon değerleri ve bu değerlerin büyüme inhibisyon kategorisine (GIC) göre derecelendirilmesi.....	83
4.3. Kullanılan <i>Bacillus</i> izolatlarının fitopatojenik funguslara karşı gösterdikleri inhibisyon etkilerinin büyüme inhibisyon kategorilerine göre sayıları.....	90

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.4. Çalışmada kullanılan <i>Bacillus</i> izolatları ile elde edilen hemoliz zon çapları.....	111
4.5. HCl-Metanol yöntemi kullanılarak elde edilen <i>Bacillus</i> ekstraktlarının fitopatojenik funguslar üzerindeki yüzde büyüme inhibisyon değerleri (PGI) ve bu değerlerin büyüme inhibisyon kategorisine (GIC) göre derecelendirilmesi.....	124
4.6. Farklı <i>Bacillus</i> türlerinden laboratuvar ölçeğinde üretilen lipopeptidlerin gösterdikleri inhibisyon değerleri (Penha et al., 2020)	128
4.7. Kullanılan <i>Bacillus</i> izolatlarından elde edilen ekstraktların fitopatojenik funguslara karşı gösterdikleri inhibisyon etkilerinin büyüme inhibisyon kategorilerine göre sayıları	129
4.8. Sürfaktin ve iturin A için Q-TOF LC/MS ile belirlenen madde miktarları.....	146
4.9. <i>Bacillus</i> izolatlarının proteaz enzim aktivite değerleri, protein miktarları ve spesifik proteaz aktiviteleri	153
4.10. Literatürde incelenen farklı <i>Bacillus</i> türlerinin proteaz aktiviteleri.....	156
4.11. <i>Bacillus</i> izolatlarının kitinaz enzim aktivite değerleri, protein miktarları ve spesifik kitinaz aktiviteleri	157
4.12. Literatürde incelenen farklı <i>Bacillus</i> türlerinin kitinaz aktiviteleri.....	159
4.13. <i>Bacillus</i> izolatlarının kitosanaz enzim aktivite değerleri, protein miktarları ve spesifik kitosanaz aktiviteleri	160

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.14.Literatürde incelenen farklı <i>Bacillus</i> türlerinin kitosanaz aktiviteleri.....	162
4.15. <i>Bacillus</i> izolatlarının siderofor indeks değerleri	164
4.16. <i>Bacillus</i> türleri ile literatürde elde edilen siderofor üretim indeks değerleri.....	167
4.17. Moleküler tanılaması yapılan <i>Bacillus</i> izolatlarının tür isimleri ve GenBank aksesyon numaraları	170
4.18. <i>Bacillus</i> türleri ile LB besiyerinde, 30°C ve 150 rpm koşullarında 5 gün süreyle gerçekleştirilen inkübasyon sonucu elde edilen canlı hücre sayım sonuçları	171
4.19. Çalışmada antifungal etki mekanizmaları incelenen <i>Bacillus</i> izolatlarının belirlenen özellikleri	172
4.20. Melas, soya unu ve CaCl ₂ 'nin farklı konsantrasyonları kullanılarak elde edilen canlı hücre sayısı (kob/ml) ve yüzde büyüme inhibisyon değerleri.....	187
4.21. Box-Behnken deney seti ve incelenen yanıtlar için elde edilen deneysel ve tahmini sonuçlar	189
4.22. Canlı hücre sayısını arttırmak için optimizasyon kriterleri	198
4.23. Yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmak için optimizasyon kriterleri.....	200

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.24. Canlı hücre sayısı ve antifungal etkiyi arttırmak için optimizasyon kriterleri.....	201
4.25. <i>Bacillus</i> türleri kullanılarak RSM ile gerçekleştirilen üretim ortamı optimizasyonu çalışmaları	203
4.26. RSM ile incelenen yanıtlar için elde edilen sonuçların modelden elde edilen tahmini yanıtlarla karşılaştırılması	205
4.27. Canlı hücre sayısı ve antifungal etki üzerinde gliserolün farklı oranlarının etkisi	205
4.28. Canlı hücre sayısı ve antifungal etki üzerinde farklı sıcaklıkların etkisi.....	206
4.29. Canlı hücre sayısı ve antifungal aktivite üzerinde %1 gliserolün farklı sıcaklıklardaki etkisi	208
4.30. Box-Behnken deney seti ve incelenen yanıtlar için elde edilen deneysel ve tahmini sonuçlar	210
4.31. Yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmak için numerik optimizasyon kriterleri	217
4.32. RSM ile incelenen yanıtlar için elde edilen sonuçların modelden elde edilen tahmini yanıtlarla karşılaştırılması	219
4.33. Optimizasyon aşamalarında elde edilen biyokütle miktarı ve yüzde büyüme inhibisyon değerleri	219
4.34. Ticari LB sıvı besiyeri ve optimize edilen üretim ortamından 1 lt hazırlamak amacıyla gerekli bileşenler için maliyet hesabı	220



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
rpm	devir sayısı/dakika
mg	miligram
g	gram
ml	mililitre
lt	litre
°C	sıcaklık
dk	dakika
<u>Kısaltmalar</u>	
PGPR	Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteri
BCA	Biyolojik kontrol ajanı
IDM	Entegre hastalık yönetimi
IPM	Entegre zararlı yönetimi
PIP	Bitkiye dahil olan koruyucular
USFDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
GRAS	Genellikle güvenli olarak kabul edilen
mVOC	Mikrobiyal uçucu organik bileşikler
NRP	Ribozomal olmayan peptidler

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
TLC	İnce tabaka kromatografisi
ESI	Elektrosprey iyonizasyonmal
ISR	İndüklenmiş sistemik direnç
DO	Çözülmüş oksijen
OFAT	Bir seferde tek faktör
DOE	Deney tasarımı
ANN	Yapay sinir ağı
CCD	Central composite tasarımı
BBD	Box-Behnken tasarımı
CLP	Siklik lipopeptid
Bc	<i>Botrytis cinerea</i>
Fs	<i>Fusarium solani</i>
Rs	<i>Rhizoctonia solani</i>
OD	Optik Dansite
NA	Nutrient agar
PDA	Patates dekstroza agar

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

LB	Luria-Bertani
PGI	Yüzde büyüme inhibisyonu
GIC	Büyüme inhibisyon kategorisi
Ege-MATAL	Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi
LC	Sıvı kromatografisi
Q-TOF/MS	Kuadrupol Uçuş Zamanlı Kütle Kromatografisi
ANOVA	Varyans analizi
DNS	Dinitro salisilik asit
HCN	Hidrojen siyanür
CAS	Krom azurol S
SS	Standart sapma
NCBI	National Center for Biotechnology Information
RSM	Yanıt yüzey yöntemi (Response Surface Methodology)
Kob	Koloni oluşturan birim
DDGS	Damıtık mısır+çözünür maddeleri (Distillers dried grains with solubles)
MALDI-TOF MS	Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi



1. GİRİŞ

Hızla artmakta olan dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 9,7 milyar kişiye (Raymaekers et al., 2020; Kumar et al., 2021), 2100 yılında ise 11,2 milyar kişiye ulaşacağı tahmin edildiğinden gıda arzında da önemli bir artış olması beklenmektedir (Maitra et al., 2022). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne göre mütevazı bir ekonomik büyüme senaryosunda, o zamana kadar tarımsal gıda üretiminin asgari %50'lik bir artışına ihtiyaç duyulurken, farklı modellerde %110'a varan daha yüksek artışların gerektiği de varsayılmaktadır. Artan bu gıda talebiyle başa çıkabilmek için yeni tarım alanlarının sınırlı olması göz önüne alındığında, birim alan başına verimi artırmak ve üretim kayıplarını azaltmak önem kazanmaktadır. Buğday, pirinç, mısır, patates ve soya fasulyesi olmak üzere beş ana ürün için, hastalıklar veya zararlılar nedeniyle tarladaki fiili ürün kayıplarının küresel olarak %17-30 arasında değiştiği tahmin edilmektedir. Bu nedenle, bitki hastalık kontrolünün etkinliğinin artırılmasının, küresel olarak artan gıda talebine önemli ölçüde katkı sağlaması beklenmektedir (Raymaekers et al., 2020).

Mevcut bitki hastalık yönetimi, hastalığa dirençli bitki çeşitlerinin kullanımı ve ürün rotasyonu gibi ağırlıklı olarak önleyici olan kültürel uygulamaları içermektedir. Kimyasal pestisitler ise hem önleyici hem de tedavi edici hastalık yönetimi için kullanılmaktadır. Artan ürün verimi ve kalitesi, iyileştirilmiş gıda güvenliği (azaltılmış mikrobiyal toksin içeriği) ve artırılmış raf ömrü açısından mevcut tarımda çok önemli bir rol oynamaktadırlar. Bitki hastalıkları ve zararlılarının etkin kontrolüne kuşkusuz olumlu katkılarına rağmen, kimyasal pestisitlerin insan sağlığı üzerinde pekçok olumsuz etkileri bulunmaktadır. Ayrıca, toprak ve suyun kirlenmesi ile faydalı organizmalara gösterdikleri toksik etki de dahil olmak üzere çevre üzerindeki olumsuz etkileri hakkında endişeler artmaktadır. Ek olarak, yoğun pestisit kullanımı; neonikotinoide dirençli böcekler, geniş spektrumlu strobilurin veya azol içeren fungus ilaçlarına karşı duyarsız funguslar gibi dirençli zararlıların ve patojenlerin gelişmesine neden olmuştur. Bu, daha da yüksek uygulama dozlarına ihtiyaç duyulmasına ve farklı etki biçimlerine sahip alternatif pestisitlere duyulan ihtiyacın artmasına neden olmuştur. Bununla birlikte, bu tür yeni pestisitlerin mevcudiyeti ve çeşitliliği şu anda sınırlıdır ve artan direnç gelişimi problemini ortadan kaldırmak için yetersizdir. Ayrıca, verimli pestisitlerin erişilebilirliği, artan mevzuat katılığı nedeniyle daha da azalmaktadır. Bu nedenle Avrupa Birliği, hastalıkların ve zararlıların önlenmesine ve biyolojik kontrolüne odaklanarak daha sürdürülebilir

bir bitki koruma stratejisi hedeflemektedir. Sonuç olarak, patojen popülasyonu tamamen yok edilmemesine rağmen, önemli semptom gelişimini önlemek için yeterince düşük tutulmaktadır. En katı tanımıyla biyokontrol, bitki hastalıklarını veya zararlılarını kontrol etmek için doğal olarak oluşan mikroorganizmaların kullanılması anlamına gelmektedir. Biyokontrol organizmaları olarak adlandırılan organizmalar doğada yaygın olarak bulunmakta; bakteri, fungus, virüs, maya ve protozoonları içermektedir. Bitki hastalıklarını doğrudan veya dolaylı olarak kontrol edebilmektedirler. Biyokontrol organizmasının patojen üzerinde doğrudan antagonistik etkisi parazitizm, antibiyozis, besinler veya enfeksiyon bölgeleri için rekabet yoluyla gerçekleşmektedir. Hastalıkların dolaylı yoldan kontrolünde, biyokontrol organizması, bitkinin gerçekleşen patojen saldırısına karşılık daha hızlı ve daha verimli tepki göstermesini sağlayan sistemik direnci indüklemektedir (Raymaekers et al., 2020).

Bacillus sp. bazlı mikrobiyal formülasyonlar bu türün çeşitli metabolitler üretme ve endospor oluşturma yeteneği nedeniyle bir çok alanda kullanılmaktadırlar. Son zamanlarda, bu ürünler, aşırı kullanılan zirai kimyasallara “yeşil” bir alternatif olan biyopestisit ve bitki uyarıcı ajanlar olarak popülerlik kazanmıştır. İstenilen özelliklere sahip yüksek kaliteli ve uzun ömürlü bir ürün elde etmek için üretim sürecini her aşamada optimize etmek gerekmektedir. Bu da mikrobiyal türün ve üretim koşullarının yanı sıra formülasyon teknolojilerinin de koordine edilmesini gerektirmektedir (Stamenković-Stojanović et al., 2019).

Bacillus sporlarının potansiyel kullanımı nedeniyle büyük ölçekli üretimleri için batık kültür ile üretimi en iyi seçimdir. Üretim ortamı bileşenlerinin bir seferde tek değişkenin değiştirilmesini içeren klasik yöntemlerle optimizasyonu, çok sayıda değişken düşünüldüğünde son derece zaman alıcı ve pahalıdır. Bu zorluğun üstesinden gelmek ve çalışılan değişkenler arasındaki etkileşimi de belirlemek amacıyla optimizasyon için deneysel faktöriyel tasarım ve yanıt yüzeyi yöntemi kullanılmaktadır (Rao et al., 2007).

Tez çalışmasında temel amaç, fitopatojenik funguslara karşı antifungal aktivite gösteren özgün ve yerel *Bacillus* izolatlarının *in vitro* koşullarda belirlenmesinden sonra seçilen en etkili izolatın kitlesel üretim prosesi için optimizasyonu yapılarak potansiyel biyolojik mücadele preparatı için temel oluşturulmasıdır. Bu amaçla, 1574 adet *Bacillus* izolatı, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* ve *Rhizoctonia solani* gibi üç farklı fitopatojene karşı

antagonistik etki bakımından incelenmiştir. Her üç fitopatogene karşı zon oluşturduğu belirlenen izolatlar seçildikten sonra, bu izolatların agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile antifungal metabolit üretimleri incelenmiştir. Ayrıca, *Bacillus* türlerinin antifungal etki göstermelerine sebep olan etki mekanizmalarından olan proteaz, kitinaz ve kitosanaz gibi litik enzim üretimleri, HCN ve siderofor üretimleri incelenmiştir. *Bacillus* izolatlarının patojenitesinin belirlenmesi amacıyla koagülaz testi gerçekleştirilmiştir. En yüksek antifungal etki gösteren izolat seçildikten sonra ise, üretim ortamı ve üretim parametreleri için optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Optimize edilen üretim ortamı %0,1 melas, %1 soya unu, %0,5 CaCl₂ ve %1 gliserol içermektedir. Üretim sıcaklığı olarak 30°C belirlenmiştir. Ayrıca, üretim parametreleri için gerçekleştirilen optimizasyon sonucunda çalkalayıcı hızı 195 rpm, pH 5,0 ve inokülasyon oranı ise %4,3 olarak belirlenmiştir. Optimizasyon sonucunda *Bacillus velezensis* 4-Ka-22 suşu için elde edilen canlı hücre sayısı 13,4 kat artırılmıştır ve üretim ortamı maliyeti ise 467 kat azaltılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarımsal Üretimde Yaşanan Sıkıntılar ve Kullanılan Kimyasal Ürünlerin Yol Açtığı Sorunlar

Bitkisel üretim, çeşitli biyotik ve abiyotik stress faktörleri nedeniyle ciddi tehditlerle karşı karşıyadır. Artan nüfusu beslemek ve sınırlı topraklarda tarımsal üretimi artırmak, içinde bulunduğumuz çağda araştırmacılar ve çiftçiler tarafından çözülmesi gereken önemli zorluklardandır. Gübre, böcek ilacı, herbisit kullanımı ve arıtılmamış atık su ile sulama gibi mevcut tarımsal uygulamalar çevre için ciddi tehditler oluşturmakta ve toprak yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca, kentleşme ve sanayileşme, tarım alanlarında önemli bir azalmaya neden olmuştur ve bu da bilim insanlarını zaten küçülmüş tarım alanlarından elde edilecek ürün verimini artırmak için sürdürülebilir stratejiler geliştirmeye yönlendirmiştir. Ürün üretimi için mevcut tarımsal alanı arttırmanın zor olması nedeniyle doğal kaynakların daha fazla bozulmasını önleyecek şekilde birim alan başına ürün verimini artırmak için stratejiler geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Bu nedenle, çevresel sürdürülebilirliği ve gelecekteki gıda güvenliğini sağlamak için günümüz tarımında alternatif yaklaşımların benimsenmesi gerekmektedir (Saeed et al., 2021).

Funguslar, bakteriler, virüsler, nematodlar ve protozoalar dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmaların neden olduğu bitki hastalıkları, tarımsal üretimi etkilemekte ve büyük verim kayıplarına neden olmaktadır. Ürün verimindeki kayıpların yaklaşık %20-40'ı patojenik enfeksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Pestisitler, daha az duyarlı çeşitler, ürün rotasyonu ve diğer kontrol önlemleri dahil olmak üzere bitki hastalıklarının oluşumunu azaltmak için farklı stratejiler kullanılmıştır ancak toprak kaynaklı patojenlerin direnç göstermesi ve hayatta kalması nedeniyle bu stratejilerin etkinlikleri genellikle yetersiz kalmıştır. Ayrıca sentetik pestisitlerin aşırı kullanımı çevre ve canlı organizmalar üzerinde olumsuz etkiler oluşturmakta, ekosistem işleyişini bozmakta ve tarımsal sürdürülebilirliği azaltmaktadır (Miljakovic et al., 2020).

Toprak, aktinomisetler, algler, bakteri ve mantar gibi çok sayıda mikrofloradan dolayı canlı bir varlıktır. Bir tahmine göre 1 gr toprakta yaklaşık 1×10^8 mikroorganizma bulunmaktadır. Bu mikroorganizmaların çoğunluğu tarımsal üretimler için faydalıdır. Bazıları da zararlıdır ancak bunlar sayı olarak oldukça azdır. Toprak mikroorganizmalarının sadece %5-7'si zararlı olarak

bildirilmiştir. Toprak degradasyonu, yüksek bitki verimi elde edilmesinde temel sınırlayıcı faktördür. Mahsul üretimini artırmak için pestisitlerin ve kimyasal gübrelerin yaygın ve dengesiz kullanımı, çeşitli sosyal, çevresel ve ekonomik kaygılarla sonuçlanmıştır. Kimyasal gübreler, bilinen miktarlarda makro ve mikro besinlerden oluşan teknik temelli malzemelerdir. Bu gübrelerin kontrolsüzce uygulanması özellikle gelişmekte olan ülkelerde şüphesiz mahsul verimini artırmıştır ancak aynı zamanda atmosfer, toprak ve yeraltı suyunun kirlenmesi dahil olmak üzere ekosistem üzerinde olumsuz etkilere neden olmuş, bitki köklerini zayıflatarak hastalık olasılığını artırmıştır. Bu nedenle daha düşük maliyetli, daha verimli ve çevre dostu özelliklere sahip yeni gübreleme stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Riaz et al., 2020).

Biyolojik faktörlerin neden olduğu bitki hastalıkları, ürün verimliliğinde ve kalitesinde büyük kayıplara yol açmaktadır. Bitki hastalıklarının önlenmesi ve kontrolü için çeşitli stratejiler kullanılmaktadır. İyi tarımsal yönetim uygulamalarına rağmen, çoğu bitki yetiştiricisi kimyasal gübrelere veya böcek ilaçlarına güvenmektedir. Kimyasal ürünler, tarımsal ürün verimliliğini uzun yıllardır önemli ölçüde iyileştirmiş olsa da, potansiyel olumsuz etkileri ve aşırı kullanımları, toprak ekosisteminde önemli hasarlara ve çevre kirliliğinin artmasına neden olmuştur (Zehra et al., 2021).

Bilinen fungus türlerinin büyük çoğunluğu mutlak saprofitlerdir; sadece çok az tür (tanımlanan fungusların %10'undan azı) bitkileri kolonize edebilmektedir. Fitopatojenik funguslar ise bunların arasından daha da küçük bir bölümü temsil etmektedir. Bununla birlikte, fitopatojenik funguslar, ürün veriminde yıllık olarak kalıcı ve önemli kayıplara neden olmanın yanı sıra, diğer fitopatojenler arasında ürünlerde gerçekleşen salgınlarda da temel nedenlerindendir. Bu nedenle, fitopatojenik funguslar, bilim adamları ve çiftçiler için ekonomik faktörler nedeniyle oldukça önemlidir (He et al., 2021).

Toprak kaynaklı patojenlerin kontrolü, ekolojik davranışları, son derece geniş konukçu yelpazeleri ve farklı çevresel koşullar altında klamidospore ve sklerotia gibi dirençli formları ile yüksek hayatta kalma oranları nedeniyle oldukça zordur. Birçok araştırma çalışması, biyolojik kontrolün bitkileri toprak kaynaklı patojenlerden (Çizelge 2.1) korumak için çevre dostu bir alternatif sunduğunu göstermiştir (Yangui et al., 2008).

Çizelge 2.1. Bitki patojenlerinin *Bacillus* türleri ile biyokontrolü (Dame et al., 2021).

Bacillus suşları	Hedef fitopatojen	Kontrol edilen bitki hastalığı
<i>B.amyroliquefaciens</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>	Fusarium solgunluğu
<i>B.halotolerans</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>	Fusarium solgunluğu
<i>B.subtilis</i> B-1323	<i>Botrytis cinerea</i>	Gri küf
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Çökerten hastalığı, gövde lezyonları, kök ve gövde çürüklüğü ve taç çürüğü
<i>B.licheniformis</i> MH48	<i>Botrytis cinerea</i>	Gri küf
<i>B.methylotrophicus</i> N1	<i>Fusarium moniliforme</i>	Mısır fide yanıklığı
	<i>Aspergillus niger</i>	Siyah küf
<i>B.pumilus</i> AR03	<i>Alternaria alternata</i>	Yaprak lekesi
<i>B.subtilis</i> SPB1	<i>Fusarium solani</i>	Kök çürüklüğü
<i>B.velezensis</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>	Kök çürüklüğü
<i>B.velezensis</i> XT1 CECT 8661	<i>Botrytis cinerea</i>	Kök çürüklüğü
	<i>Fusarium oxysporium</i>	Vasküler solgunluk
	<i>Fusarium solani</i>	Yumuşak çürük
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Çökerten hastalığı
<i>B.velezensis</i> NRRL B-23189	<i>Fusarium graminearum</i>	Fusarium kafa yanıklığı

Botrytis cinerea Pers. Fr. dünya çapında 200'den fazla ürün türünde ciddi kayıplara neden olmaktadır (Williamson et al., 2007). Bitkinin veya hasat edilen ürünün çürümesiyle sonuçlanan bitki dokularında ciddi hasarlara neden olan konukçu hücre ölümünü indükleyen bir nekrotroftur. *Botrytis cinerea*, çok çeşitli bitki türlerinin her yerde bulunan filamentli bir fungal patojenidir. Fungus, konukçu bitkilerin tüm havasal kısımlarını enfekte edebilmektedir. Enfeksiyon, hem bitki büyümesi sırasında hem de hasat sonrası aşamalarda (soğuk depolama veya nakliye sırasında) büyük hasara neden olabilmektedir. *B.cinerea* asma, domates, çilek, salatalık, kesme çiçekler, soğanlı çiçekler ve saksı bitkilerinin üretiminde önemli bir ekonomik kayıp nedenidir (van Kan, 2003).

En çok dikotiledonlu konakçıların olgun veya yaşlanmış dokuları üzerinde etkilidir ancak genellikle bu tür dokulara ürün gelişiminin çok daha erken bir aşamasında girmektedir. Hızla çürüyen dokularda çevre elverişli olana ve konakçı fizyolojisi değişene kadar önemli bir süre boyunca hareketsiz kalmaktadır. Bu

nedenle, görünüşte sağlıklı mahsullerin hasat edilmesi ve ardından kayıpların belirginleştiği uzak pazarlara taşınması sonrasında ciddi hasarlara neden olmaktadır. *B.cinerea*'nın kontrol edilmesi zordur çünkü çeşitli konakçılara karşı çeşitli saldırı modları vardır. Miselyum ve/veya konidia olarak veya mahsul döküntülerinde uzun süre asklerotia olarak hayatta kalabilmektedir. Bu nedenle, herhangi bir kontrol önleminin tek başına kullanılmasının başarılı olması olası değildir ve konakçı patojen etkileşimi, fungusun faaliyet gösterdiği mikroortam ve konakçı üzerindeki mikrobiyal rakipleri hakkında daha ayrıntılı bir inceleme gerekmektedir. Pazara yeni bir fungusit veya biyolojik kontrol ajanı girmesinin mevcut maliyeti o kadar yüksektir ki, yalnızca dikkate değer bazı ürünler için tarım işletmeleri tarafından yeterli ilgiyi çekmektedir (Williamson et al., 2007).

Fusarium, tarımsal açıdan önemli birçok bitki patojeni, mikotoksin üreticisi ve fırsatçı insan patojenlerini içeren filamentli bir fungus türüdür. Birçok *Fusarium* türü toprak kaynaklıdır ve ekolojik şartlara bağlı olarak sağlıklı konukçu bitkilerin parazitleri, endofitleri veya patojenleri olabilmektedir (Aoki et al., 2014). Bitki patojeni olarak *Fusarium* türleri, ekonomik önemi olan pekçok ürün türünde damar solgunluğuna, meyve, kök ve gövde çürümesine neden olarak büyük verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu kayıpların ekonomik değeri 1 milyar doları aşmaktadır. *Fusarium*, dünyadaki ekonomik açıdan en önemli fungus türleri arasındadır ve en çok çalışılanlardan biridir. (Rampersad, 2020).

Fusarium hastalıkları, hem tarımsal hem de doğal ekosistemlerdeki birçok bahçe, tarla, süs ve orman ürününün solgunluklarını, hastalıklarını, çürüklerini ve kanserlerini içermektedir (Ma et al., 2013). *Fusarium solani* çeşitli sebzeler, meyveler ve çiçekler üzerinde etkili bir patojen olduğu ve ayrıca insan ve diğer hayvanların fusariozlarından sorumlu olduğu bilinmektedir (Aoki et al., 2014).

Rhizoctonia cinsi içindeki en önemli tür olan *Rhizoctonia solani*, kültürel morfoloji, konukçu aralığı ve saldırganlık açısından önemli çeşitliliğe sahip toprak kökenli bir bitki patojenidir (Ajayi-Oyetunde and Bradley, 2018). *Rhizoctonia solani*, toprakta serbest ve saprofit olarak yaşayabilen basidiomycetea sınıfına ait toprak ve tohum kaynaklı bir fungustur. Üreme ve çoğalma açısından birbiriyle uyumsuz 14 anastomoz gruba (AG) ayrılmıştır. Çeşitli yıllık ve çok yıllık meyve, sebze, endüstriyel ve tahıl ürünlerinde hastalık yapma potansiyeline sahiptir (Aydın, 2022).

Rhizoctonia solani, Poaceae (mısır, pirinç, buğday, arpa, yulaf), Fabaceae (soya fasulyesi, yer fıstığı, kuru fasulye, yonca, nohut, mercimek, bezelye), Solanaceae (tütün, patates), Amaranthaceae (şeker pancarı), Brassicaceae (kanola), Rubiaceae (kahve), Malvaceae (pamuk), Asteraceae (marul), Araceae (pothos), Moraceae (ficus) ve Linaceae (keten) ailesinin üyelerine karşı etki gösterebilmektedir. Farklı konakçılarda görülen semptomlar arasında tohum çürüklüğü, kök çürüklüğü, hipokotil çürüklüğü, taç çürüklüğü, gövde çürüklüğü, kol çürüklüğü, bakla çürüklüğü, gövde kanseri, siyah kabuklanma, fide yanıklığı ile çıkış öncesi ve sonrası sönümlenme yer almaktadır (Ajayi-Oyetunde and Bradley, 2018).

Bitki hastalıkları; bitkiler, patojenler ve çevre arasındaki karmaşık etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Tarımın uzun tarihinde, insanlar etkileşimi manipüle etmek için konukçu bitkilerin büyümesi ve gelişmesi lehine, ancak patojenlerin oluşumu, üremesi ve bulaşması için optimal olmayan bir sistem oluşturmak için çeşitli yaklaşımlar geliştirmişlerdir. Ürün, patojen, coğrafi konum, teknolojinin varlığı, düzenleme politikası ve diğer faktörlerin koşullarına bağlı olarak, bu kontrol yaklaşımları agronomik (ör. ürün çeşitlendirmesi ve tarla hijyeni), düzenleyici (ör. karantina ve eradikasyon), genetik (ör. hastalık direnci ve toleransı), fiziksel (ör. toprak solarizasyonu ve su baskını) ve kimyasal (ör. pestisitler ve konak bağışıklığı indükleyicisi) olabilmektedir. Patojeni bastırmak, konakçıyı teşvik etmek veya konakçı patojen etkileşiminin meydana geldiği biyotik ve abiyotik ortamı değiştirmek için ayrı ayrı veya kombinasyonlar halinde (entegre hastalık yönetimi, IDM) kullanılabilmektedir (He et al., 2021).

Ticari anlamda tarım, esas olarak, fungal patojen hücrelerini ve sporlarını yok ederek veya inhibe ederek bitkileri fungal patojenlere karşı korumak için kimyasal fungisitlerin uygulanmasına dayanmaktadır (El-Baky and Amara, 2021). Kimyasal pestisitler uygun maliyetli ve zararlıların kontrolü için ekonomiktir. Düşük iş gücü gerektirmekte, büyük alanlara hızlı ve etkili bir şekilde uygulanabilmektedir. Kimyasal pestisitler, tür, aktivite ve kalıcılık bakımından çeşitlilik gösteren tüm zararlıları kontrol edebilecek şekilde esnektirler. Büyük miktarlarda, yüksek kalitede ve uygun fiyata kolayca temin edilebilmektedirler. Pestisitler genellikle ithalat ve ihracatta zararlıların yayılmasını durdurmak, yabani otları önlemek amacıyla kullanılmaktadırlar. (Koul, 2011).

Ancak, kolay uygulanmaları ve düşük maliyetleri, tekrarlanan uygulamalara veya aşırı kullanımlarına neden olmaktadır. Fungisitlerin bu aşırı veya yanlış kullanımı, insan ve hayvan sağlığı ile çevre güvenliği üzerinde toksik etkilere yol açmaktadır. Ayrıca, fungal fitopatojenlerin dirençli suşlarının ortaya çıkması, fitopatojenik fungus hastalıklarının tedavisini giderek daha zor hale getirmektedir (El-Baky and Amara, 2021).

Bu pestisitlerin hedef dışı zararlılara toksisitesi nedeniyle faydalı böceklerde meydana gelen azalma, bir alanın biyolojik çeşitliliğinde değişikliklere neden olabilmekte ve doğal biyolojik dengeyi etkileyebilmektedir. Kimyasal pestisitlerin buharının sürüklenmesi farklı ürünlerde, su yollarında ve genel olarak çevrede ciddi sorunlara neden olabilmektedir. Kimyasal pestisitler, doğrudan uygulama ya da biyomagnifikasyon yoluyla gıdalarda kalıntı bırakmaktadır. Tarımda yoğun kullanımları nedeniyle kimyasallar yeraltı sularına ulaşmakta ve büyük su kütlelerini kirletmektedirler. Aşırı maruz kalma durumunda pestisit operatörleri için doza, toksisiteye duyarlılığa ve maruz kalma süresine bağlı olarak zehirlenme tehlikesi mevcuttur (Koul, 2011).

2.2. Biyolojik Kontrol ve Entegre Zararlı Yönetimi (IPM)

Birçok dezavantajı sebebiyle, kimyasal fungisitler yerine sağlıklı, toksik olmayan ve çevre dostu alternatif yaklaşımların geliştirilmesi, fitopatojenlerin sebep olduğu enfeksiyonların kontrolünde önem kazanmaktadır. Bitki fungus hastalıklarına karşı bu güvenli ve etkili alternatif kontrol araçları, fitopatojenik fungusların biyolojik kontrolünü, mikrobiyal fungisitleri, botanik fungisitleri ve agronanoteknolojiyi içermektedir (El-Baky and Amara, 2021).

Biyolojik kontrol, bitki patojenlerini inhibe ederek, bitki bağışıklığını geliştirerek ve/veya faydalı mikroorganizmaların veya bileşiklerin çevreyi değiştirmesi ile bitki hastalık yönetimini sağlayan yöntemdir. Biyolojik kontrol, aşağıdakileri dikkate alarak diğer bitki hastalık yönetimi yaklaşımlarına göre çeşitli avantajlar sunmaktadır: (1) Biyolojik kontrol ajanları (BCA'lar) genellikle belirli bir patojen grubunu hedefler ve bu nedenle fungisitlerin aksine ekosistem üzerinde daha az olumsuz etkiye sahiptir. Bununla birlikte, özellikle yerli olmayan türlerin kullanılmasıyla, bazı ekolojik risklerin olabileceği dikkate alınmalıdır. (2) Birçok BCA, herhangi bir ek çaba harcamadan yaşamlarını sürdürebilmekte ve uygulandıkları yerde daha uzun süre kalabilmektedir. (3) Konakçı direnci ve agronomik özellikler arasında belgelenmiş bir değiş tokuş vardır. BCA'lar,

konakçı bağıışıklık sisteminin ekspresyonunu önleyerek, bitkilerin çiftçiler için önemli olan tarımsal özelliklere daha fazla enerji ve kaynak ayırmasına izin vermektedir. Biyolojik kontrolün entegre hastalık yönetimi (IDM)'nin önemli bir bileşeni olduğunu gösteren belgelere rağmen, bugüne kadar ticari değeri toplam bitki koruma pazarının %5'inden azdır (He et al., 2021).

Bitkilerin zararlılardan korunmasını sürdürülebilir hale getirebilmek için alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla bazı uzmanlar tarafından en iyi yöntem olarak entegre zararlı yönetimi (IPM) gösterilmektedir. Avrupa Birliği tarafından da pestisitlerin sürdürülebilir kullanımına ilişkin direktifte (2009/128/EC) IPM temel alınmıştır (Chandler et al., 2011; Raymaekers et al., 2020). IPM, zararlıların ve zararlıların doğal düşmanlarının dikkatli bir şekilde izlenmesi ile farklı bitki koruma yöntemlerini birleştiren bir yaklaşımdır. IPM'in temeli, farklı uygulamaların bir araya getirilerek bireysel uygulamaların eksikliklerinin giderilmesine dayanmaktadır. Amaç, zararlı popülasyonunun yok edilmesi değil ekonomik zarara sebep olacak seviyenin altında olacak şekilde mücadele edilmesidir. Temel IPM taktikleri aşağıdaki gibidir:

- Yüksek seçiciliğe sahip ve düşük risk grubunda sınıflandırılan sentetik kimyasal pestisitler
- Komple ya da kısmi zararlı direncine sahip bitki çeşitlerinin seçimi
- Ürün rotasyonu, birlikte ekim ve ara ürün ekimi gibi yetiştirme uygulamaları
- Fiziksel yöntemler, ot temizleme makinesi gibi
- Doğal ürünler, semiokimyasallar veya biyosidal bitki ekstraktları gibi
- Doğal düşmanlarla biyolojik kontrol: Bitki patojenlerinin mikrobiyal antagonistleri ve yabancı otların mikrobiyal patojenleri gibi.
- Pestisitlerin ve diğer kontrol yöntemlerinin uygulanmasının ekonomik açıdan faydalı olduğu durumlarda çiftçileri bilgilendirmek için destek sağlanması (Chandler et al., 2011).

2.3. Biyopestisitler

Biyopestisitler, IPM’de kullanılan bitki koruma yöntemlerinden biridir. Biyopestisit, canlı bir mikroorganizmadan veya doğal bir üründen üretilen ve bitki zararlılarının kontrolü amacıyla satılan seri olarak üretilebilen bir ajan olarak tanımlanmaktadır. Biyopestisitler, aktif bileşenine göre üçe ayrılmaktadır: mikrobiyal pestisitler, biyokimyasallar ve semiyokimyasallar (Chandler et al., 2011; Fenibo et al., 2021; Seenivasagan and Babalola, 2021).

Kimyasal pestisitlerle karşılaştırıldıklarında biyopestisitler insanlara ve çevreye karşı daha az risk oluşturmaktadırlar. Birçok biyopestisit yüksek seçiciliğe sahiptir ve hedef dışı organizmalara zarar vermemektedir (Kumar et al., 2021; Seenivasagan and Babalola, 2021). Bitki hastalıkları, yabani otlar ve böcekler gibi zararlıları yok etmede ya da kontrol etmede yeni bir araç olarak dikkat çekmektedirler. Dünyada biyopestisit kullanımı her geçen yıl %10 artmaktadır (Seenivasagan and Babalola, 2021). Biyopestisitler düşük miktarlarda bile oldukça etkili olabilmektedirler ve sorun oluşturacak kalıntılar bırakmadan doğada hızlıca yok olabilmektedirler. Böylece, IPM programlarının ayrılmaz bir parçası olarak geleneksel pestisitlerin kullanımını azaltmaktadırlar (Kumar et al., 2021).

Bununla birlikte, biyopestisit kullanmanın yararlarına rağmen, aşağıdaki nedenlerden dolayı kullanımları beklendiği kadar yaygın olmamıştır:

- Tarama, geliştirme ve yeni biyolojik ajanlar için yasal izinlerin alınmasıyla ilgili maliyetler nedeniyle biyopestisit üretiminin yüksek maliyeti;
- Biyopestisitlerin sıcaklık ve nemdeki dalgalanmalara duyarlılığı nedeniyle kısa raf ömrü;
- Sıcaklık, nem, toprak koşulları gibi çevresel etmenlerdeki iklimsel/bölgesel farklılıklar nedeniyle sınırlı alan etkinliği;
- Biyopestisitlerin sadece hedef patojenlere ve zararlılara karşı etkili olarak yüksek özgülüğe sahip olmaları nedeniyle çiftçiler tarafından daha az ilgi görmektedir. Sahadaki farklı patojenleri ve zararlıları kontrol etmek için birden fazla biyolojik ajan kullanılması gerekmektedir. Bu ajanlar kafa karıştırıcı ve

maliyetlidir. Ayrıca her zararlı veya patojen için de etkili bir biyopestisit bulunmamaktadır (Kumar et al., 2021).

2.3.1. Mikrobiyal pestisitler

Rizosfer, kök sisteminin salgılarından doğrudan etkilenen dar bir toprak bölgesidir. Büyük miktarda karbonhidrat ve amino asit taşıyan kök salgılarının birikmesi nedeniyle genel toprağa kıyasla besin açısından zengin bir bölgedir ve toprakla ilişkili mikroorganizmalar için zengin bir enerji ve besin kaynağı görevi görmektedir. Rizosfer çeşitli mikroorganizmalar, bu bölgede bulunan ve rizobakteri olarak adlandırılan bakteriler ile zenginleşmiştir. Bitkilerle ilişkili bakteriler bitkiler üzerindeki etkilerine göre faydalı, zararlı ve nötr olmak üzere farklı gruplara ayrılmaktadır. Rizosferde yaşayan faydalı bakteriler, bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) olarak bilinmektedir. PGPR, bitkilerle spesifik simbiyotik ilişkilere sahip tarımsal açıdan önemli bakterilerdir. PGPR, bitki patojenlerini baskılayarak veya bitkiler için farklı besin maddeleri sağlayarak bitki büyümesini ve sağlığını iyileştirmektedir. PGPR, “Bitki köklerini kolonize eden veya bünyesine katan ve bitkinin büyümesini iyileştiren toprakta yaşayan bakteriler” olarak tanımlanmaktadır (Tariq et al., 2017).

İyi bir PGPR formülasyonunun geliştirilmesi için seçilecek rizobakteriyel suşun sahip olması gereken özellikler; bitki büyümesini destekleme, kitlesel üretime uygun olma, yüksek rizosferik direnç sahip olma, yüksek rekabetçi saprofitik yeteneğine sahip olma, geniş aktivite spektrumu gösterme, diğer rizobakteri türleri ile ekolojik olarak uygun olma, sıcaklık, kuraklık, radyasyon, okside edici ajanlar gibi abiyotik stres faktörlerine karşı toleranslı olma ve çevre için güvenli olma şeklindedir (Basu et al., 2021; Mohanty et al., 2021).

Bitki büyümesi ve sağlığının iyileşmesi PGPR tarafından çeşitli direkt ve dolaylı mekanizmalarla düzenlenmektedir. PGPR tarafından doğrudan bitki büyümesinin desteklenmesi ya bitkiler tarafından patojenlere karşı bileşikler salgılanmasını ya da bitki büyümesi için gerekli olan çeşitli besinlerin çevreden emilmesine yardımcı olmayı içermektedir. Bununla birlikte, rizobakteriler, rizosferde yaşayan bitki patojenlerini dışlayarak ve azaltarak bitkiye dolaylı olarak fayda sağlama yeteneğine de sahiptir (Tariq et al., 2017).

Fitopatogenlerin zararlı etkilerini azaltmak ya da kontrol etmek amacıyla PGPR kullanımı biyolojik kontrol olarak adlandırılmaktadır. PGPR’ler,

antibiyotikler, bakteriyosinler, sideroforlar ve litik enzimler gibi büyüme inhibitörleri üreterek veya konukçu bitkinin doğal direncini artırarak patojenik ajanların bitkiler üzerindeki zararlı etkilerini kontrol etmektedir. PGPR'nin antagonistik aktivitesi rekabet, parazitizm, sideroforlar veya antibiyotik üretimi gibi çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir. *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Serratia* gibi cinslere ait çeşitli rizobakteri türlerinin bitki büyümesini ve gelişmesini teşvik ettiği bilinmektedir (Tariq et al., 2017).

Mikrobiyal pesitsitler olarak kullanılan PGPR türleri toksik değildir ve hedef olmayan organizmalar için patojenik değildir. Mikrobiyal pesitsitlerin etkisi tek bir zararlı grubuna veya türüne özgüdür ve bu nedenle mikrobiyal pestisitler avcılar ve parazitoidler gibi doğrudan faydalı hayvanları ekilememektedir. Kimyasal pestisitlerin yasak olduğu rekreasyonel ve kentsel alanlar, su havzalarının göl ve akarsu sınırları, tarımsal alanlardaki ev ve okulların yakını gibi birçok habitatta mikrobiyal pestisitler kullanılabilmektedir. Mikrobiyal pestisitlerin kalıntıları zararsızdır ve mahsullerin hasat zamanına yakın uygulansalar bile her zaman güvenlidirler. Vektörleri kontrol etme potansiyeline sahiptirler. Bazı antagonist mikroorganizmalar, zararlı popülasyonunda veya zararlının habitatında yerleşebilmektedirler. Böylece sonraki mevsimlerde veya zararlı nesillerinde de kontrol sağlayabilmektedirler (Koul, 2011).

Bununla birlikte, mikrobiyal pestisitler, tarlada bulunan zararlıların sadece bir kısmını kontrol edebildiklerinden uygulandıkları alanda bulunan diğer zararlılar sürekli hasara neden olabilmektedir. Isı, UV ışığı ve kuruma mikrobiyal pestisitlerin etkinliğini azalttığından uygulama şekilleri önemli bir faktördür. Özel formülasyonlar ve depolama prosedürleri gerektirmektedirler. Raf ömürlerinin kısa olması kısıtlayıcı bir faktördür. Zararlıya özgü oldukları için pazar payları sınırlıdır. Geliştirme, kayıt ve üretim maliyetleri sebebiyle kullanımları çok çeşitli zararlı kontrolü için yaygınlaşmamıştır (Koul, 2011).

İyi bir mikrobiyal pestisit ürünü elde etmek için önerilen aşamalar; izolatin seçilmesi, seçilen en iyi izolatin tanımlanması, etkinlik için laboratuvarda tarama testlerinin gerçekleştirilmesi, üretim etkinliğinin değerlendirilmesi, etki şekli ve toksikolojik özelliklerinin belirlenmesi, sera denemeleri sonucu ticari koşullarda etkinliğin incelenmesi olarak sıralanmaktadır. Tüm bu faktörler göz önüne alındığında başarı kaçınılmaz olacaktır (Koul, 2011).

2.3.2. Biyokimyasallar

Biyokimyasal biyopestisitler, hedef zararlı, çevre ve insanlar için toksik olmayan mekanizmalarla zararlıyı kontrol eden aktif bileşenlere sahip doğal kökenli bileşiklerdir. Biyokimyasal biyopestisitler, uçucu yağlar, bitki büyümesini teşvik edici düzenleyiciler, böcek büyüme düzenleyicileri, ikincil metabolitler ve doğal mineraller olarak farklı çeşitler içermektedir (Fenibo et al., 2021; Kumar et al., 2021).

2.3.3. Semiyokimyasallar

Bu maddeler genetiği değiştirilmiş organizmalar tarafından üretilmektedir. Genetik materyal bitkiye dahil edilmekte ve daha sonra bitkiye dahil olan koruyucular (PIP) olarak da adlandırılan pestisit bileşiklerini üretmek için bitkiler bir kaynak olarak kullanılmaktadırlar. Cry proteinler, toprak bakterisi *B.thuringiensis*'ten alınan transgenleri içeren genetiği değiştirilmiş ürünlere eklenen ilk nesil böcek öldürücü PIP'lerdir (Kumar et al., 2021). PIP'ler, bitkiyi zararlı saldırısı için uygun olmayan hale getiren transgenik bitkilerdir. PIP teknolojisinde kullanılan insektisidal moleküller, *B.thuringiensis* Cry proteinleri, *Xenorhabdus* ve *Photprhabdus*'tan toksik kompleks proteinleri, α -amilaz inhibitörü, *Baculovirus* proteazı, çift sarmallı ribonükleik asit ve mısırdan izole edilen Mir1-CP'dir (Fenibo et al., 2021).

2.4. *Bacillus* Türleri

Bacillus genusu, *Firmicutes* şubesine ait büyük bir gram pozitif bakteri grubunu temsil etmektedir. Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology'nin son baskına göre *Bacillus* cinsine ait 142 tür tespit edilmiştir. Bu gruptaki bakteriler, çok çeşitli ekolojik nişlerde yaşayabildiklerinden, istisnai olarak her yerde bulunmaktadır. Toprak, su ve havada bulundukları gibi ayrıca bitkilerin yüzeylerinde ve rizosferinde, hayvanların mide-bağırsak sisteminde ve birçok ekstrem ortamda da bulunmaktadır (Fira et al., 2018).

Aşırı sıcaklık (30 °C ila 50°C), pH (5-9) ve kuraklık gibi çevresel koşullarda hayatta kalabilmektedirler. *Bacillus subtilis*, toprağın spor çimlenmesi ve çoğalması için uygun olması nedeniyle "Toprak Sakini" olarak da bilinmektedir. *Bacillus subtilis* mükemmel fizyolojik özelliklere sahiptir. Aerobik, çubuk

şeklinde (2-4 µm uzunluğunda ve 0.25-1.0 µm eninde), gram pozitif, katalaz pozitif ve endospor oluşturan toprak bakterisidir (Pandav et al., 2021).

Bacillus türleri, birçok değerli özelliğe sahip olması nedeniyle mikrobiyal biyopestisitlerin ana kaynaklarından biri olarak değerlendirilmektedir. İlk olarak, *B.subtilis* gibi *Bacillus* türleri sıklıkla kullanımlarını kolaylaştıran iyi çalışılmış organizmalardır. İkinci olarak, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (USFDA)'nin, *Bacillus subtilis*'e "genellikle güvenli olarak kabul edilen" (GRAS) statüsünü vermesi nedeniyle patojenik olmadığı kabul edilmiştir. Bu da biyopestisit olarak kullanılabilmesi açısından önemlidir. Üçüncü olarak, *Bacillus* türleri, yüksek sıcaklıklara, elverişsiz pH değerlerine, besin veya su eksikliğine vb. dayanabilen son derece dirençli dormansi formları olan endosporları üretme yeteneğine sahiptir. Bakteriler tarafından çevresel koşullar uygun olmadığında üretilen endosporlar muhtemelen bu mikroorganizmaların fitosferde hayatta kalmasına da yardımcı olmaktadır (Cawoy et al., 2011).

Bacillus türlerinin bitki hastalıklarının biyolojik kontrolünde sıklıkla kullanılmasının en önemli nedeni bu mikroorganizma grubunun endospor oluşturma özelliğidir. Endosporlar, yüksek mekanik mukavemete sahip termo toleranslı yapılardır ve kuruma, ultraviyole radyasyon, organik solventler veya yüksek sıcaklıklar gibi dış etkenlere karşı dayanıklı formlardır. Endosporların oluşumu, aslında, bakterilerin sıcaklık, pH veya açlık ve besin eksikliğinden kaynaklanabilecek optimal olmayan koşullara uyum sağlamalarının bir yoludur. Sporlanma süreci stresli koşullarda başlamaktadır ve aynı zamanda besinlerin tükendiği durağan büyüme evresinde de başlamaktadır. Literatür verileri, hücre yoğunluğu yaklaşık 10^8 kob/ml olduğunda bir kültürün sporülasyonu başlattığını göstermektedir. İdeal koşullar altında, tipik hücre yoğunluğu ve sporülasyon verimliliği sırasıyla 10^8 - 10^{10} kob/ml ve %30-80'dir (Stamenkovic- Stojanović et al., 2019).

Endospor oluşturan mikroorganizmalar, yalnızca zararlı çevresel koşulları tolere etmekle kalmaz, aynı zamanda büyük ölçekli üretim sırasında agresif işlem adımlarında hayatta kalmayı da sağlamaktadır. Bu da hazırlanacak formülasyonların direncini ve stabilitesini garantilemektedir ve *Bacillus* türlerini ideal biyokontrol ajanları haline getirmektedir. Bu nedenle, iyi sporülasyon elde etmek ve sporları formülasyona dahil etmek oldukça önemlidir (Stamenkovic- Stojanović et al., 2019).

Kültürasyonun sonunda sporülasyonun indüklenmesi endüstriyel üretimler bakımından önemlidir. Böylece, bakteri süspansiyonları, spor oluşturmeyan bakterilerde gözlenen yüksek bakteri ölüm oranı olmaksızın kullanımı kolay toz formülasyonlara dönüştürülebildiğinden üretim sonrası işlemler büyük ölçüde kolaylaşmaktadır. Spor oluşturan bakteri içeren biyopestisitler, diğer canlı mikroorganizma içeren ürünlerle karşılaştırıldığında raf ömürleri daha uzundur ve daha az depolama önlemi gerektirmektedir (Cawoy et al., 2011).

Biyoteknolojik bakış açısından, *Bacillus* türlerinin en önemli özelliği, çeşitli sekonder metabolizmaları ve yapısal olarak farklı çok çeşitli antagonistik maddeler üretme yetenekleridir. *Bacillus subtilis* suşları tüm genomun yaklaşık %4-5'ini sekonder metabolitlerin sentezine ayırmıştır. Diğer izolatlar arasından bir başka tipik örnek, bitki ile ilişkili bir suş olan *B.amyloliquefaciens* FZB42 suşunun genomunun ise neredeyse %8'i, bakteriyosinler, antimikrobiyal peptitler ve lipopeptitler, poliketitler ve sideroforları içeren sekonder metabolitlerin üretimi ile ilişkilidir (Fira et al., 2018).

Bacillus türlerinin özel besin kaynakları gerektirmemesi sebebiyle endüstriyel olarak üretilmesi nispeten kolaydır. Endospor oluşturma yeteneğinin yanı sıra, *B.subtilis*, rizosferde hayatta kalmasını sağlayan ve dolayısıyla bir biyopestisit olarak etkinliğini artıran çeşitli özelliklere sahiptir. Aerobik ortamlarda yaşadığı bilinen bu bakteri, düşük oksijen konsantrasyonu altında hayatta kalan ve gelişebilen fakültatif anaerob gibi davranabilmektedir. Oksijen varlığı zaman içinde değişebileceğinden ve genellikle de düşük olduğundan, bu özellik rizosferde gerçek bir avantaj sağlamaktadır. Ek olarak, *B.subtilis*, kolayca kök yüzeyine doğru hareket eden kolonizasyonunu kolaylaştıran, hareketli bir bakteridir. *Bacillus* türlerine olan yüksek ilginin bir başka nedeni de etki şekillerinin çeşitliliğidir. Biyokontrol ve biyostimülasyon/biyogübre mekanizmalarının hemen hemen hepsini gösterebilmektedir. Ayrıca, bir suş çoğu zaman birkaç mekanizma yoluyla hareket edebilmektedir. Böylece, bir mekanizma diğerinin yerine hareket ederek bu bakterilerin birçok koşulda (çeşitli patojenler, bitkiler, çevresel koşullar) etkili olmasını sağlamaktadır (Cawoy et al., 2011).

2.5. *Bacillus* Türlerinin Biyolojik Mücadele Etmeni Olarak Etki Mekanizmaları

2.5.1. Antibiyozis

Fitopatojenlerin neden olduğu hasarla mücadele için bitki büyümesini destekleyici bakterilerin temel yöntemi antibiyotiklerin üretimidir. Fitopatojenlere karşı biyokontrol adayları olarak rizobakterilerin potansiyeli genellikle bir veya daha fazla antibiyotik üretmeleri ile ilişkilidir. Antibiyotikler, bakterilerin ve diğer mikroorganizmaların büyümesini veya metabolik aktivitelerini engelleyen çeşitli organik, düşük moleküler ağırlıklı bileşikler grubudur (Tariq et al., 2017; Saeed et al., 2021).

Kök hastalıklarının biyolojik kontrolü ile bağlantılı olan fenazinler, floroglusinoller, pyoluteorin, pirrolnitrin, siklik lipopeptitler ve hidrojen siyanür (HCN) gibi altı grup antibiyotik bileşiği uçucu olan HCN dışında difüze olabilen antibiyotiklerdir. Antibiyotikler, patojen hücre duvarı sentezini inhibe etmeyi, hücre membran yapılarını etkilemeyi ve ribozomun küçük alt biriminde başlatma komplekslerinin gelişimini engellemeyi içeren etki mekanizmaları ile çok çeşitli fungus ve bakteri türlerinden izole edilmiştir (Saeed et al., 2021).

Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen uçucu inorganik bileşikler esas olarak birincil metabolizmanın yan ürünleridir. Bunlar CO₂, CO, H₂, HCN, H₂S, N₂, NH₃ ve NO gibi karbonatlı, hidrojenlenmiş, kükürt veya azot içeren bileşiklerdir. Glisin katabolizmasından türetilen hidrojen siyanür, solunum zincirinde aktif olan sitokrom c oksidaz gibi metal içeren enzimleri inhibe ederek aerobik mikroorganizmalara karşı doğrudan antagonistik bir aktivite gösteren mikrobiyal uçucu organik bileşiklerden (mVOC) biridir. (Caulier et al., 2019; Mohanty et al., 2021).

HCN ayrıca bitkinin fitopatojenlere karşı savunmasında önemli bir rol oynamaktadır. HCN bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen, patojen ve biyokontrol ajanı arasındaki rekabeti ve predasyonu önlemek için genel inhibitör görevi gören ikincil bir metabolittir. Patojen için toksik olduğu ve rizosferik ortamda patojenin ölüm oranını arttırdığı kabul edilmektedir (Jangir et al., 2018).

B. subtilis, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. velezensis*, *B. licheniformis* vb. gibi *Bacillus* türlerinin üyelerinin antimikrobiyal bileşikler üretme yetenekleri iyi bilinmektedir. *B. subtilis*'in genomunun %5'e kadarını antimikrobiyal bileşiklerin biyosentezine ayırabildiği ve *B.velezensis* FZB42 genomunun yaklaşık %10'unun farklı antimikrobiyal bileşiklerin sentezi için olduğu gösterilmiştir (Saxena et al., 2020).

Antimikrobiyal metabolitlerin çoğu ikincil metabolizmanın ürünüdür ve genellikle kısa peptitlerdir. Ribozomal peptitler, esas olarak, hücre zarfı ile etkileşim yoluyla ilgili bakterilere karşı spesifik olarak etki eden bakteriyosinlerden oluşmaktadır. *B.subtilis* tarafından üretilen subtilisin, *B.halodurans* tarafından üretilen halodurasin ve *B.licheniformis* tarafından üretilen lichenidin önemli Sınıf I bakteriyosinlere örnek olarak verilebilir. *B.thuringiensis* tarafından üretilen thurisin ve baktthurisin, *B.cereus* tarafından üretilen cerein vb. Sınıf II bakteriyosinlerdendir. Sınıf III bakteriyosinler, fosfolipaz aktiviteleri olan büyük proteinlerdir. Ribozomal olarak sentezlenmiş peptitler için gerekli olan genler, *B.thuringiensis*, *B.subtilis*, *B.cereus*, *B.anthraxis* ve *B.velezensis* genomlarında oldukça bol miktarda bulunmaktadır. Ribozomal olmayan peptitler (NRP'ler), amino asit kalıntılarının ribozomdan bağımsız enzim aracılığıyla yoğunlaştırılması yoluyla sentezlenmektedirler. Üç yüzden fazla farklı öncü molekül, NRP'lerin birleşmesine katkıda bulunmaktadır. Çok çeşitli enzimler tarafından birleştirilen NRP'ler genellikle lipopeptit olarak bilinen yağ asidi zincirlerine sahiptir (Saxena et al., 2020).

Bacillus kaynaklı siklik lipopeptitler (CLP'ler), potansiyel antifungal bileşikler sınıfı olarak son yıllarda çok dikkat çekmektedir. Yağ asidi yan zincirlerine sahip amino asit halkalarıdır ve dikkate değer bir heterojenlik göstermektedirler. Bu yapısal çeşitlilikler, CLP'lerin geniş spektrumlu ve çevresel olarak stabil antimikrobiyaller olmasını sağlamaktadır. CLP'ler sürfaktin, iturin ve fengisin olmak üzere üç aileye aitken, tek bir *Bacillus* suşu bunlardan bir veya daha fazlasını (Çizelge 2.2) sentezleyebilmektedir (Dame et al., 2021).

Bacillus üyeleri arasında, *B.subtilis*, *B.thuringiensis*, *B.velezensis* ve *B.cereus* genomları, yüksek miktarda NRP gen kümeleri içermektedir. Lipopeptitler arasından iturin ve sürfaktin, *Bacillus* türlerinde en çok bulunanlardandır. Sürfaktinler, çoğunlukla *B.subtilis* ve *B.licheniformis* gibi *Bacillus* türleri tarafından üretilmektedir (Saxena et al., 2020).

Çizelge 2.2. Antifungal aktivite gösteren *Bacillus* suşlarının etki şekilleri (Lopes et al., 2018).

Suş	Konukçu bitki	Doku	Etki şekli
<i>B.amyloliquefaciens</i> BmB 1	<i>Bacopa monnieri</i>	Gövde	Süpfaktin ve basillomisin üretimi
<i>B.amyloliquefaciens</i> SG JW.04	<i>Zea mays</i>	Tohum	Fengisin, iturin A ve basillomisin üretimi
<i>B.subtilis</i> SG JW.03	<i>Zea mays</i>	Tohum	Fengisin, iturin A ve basillomisin üretimi
<i>B.mojavensis</i> RRC101	<i>Zea mays</i>	Tohum	Fengisin üretimi
<i>B.velezensis</i> CC09	<i>Cinnamomum camphora</i>	Yaprak	Süpfaktin, iturin ve fengisin üretimi
<i>B.methylotrophicus</i> CKAM	<i>Malus domestica</i>	Kök	Süpfaktin, iturin ve fengisin üretimi
<i>Bacillus</i> sp. BmB 9	<i>Bacopa monnieri</i>	Gövde	Süpfaktin, iturin ve fengisin üretimi
<i>Bacillus</i> sp. CaB 5	<i>Capsicum annuum</i>	Meyve	Süpfaktin ve iturin üretimi

Lipopeptidler, patojenlerin büyümesini doğrudan baskılayarak veya konukçu bitkilerde sistemik direnci indükleyerek hem hasat öncesi hem de hasat sonrası koşullarda bitkilere koruma sağlayan amfifilik özelliklere sahip düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Son zamanlarda, 11 mikrobiyal tür tarafından sentezlenen 263 farklı lipopeptit bulunmuştur. Bunlar içinden, 98 farklı lipopeptit ile en çok çeşidi *Bacillus* türleri üretmektedir. Bitki hastalıklarının biyolojik kontrolü bakımından, *Bacillus* lipopeptitlerinin üç ailesi: süpfaktinler, iturinler ve fengisinler, bakteri ve funguslar dahil olmak üzere çok çeşitli potansiyel fitopatojenler (Çizelge 2.3) için ilgi çekici antagonistlerdir (Valenzuela Ruiz et al., 2020).

Son çalışmalara göre, lipopeptitler, hücre zarında por oluşumunu ortaya çıkarmak için yüksek konsantrasyonda ve apoptozu indüklemek için düşük konsantrasyonda antifungal etki gösterebilmektedir. Bu şekilde, lipopeptitler hücre duvarı oluşumunu da engelleyebilmektedir. Ek olarak, farklı polariteler ve hidrojen bağı ile sıvı fazların ara yüzünü bölerek mikroorganizmaların adhezyonunu etkileyebilmektedirler. Mikrobiyal biyofilmleri bozma veya engelleme eğiliminde olan biyosüpfaktan özelliklerine sahip olmaları nedeniyle mikroorganizmaların bu lipopeptitlere karşı direnç geliştirmesi zor olmaktadır (Zhao et al., 2017).

Çizelge 2.3. Farklı patojenlere karşı lipopeptidlerin antimikrobiyal etkisi (Penha et al., 2020).

Lipopeptit ailesi	Hedef mikroorganizma	Deneme koşulları
Sürfaktin, iturin ve fengisin	<i>Monilinia fructicola</i>	Deneme şeftali ve nektarinler üzerinde laboratuvarda gerçekleştirilmiştir.
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	İnhibisyon petri denemeleri ile belirlenmiştir.
	<i>Fusarium oxysporium f.sp. melonis</i>	Kavun fideliğinde ve sakı toprağında uygulanmıştır.
	<i>Fusarium solani, R.solani, Penicillium spp., Sclerotium rolfsii, S.sclerotiorum</i>	Beyaz ve siyah fasülyede laboratuvar koşullarında test edilmiştir.
Sürfaktin ve iturin	<i>Fusarium solani, F.oxysporium, Penicillium expansum, Mucor sp., Aspergillus flavus, Alternaria alternata</i>	İnhibisyon petri denemeleri ile belirlenmiştir.

Membranda por oluşturma kapasiteleri ve deterjan etkileri nedeniyle lipopeptit sürfaktanlar, hemolitik aktivite göstererek insan eritrositlerinin hemolizini indükleyebilmektedir. Eritrositleri parçalama yeteneği, lipopeptit sürfaktanların fibrin pıhtı oluşumunun güçlü inhibitörleri olarak kullanımına izin vermektedir. Yapılan çalışmalarda, sürfaktin tarafından fibrin monomerlerinin fibrin polimerine dönüşmesi engellenerek fibrin pıhtı oluşumunun inhibe edildiği gösterilmiştir. *B.subtilis* tarafından üretilen subtilisin fibrin pıhtı oluşumunu inhibe ettiği ve eritrositlerin hemolizine neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, iturin A antibiyotik lipopeptidinin hemolitik aktivitesi incelenmiştir ve kritik misel konsantrasyonunun altındaki iturin konsantrasyonunda doza bağlı bir şekilde insan eritrositlerinin hemolizine neden olma yeteneği gösterilmiştir. Etki mekanizması ile ilgili olarak, iturin A'nın neden olduğu hemolizin, ortalama 32A° çapında bir membran por oluşumu ile kolloid-ozmotik bir mekanizma izlediğini ve kinetik belirlemeler hemoglobin salınımından önce K⁺ sızıntısının meydana geldiğini açıkça göstermektedir. K⁺ sızıntısı, K⁺ seçici elektrot kullanılarak ölçülmüştür. *B.subtilis* ATCC 6633 kaynaklı bir lipopeptit sürfaktan, SDS (Sodyum Dodesil Sülfat), BC (Benzalkonyum Klorür), TTAB (Tetradecil Trimetil Amonyum Bromür) ve HTAB (Heksadesil Trimetil Amonyum Bromide) gibi

kimyasal sürfaktanlara kıyasla zayıflatılmış bir hemolitik etki sergilemiştir (Ines and Dhouha, 2015).

Yapısal veya fiziksel analizler için saf bileşikler kullanılması gerektiğinden, başarılı bir üretimin ardından verimli saflaştırma yapılmalıdır. Üretim ortamından saf CLP numuneleri elde etmek için etkin izolasyon teknikleri gereklidir. Bu nedenle, ticari ölçekte bir üretim sürecinin fizibilitesini belirlemek için uygun ve ekonomik geri kazanım ve alt akım prosedürlerin mevcudiyeti önemli bir faktördür (Biniarz et al., 2017). Alt akım işlemleri, istenen ürünün geri kazanılması ve saflaştırılması için temel işlemler dizisidir. Temel işlemlerin seçim kriterleri, ürünün uygulamasına bağlıdır. Farmasötik gibi endüstriler, saf bir biyosürfaktanı geri kazanmak için birkaç adım gerektirirken, petrol endüstrileri çok fazla saflaştırma işlemi gerektirmemektedir.

Sektörler için belirlenmiş alt akım işlemleri: (1) solventler ve zaman bakımından yüksek maliyetlere sahip olduklarından (2) büyük miktarlarda toksik atık ürettiklerinden (3) işleme sırasında aktivite kaybına sebep olduklarından (4) agregasyon nedeniyle üretkenliği azalttığından uygulanabilir değildirler. Sonuç olarak, yüksek verim, üretkenlik, saflık ve etkinliğe sahip gelişmiş, özelleştirilebilir ve uygun maliyetli alt akım işlemlerine ihtiyaç vardır. Ekstraksiyon ve saflaştırma, lipopeptitlerin araştırılmasında ve ticarileştirilmesinde kilit aşamalardır. Genel olarak, bu bileşiklerin saflaştırılması *Bacillus* suşunun yetiştirildiği üretim ortamı gibi sıvı bir matristen başlamaktadır, bununla birlikte katı kültür fermentasyonunda üretimleri de raporlanmıştır (Valenzuela Ruiz et al., 2020).

Saflaştırma yöntemleri, lipopeptitlerin fizikokimyasal özelliklerine (polarite ve moleküler ağırlık) dayanmaktadır. Genellikle, bu bileşiklerin saflaştırılması için tek bir yöntem yeterli olmamaktadır. Bu nedenle, lipopeptit saflaştırılmasının i) asit ile çöktürme; ii) organik solventlerin kullanımı; iii) ultrafiltrasyon; iv) katı faz ekstraksiyonu ve v) kromatografi gibi çeşitli aşamaları içermesi mümkündür (Valenzuela Ruiz et al., 2020).

Ekstraksiyondan sonra, CLP'lerin ileri karakterizasyonu için daha detaylı bir saflaştırma gerekmektedir (Çizelge 2.4). İnce tabaka kromatografisi (TLC) ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC), CLP'leri saflaştırmanın alternatifleridir. Sıvı kromatografisi (LC) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu durumda sıklıkla

C18 kolonları kullanılmaktadır. Tam olarak tanımlama için kütle spektrometrisi önerilmektedir (Penha et al., 2020).

Çizelge 2.4. Lipopeptidlerin belirlenmesi ve saflaştırılması için örnek yöntemler (Penha et al., 2020).

Lipopeptidler	Belirleme ve ölçme yöntemleri
Süpfaktin, iturin, fengisin ve kurstakin	HPTLC; MALDI-TOF MS
Süpfaktin, iturin ve fengisin	HPTLC (silica jel 60 tabaka- Merck)
Süpfaktin ve iturin	HPLC (ter fazlı C18 kolonu); MALDI-TOF MS; LC-ESI MS
Süpfaktin ve fengisin	HPLC (C18 kolonu)
Süpfaktin ve iturin	TLC; LC-ESI-MS/MS (C18 kolonu)
İturin ve fengisin	Vakum flash kromatografi; HPLC; NMR spektroskopisi; HR ESI MS
Süpfaktin, iturin ve fengisin	LC-MS (C18 kolonu)
Süpfaktin, iturin ve fengisin	LC-MS (C8 kolonu)
Süpfaktin	HPLC (C18 kolonu)
Süpfaktin, iturin ve fengisin	MALDI-TOF

2.5.1.1. Süpfaktin

Süpfaktin, yüzey gerilimini etkili bir şekilde azaltan en doğal lipopeptittir. β -hidroksil yağ asidi tarafından bağlanan siklik heptapeptid yapısına eklenen 13-15 karbon atomlarından ve L-asparagin(As), L-lösin (Leu), glutamik asit (Glu), L-lösin (Leu), L-valin (Val) ve iki D-lösin gibi yedi amino asitlik bir halkadan oluşan siklik lipopeptit ailesine aittir. Şimdiye kadar, farklı amino asit ve yağ asidi kalıntıları ile 30'dan fazla süpfaktin türü keşfedilmiştir. Ancak süpfaktin molekülü, kiral diziye bağlı olarak aynı kalmaktadır. Suş tipine ve çalışma koşullarına bağlı olarak, süpfaktinde amino asitlerin ve hidroksil yağ asitlerinin farklı türleri bulunmaktadır. Birçok terapötik özelliğe sahip olan bu tip süpfaktan *Bacillus spp.* tarafından üretilmektedir. Antibakteriyel, antiviral, antifungal ve antimikoplazma aktiviteleri nedeniyle süpfaktin, farklı uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca gıda endüstrisinde etkili bir emülgatör, stabilizatör ve yüzey değiştirici olarak da kullanılmaktadır (Carolin et al., 2021). Süpfaktanlar, bazı patojenik fungusların zayıf antagonistleri olarak karakterize edilmelerine rağmen, konukçu bitkide sistemik direnci indüklemeye yetenekleri nedeniyle de dikkat çekmektedirler (Dame et al., 2021).

Sümfaktinler biyolojik kökenli en güçlü yüzey aktif maddelerden biridir ve *Bacillus*'un kümelenme hareketliliğine ve biyofilm oluşturma yeteneğine katkıda bulunmaktadır. Bu siklik heptapeptidler, yaprak yanması, kök çürüklüğü, gövde çürüklüğü, yaprak lekesi ve yumuşak çürüklük gibi bir dizi bakteri ve fungus hastalığına karşı etki göstermektedir (Saxena et al., 2020).

2.5.1.2. İturin A

İturin yapısı ilk olarak 1978 yılında belirlenmiştir. İturin A ve C, basillomisin D, F, L ve mikosubtilin gibi altı varyanttan oluşan siklik bir heptapeptiddir. İturin A ve basillomisin D yanında, basillomisin L üreten tek tür *B.velezensis*'tir. Bu iturin varyantları, amino asit ve yağ asidi uzunluğunun pozisyonu ve bileşimine göre farklılık göstermektedir. Bu lipopeptidin ortak yapısı, C14-C17 hidrofobik kuyruk uzunluğunda Tirozin (Tyr), Asparagin (Asn), Serin (Ser), Glutamin (Gln), Prolin (Pro), Glutamat (Glx), Treonin (Thr) gibi yedi amino asitten oluşmasıdır. Bu yapı, bileşiğin amfifilik yapıda olduğunu ve en olası etki alanının hücre zarı olduğuna işaret etmektedir. Bu lipopeptidde siklizasyon, bir amid bağı ile bağlanan ilk ve son amino asit arasında gerçekleşmektedir. *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* ve *Alternaria alternate*'ya karşı en iyi antifungal aktiviteyi göstermektedirler ancak sınırlı antibakteriyel aktivite gösterebilmektedirler. Bu lipopeptid, güçlü bir yüzey aktivitesi ve destabilize edici etki göstermektedir ve sümfaktin ile karşılaştırıldığında düşük hemolitik potansiyele sahiptir (Carolin et al., 2021).

İturin gruplarının ayrıca *A.flavus* ve *F.graminearum*'a karşı güçlü antagonistik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Dame et al., 2021). Sümfaktinlerin aksine iyon ileten porlar oluşturarak hücrelere zarar vermektedirler. Bu lipopeptidler, *Penicillium*, *Pestalotia*, *Gloesporidium*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Botrytis* gibi fungal patojenlere karşı güçlü aktivite göstermektedirler (Saxena et al., 2020).

2.5.1.3. Fengisin

Fengisin, β -hidroksil yağ asidi zinciri (C14-C18) ile lineer biçimde birleşen dekaeptitlerdir ve 3. konumdaki bir amino asidin fenol yan zinciri ile 10. konumdaki bir amino asidin C terminali arasında siklizasyon meydana gelmektedir. Fengycin A ve B ilk olarak 1986 yılında *B.subtilis* suşunda keşfedilmiştir. Fengisin, filamentöz funguslara karşı güçlü aktivite

göstermektedir. Ancak, aynı zamanda Quorum Sensing'i inhibe ederek *Staphylococcus aureus* popülasyonunu da azaltmaktadır. Bu lipopeptit, çift katlı lipit katmanları ve sterol molekülleri ile doğrudan etkileşime girdikleri için hücre zarı yapısını ve geçirgenliğini değiştirebilmektedir (Carolin et al., 2021).

Öte yandan fengisinler, çoğu filamentöz fungusu ve *F.verticilloides* gibi türleri inhibe etmektedir. Etki biçimleri, membran bütünlüğünü bozmaktan hücre ölümüne yol açan organel işlev bozukluğuna kadar uzanmaktadır (Dame et al., 2021). Fengisin grubuna ait lipopeptidler ayrıca membran destabilizasyonu yoluyla hücrelere zarar verebilmekte ve *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Monilinia* gibi patojenlere karşı aktivite gösterebilmektedir (Saxena et al., 2020). *B.subtilis*'in *Podosphaera fusca*'ya karşı antagonistik etkisinde lipopeptidlerin iturin ve fengisin ailelerinin önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Sürfaktin ve fengisin tipi lipopeptitler, ISR'nin (indüklenmiş sistemik direnç) uyarılması yoluyla bağışıklık tepkisini başlatarak bitki hücrelerinde bakteriyel belirleyiciler olarak hareket edebilmektedirler (Dame et al., 2021).

2.5.2. Litik enzimler

Hücre duvarını parçalayan enzimler, toprak kaynaklı patojenleri kontrol etmek için biyokontrol ajanları tarafından kullanılan mekanizmalardan biridir. PGPR'nin biyokontrol suşları tarafından salgılanan β -1,3 glukanaz, kitinaz, kitosanaz, β -glukosidaz, lipaz, selüloz ve proteaz gibi hücre duvarını parçalayan enzimler, fungal patojenlerin hifsel büyümesi üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahiptir (Chang et al., 2009; Radhakrishnan et al., 2017; Shafi et al., 2017a; Tariq et al., 2017; Saxena et al., 2020; Anckaert et al., 2021; Saeed et al., 2021). Bu enzimler, kitin, β -glukanlar, proteinler (Saeed et al., 2021; Soni and Keharia, 2021) ve kitosanlar (Di Francesco et al., 2016) gibi fungal hücre duvarının bileşenlerini parçalama yeteneğine sahiptirler. Hidrolitik enzimler genellikle bitki patojenlerine (Çizelge 2.5) karşı aktiviteden sorumlu ikincil moleküllerdir (Lopes et al., 2018).

Kitinazların fitopatojenik fungusların büyümesini başarılı bir şekilde engellediği gösterilmiştir. Kitinaz üreten *B.thuringiensis* suşlarının *F.oxysporum*, *F.gramineum*, *S.rolfsii*, *Pyricularia grisea* ve *Physalospora piricola* gibi çeşitli fitopatojenik fungusları inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca kitinazlar, *B.thuringiensis*'in insektisidal aktivitesini arttırmak için de kullanılabilir. Glukanazlar, proteazlar ve kitosanazlar gibi diğer hidrolitik enzimler patojenik funguslara, bakterilere, nematodlara, virüslere ve böceklerle zarar vererek

bitkilerdeki zararlı popülasyonlarının kontrol edilmesine yardımcı olmaktadır (Lopes et al., 2018).

Çizelge 2.5. *Bacillus* türleri tarafından üretilen fungal fitopatojenlere karşı biyokontrol aktivitesine sahip enzimler (Dimkiç et al., 2022).

Enzimler	Üretici tür	Kontrol edilen fitopatojenler
Kitinaz	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Botrytis cinerea</i>
	<i>Bacillus</i>	
Kitinaz	<i>thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	<i>Sclerotinia rolfsii</i>
		<i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Fusarium oxysporium</i> ,
Kitinaz	<i>Bacillus</i> sp. BPR7	<i>F.solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i> , <i>Collectotrichum</i> sp.
Kitinaz	<i>Bacillus</i> sp.	<i>R.solani</i> , <i>M.phaseolina</i>
Kitinaz	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Fusarium oxysporium</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
Kitinaz	<i>Bacillus aerius</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
Proteaz	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Fusarium oxysporium</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
Proteaz	<i>Bacillus</i> sp.	<i>R.solani</i> , <i>M.phaseolina</i>

B.subtilis, *B.thuringiensis*, *B.licheniformis*, *B.safensis*, *B.pumilus*, *B.velezensis*, *B.cereus* vb. gibi çok çeşitli *Bacillus* türlerinin kitinaz enzimi ürettiği bilinmektedir (Saxena et al., 2020; Saeed et al., 2021; Soni and Keharia, 2021). Kitinaz ve β -1,3-glukanaz, fungal hücre duvarlarının ana bileşeni olan β -1,4-N-asetilglukozaminin çözünür doğrusal bir polimeri olan kitini parçalayan enzimlerdir (Saeed et al., 2021).

Litik enzimler ayrıca karbon besini elde etmek için cansız organik maddeleri ve bitki kalıntılarını ayrıştırmaktadır. Hidrolitik enzimler, fitopatojenlerin doğrudan parazitlenmesine katkıda bulunmakta ve bitkiyi biyotik streslerden kurtarmaktadırlar (Tariq et al., 2017).

B.pumilus SG2'den *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cinerea*, vb. üzerinde inhibitör etki gösteren etkili bir kitinaz üretildiği gösterilmiştir. *B.licheniformis*'in *Phoma medicaginis*'e karşı antifungal aktivitesi kitinaz üretimine bağlanmaktadır. Benzer şekilde, *B.velezensis* NJZJSB3 tarafından proteaz ve β -1,3-glukanaz üretimi, kanola kök

çürümeye neden olan *Sclerotinia sclerotiorum*'u kontrol etmenin yollarından biri olarak gösterilmektedir. Marul damla hastalığına neden olan *Sclerotinia minör*'ün hifsel dejenerasyonundan ve parçalanmasından yüksek kitinaz, proteaz ve β -1,3-glukanaz aktivitesinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (Saxena et al., 2020). Farklı konukçu bitkiler üzerinde etkili olan *Bacillus* türleri tarafından üretilen litik enzimler Çizelge 2.6'da verilmiştir.

2.5.3. Rekabet

Demir (Fe), hemen hemen tüm yaşam formları için hayati bir besindir. Esas olarak Fe^{+3} iyonu formunda bulunduğu aerobik atmosferde, demiri sadece Fe^{+2} formunda kullanabilen mikroorganizmalar ve bitkiler için kullanılamaz hale getiren hidroksitler ve oksihidroksitler oluşturmaktadır. Bakteriler genellikle, sideroforlar olarak bilinen düşük moleküler ağırlıklı şelatörlerin salgılanmasıyla Fe^{+2} alabilmektedirler (Lobo et al., 2019; Soni and Keharia, 2021). Siderofor üreten bakteriler *Bacillus*, *Pseudomonas*, *PaeniBacillus*, *Rhizobium* ve *Agrobacterium* türlerine aittir (Soni and Keharia, 2021).

Çizelge 2.6. Farklı konukçu bitkilerde etkili bazı *Bacillus* türleri tarafından üretilen litik enzimler (Aloo et al., 2019).

<i>Bacillus</i> türleri	Enzimler	Konukçu bitki
<i>B.subtilis</i>	Kitinazlar	Tütün
	Kitinazlar	Asma
	Proteazlar	Nohut
	Kitinazlar, Glukanazlar, Proteazlar	Nohut
<i>B.circulans</i>	Kitinazlar	Yer fıstığı
<i>B.mycooides</i>	Kitinazlar, Glukanazlar	Şeker pancarı
<i>B.pumilus</i>	Kitinazlar, Glukanazlar	Şeker pancarı
<i>B.thuringiensis</i>	Kitinazlar, Glukanazlar	Şeker pancarı
	Kitinazlar	Soya fasülyesi
	Kitinazlar	Pamuk
<i>B.cereus</i>	Kitinazlar	Sorgum
	Kitinazlar, Proteazlar	Pirinç, Maş fasülyesi, Nohut
	Kitinazlar, Kitosanazlar, Proteazlar	Lahana
	Kitinazlar, Glukanazlar	Yenidünya
<i>B.luciferensis</i>	Proteazlar	Biber
<i>B.licheniformis</i>	Kitinazlar	Lahana

Fe^{+3} iyonu ve bir siderofor, zarda Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgendiği, dış ve iç zarları birbirine bağlayan bir giriş mekanizması yoluyla siderofor tarafından hücreye salınan bir kompleks oluşturmaktadırlar. Bu indirgeme işlemi sırasında, siderofor yok edilmekte veya geri dönüştürülmektedir (Lobo et al., 2019).

Mikroorganizmalar, sideroforları kullanarak demir için beslenme gereksinimlerini karşılamaktadırlar. Çevre ortamda, sideroforlar salındığında demir çözünür ve bir ferrik siderofor kompleksi oluşur ve bu madde difüzyon sürecinden geçerek hücre yüzeyine ulaşır. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin membran reseptörleri, ferrik siderofor kompleksini tanır ve aktif taşımayı başlatır. Sideroforlar, ferrik iyon ile kompleks oluşturma, çözünürlüğünü artırma ve doğal komplekslerden veya minerallerden uzaklaştırılmasını sağlama konusunda büyük afiniteye sahiptir. Çevrede düşük demir iyonlarının mevcudiyeti, patojenlerin büyümesinin azalmasına neden olmakta ve bu da sonuçta patojeni nişten uzak tutmaktadır. Sideroforların üretimi, demir şelasyonu ile fitopatojenlerin çoğalmasını azaltmak ve artan demir alımı ile bitki gelişimini arttırmak için önemli rol oynamaktadır. Ferrik siderofor kompleksi, kadmiyum ve nikel gibi diğer metaller mevcut olduğunda, bitkiler tarafından demir alımı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Demir, hücresel büyüme ve metabolizmada hayati bir rol oynamaktadır, öyle ki siderofor üretimi yoluyla Fe alımı, bakterinin bitki kökleri çevresinde büyümesine ve rizosferde demir için diğer mikroorganizmalarla rekabet etmek için rekabetçi uygunluğuna karar vermede önemli bir faktördür (Tariq et al., 2017).

2.5.4. İndüklenmiş sistemik direnç

İndüklenmiş Sistemik Direnç (ISR), patojen enfeksiyonuyla savaşmak için bitki savunma sistemlerinin bakteriler (esas olarak PGPR) tarafından indüklendiği bir mekanizmadır (Santoyo et al., 2012). Patojenik olmayan rizobakterilerin, indüklenmiş sistemik direnç (ISR) olarak bilinen bir direnç mekanizmasını indükleyerek bitkilerde hastalığı baskıladığı (Çizelge 2.7) bilinmektedir (Saxena et al., 2020; Saeed et al., 2021).

Çizelge 2.7. *Bacillus* türlerinin neden olduğu indüklenmiş sistemik direnç ile kontrol edilen patojenler ve sebep oldukları hastalıklar (Miljaković et al., 2020).

<i>Bacillus</i> türleri	Hedef patojen	Bitki hastalığı
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Gri küf hastalığı
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pirinç kabuğu yanıklığı
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Buğdayda septorya Yaprak lekesi
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	Mısırın başak, sap ve kök çürüklüğü
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Alternaria solani</i> , <i>Phytophthora infestans</i>	Domatesin erken ve geç yanıklığı
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Colletotrichum capsica</i>	Biber antraknozu
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium oxysporium</i>	Soya fasülyesinde kök çürüklüğü ve solgunluğu
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium oxysporium</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	Salatalık kök çürüklüğü
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Plasmopara halstedii</i>	Ayçiçeğinde tüylü küf

Bacillus cinsi söz konusu olduğunda, bitkilerde sistemik direnci indükleyebilen türlerin çeşitliliği oldukça dikkat çekicidir. Bunlardan bazıları, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides* ve *B. sphaericus*'tur. *Bacillus* tarafından bitkide bu tepkinin uyarılmasının faydalı etkisi, bitkiyi funguslar, bakteriler, virüsler ve nematodlar gibi çeşitli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlardan korumaktır. *B. subtilis* tarafından üretilen sürfaktin ve fengisin gibi bazı lipopeptitler de bitkilerde sistemik direnç oluşturabilmektedir. Bitkilerde sistemik direnci indükleyen mekanizmaların incelendiği bazı çalışmalarda, uçucu bileşiklerin de bu tür indüksiyonda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Santoyo et al., 2012).

Sürfaktin, mVOC'ler ve şimdiye kadar tanımlanamayan diğer bileşikler tarafından tetiklenen bitki savunması, fitopatojenlerin rizobakteriler tarafından baskılanmasında ana faktördür. Seçilmiş bitki ile ilişkili *Bacillus* suşları, bitki savunmasını indükleyebilen 2,3-bütandiol ve asetoinden oluşan mVOC'ler yaymaktadırlar (Wu et al., 2015).

Bacillus izolatlarının antagonistik etki göstermesine sebep olan farklı mekanizmalar yukarıda incelenmiştir. Farklı patojenlere karşı *Bacillus* türlerinin antagonistik etki göstermesine sebep olan bu etki mekanizmalarına örnekler ise Çizelge 2.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.8. *Bacillus* türleri tarafından gösterilen antagonistik etki mekanizmaları (Miljaković et al., 2020; Soni and Keharia, 2021).

<i>Bacillus</i> türleri	Hedef patojen	Mekanizmalar
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Fusarium oxysporium</i> , <i>F.avenaceum</i> , <i>Mucor</i> <i>sp.</i>	Bakteriyosinler, sürfaktin, fengisin
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	İturin
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	İturin, sürfaktin/ Sürfaktin, fengisin
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium spp.</i>	Sürfaktin, litik enzimler
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pythium ultimum</i>	İturin, fengisin
<i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Sürfaktin, iturin, fengisin, siderofor
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>	Sürfaktin
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Kitinaz
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Fusarium oxysporium</i> <i>f.sp. lycopersici</i>	Proteaz
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>	Proteaz, glukanaaz,kitinaz, siderofor
<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Proteaz, kitinaz, selülaaz, glukanaaz
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium oxysporium</i> <i>f.sp. capsici</i>	Siderofor
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Litik enzimler, siderofor
<i>Bacillus velezensis</i> OEE1	<i>Verticillium dahlia</i>	Antibiyozis
<i>Bacillus velezensis</i> BM21	<i>Fusarium graminearum</i>	Antibiyozis
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> VB7	<i>Botrytis cinerea</i>	Antibiyozis, indüklenmiş sistemik direnç
<i>Bacillus toyonensis</i> COPE52	<i>Botrytis cinerea</i>	Antibiyozis, indüklenmiş sistemik direnç, litik enzimler

Çizelge 2.8. (devam)

Bacillus türleri	Hedef patojen	Mekanizmalar
<i>Bacillus subtilis</i> TE3	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Antibiyozis
<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Verticillium dahlia</i>	Antibiyozis, indüklenmiş sistemik direnç, litik enzimler
<i>Bacillus mojavensis</i> PB-35	<i>Rhizoctonia solani</i>	Antibiyozis, indüklenmiş sistemik direnç, litik enzimler
<i>Bacillus licheniformis</i> GL174	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Phytophthora infestans</i>	Antibiyozis, litik enzimler
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Fusarium spp.</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Colletotrichum capsici</i>	Antibiyozis
<i>Bacillus sp.</i> SI-5	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium oxysporium</i>	Antibiyozis, indüklenmiş sistemik direnç
<i>Bacillus subtilis</i> BN1	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Antibiyozis, litik enzimler

2.6. *Bacillus* Türlerinin Sıvı Kültür Fermentasyonu ile Üretimi

Fermentasyon, çoğu durumda belirli ortamlar ve sıcaklık, pH, havalandırma ve gerekirse ek besleme gibi kontrol edilebilen proses parametreleri kullanılarak mikroorganizmaların toplu olarak geliştirilmesidir. Batık fermentasyon prosesinde, mikrobiyal hücreler, besiyeri bileşenleri kullanılarak ve spesifik metabolitleri serbest bırakarak, çalkalama/havalandırma altında sıvı ortam içeren biyoreaktörde homojen bir şekilde büyütülmektedir. Batık fermentasyon prosesleri, bitkiye faydalı özelliklere sahip spesifik metabolitlerin üretilmesi için yüksek hücre/spor yoğunluğuna ve/veya yüksek metabolik aktiviteye göre optimize edilmelidir. Bitkilere faydalı belirli bir mikroorganizma tarafından yüksek biyokütle ve metabolit üretimine ulaşmanın ilk adımlarından biri, besiyeri bileşimini optimize etmektir (Vassileva et al., 2021).

Mikroorganizmaların batık kültürde kütlece çoğaltılması, çeşitli besiyerleri kullanılarak kesikli (batch), kesikli beslemeli (fed-batch) veya sürekli (continuous) kültür yöntemleri uygulanarak gerçekleştirilmektedir. Sürekli fermentasyon, deneysel bir prosedür olarak kabul edilmekte ve endüstriyel ölçekte nadiren kullanılmaktadır. Kesikli fermentasyonlar biyoreaktörün kolay kurulumu ve kontrolü sebebiyle en yaygın olarak kullanılan üretim şeklidir. Kesikli beslemeli

bir fermentasyon işleminin uygulanması durumunda, şunları gerçekleştirmek mümkündür: darbeli besleme ile kesikli beslemeli fermentasyon, üstel besleme ile kesikli beslemeli fermentasyon ve doğrusal besleme ile kesikli beslemeli fermentasyon. Kesikli beslemeli prosesler sırasında besin maddelerinin eklenmesi, ekponansiyel ve durağan fazı uzatmaktadır ve böylece daha yüksek biyokütle konsantrasyonu elde edilmektedir. Birçok çalışmada, kesikli beslemeli fermentasyonun daha iyi sonuçlara yol açabileceği ve istenen ürünlerin daha yüksek verimlerde üretilebileceği gösterilmiştir. Yine de bu süreç, daha yüksek üretim maliyetlerine yol açabilecek çok daha fazla dikkat, kesintisiz kontrol ve izleme gerektirdiği için yaygın olarak kullanılmamaktadır. İstenen büyümeyi elde etmek için gerekli fermentasyon koşullarının, yani besiyeri bileşimi, sıcaklık, pH değeri, karıştırma hızı ve oksijen konsantrasyonu gibi parametrelerin sağlanması gerekmektedir (Stamenković et al., 2018).

Toprak mikroorganizmaları incelenirken normalde iyi bilinen sentetik besiyerleri kullanılmaktadır ancak bunlar ile her zaman en iyi sonuçlar alınamamaktadır. Özellikle büyük hacimlerde biyokütle üretimi ve spesifik metabolit üretiminde, istenilen profile sahip mikroorganizmaların seçimi için kullanılan besiyerlerinin kullanılmaması önerilmektedir. Ortam bileşenlerinin her biri büyümeyi, sporlanmayı ve metabolit üretim aktivitesini etkilemektedir. Karbon ve azot kaynakları, üretim hacmi ile substrat fiyatı ve bulunabilirliği göz önüne alınarak maliyet ve bulunabilirliğine göre seçilmelidir. Kısa fermentasyon proseslerinin geliştirilmesi, ucuz ve ulaşılabilir C ve N kaynaklarının belirlenmesi, bitkiye faydalı mikroorganizmaların ticarileştirilmesini sınırlayan ana faktör olarak kabul edilen yüksek üretim maliyetini azaltacaktır (Vassileva et al., 2021).

Yalnızca yüksek biyokütle elde etmek için değil, aynı zamanda sideroforlar, indol asetik asit ve antibiyotikler gibi bitkiye faydalı biyoaktif bileşiklerin üretimini arttırmak için de optimize edilmiş besiyeri kullanmaktır. Besiyeri optimizasyonu ve fermentasyon proses parametreleri (pH, sıcaklık, hava besleme ve çalkalama) sonrasında elde edilen bu tür son fermentasyon ürünleri, biyokütle ve yüksek spor sayıları bakımından zenginken aynı zamanda bitki büyümesi ve sağlığı için önemli metabolitler bakımından da zengindir ve bitkiler üzerinde çift etki gösterecek şekilde doğrudan uygulanabilmektedirler (Vassileva et al., 2021).

Mikrobiyal kültürasyonun amacı, kolayca bir formülasyona dahil edilebilen, istenen hücre yoğunluğuna ve yüksek sporülasyon verimliliğine sahip kaliteli biyokütle üretmektir. Deneme çalışmaları, fermentasyon koşullarının

optimizasyonu sürecindeki ilk aşamadır. Mikroorganizma ve gereksinimleri hakkında değerli veriler çok daha düşük maliyetlerle elde edilebildiğinden erlen denemeleri bu amaç için uygundur. Bu aşamadan sonra, süreç kademeli olarak daha büyük hacimli biyoreaktörlere ölçeklendirilmektedir. Bunların birçoğu arasında en yaygın olarak kullanılanları mekanik karıştırılmalı biyoreaktörlerdir. Kültivasyon sürecinin optimizasyonu, birçok farklı faktörün ayarlanmasını gerektirmektedir ve mikrobiyal kültüre göre değişmektedir. Mikrobiyal kültür seçilip karakterize ettikten sonra, fermentasyon tipi, üretim ortamı ve büyüme koşulları da seçilmeli ve optimize edilmelidir (Stamenković-Stojanović et al., 2019).

Çok sayıda biyolojik kontrol ajanı keşfedilmiş olmasına rağmen, ticari olarak kullanılabilenlerin sayısı çok azdır. Biyolojik kontrol ajanlarının tarımda kullanılan toplam pestisitlerin içindeki payı, formülasyon ve fermentasyon proseslerinde meydana gelebilecek komplikasyonlar sebebiyle %5'ten azdır. Düşük verim ve yüksek üretim maliyeti, biyolojik kontrol ajanlarının geliştirilmesi, ticarileştirilmesi ve uygulanması için başlıca sınırlayıcı faktörlerdir. Bu nedenle, fermentasyon ortamının optimizasyonu, bu sınırlamaların üstesinden gelmek için çok önemlidir. Etkili fermentasyon, hücre yoğunluğunu ve ilgilenilen ürün verimini arttırmak için bakterinin biyolojik kontrol ajanı olarak endüstriyel kullanımı için önemli bir adımdır (Shafi et al., 2018).

2.7. *Bacillus* Türlerinin Sıvı Kültür Fermentasyonu ile Üretimini Etkileyen Faktörler

2.7.1. Fermentasyon tipi

Endüstriyel fermentasyon proseslerinde ham maddeleri endüstriyel ürünlere dönüştürmek için çeşitli mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Genelde fermentasyon prosesleri kesikli/ kesikli beslemeli ve sürekli/yarı sürekli prosesler olmak üzere iki çeşide ayrılmaktadır. Kesikli/ kesikli beslemeli proseslerde, bir aşı kültürü, substrat içeren besiyerine inoküle edilmektedir ve uygun koşullar altında ek besinler eklenerek ya da eklenmeden hücre büyümesi kısa bir süre boyunca gerçekleştirmektedir. İstenilen ürünler, kültürasyon süresi sonunda hasat edilmektedir. Buna karşılık, sürekli fermentasyonda, substratlar istenilen bir oranda fermentörlere sürekli olarak beslenmektedir ve son ürünler de sürekli olarak hasat edilmektedir. Günümüzde, çoğu endüstriyel fermentasyon teknolojisi, kesikli/ kesikli beslemeli proseslere dayanmaktadır (Li et al., 2014).

Sıvı (batık) ve katı kültür fermentasyon prosesleri, ticari ürünlere formüle edilecek mikrobiyal biyokütle veya sporlar elde etmek için kullanılan temel biyoteknolojik tekniklerdir. Bitkiye faydalı mikroorganizmaların kültivasyon amacı, biyokütle, sporlar ve nihayetinde bitki uyarıcı veya biyokontrol metabolitleri içeren fermentasyon sıvısına dayalı formüle edilmiş ticari ürünler hazırlamaktır. Bitkiye faydalı mikroorganizmalardan mikrobiyal biyokütle ve sporlar, hem batık hem de katı kültür fermentasyonları ile üretilebildiğinden fermentasyon modunun seçimi, deneysel olarak belirlenebilmektedir. İster tek bir kesikli üretim ister kesikli beslemeli üretim olsun batık kültür, endüstriyel ölçekte biyokütle, sporlar ve metabolitlerin üretimi için en etkili ve kabul edilen yöntemdir. Öte yandan, katı kültür, çeşitli metabolik ürünler, önemli miktarda biyokütle ve spor üretimi için nispeten iyi bilinen bir fermentasyon teknolojisidir (Vassileva et al., 2021).

Kesikli beslemeli fermentasyon prosesi, substrat konsantrasyonu minimuma düştüğünde belirli bir tüketim oranını sağlamak için substratın aralıklı olarak beslenmesini veya DO bazlı ve pH bazlı beslemeyi içermektedir. Bitkiler için faydalı mikrobiyal üretimlerde, kesikli beslemeli fermentasyon, yeterince yüksek biyokütle veya yüksek konsantrasyonda fito-uyarıcı metabolitlere ulaşmak için etkili bir yöntemdir. Halihazırda endüstri tarafından yaygın olarak kullanılan bir kesikli kültür yöntemiyle karşılaştırıldığında, geliştirilen kesikli beslemeli kültür yöntemi ile üretilen mikroorganizma için yaklaşık 20 kat daha yüksek canlı hücre sayısı elde edilmektedir veya bir kesikli beslemeli çevrimin, 20 kesikli üretime eşit olduğu söylenebilmektedir (Vassileva et al., 2021). Kesikli üretim, sürekli izleme ve daha yüksek harcama gerektiren ancak aynı zamanda daha iyi sonuçlar sağlayan kesikli beslemeli ile karşılaştırıldığında popülaritesini basitliğine ve nispeten kolay uygulanmasına borçludur (Stamenković-Stojanović et al., 2019).

2.7.2. Besiyeri bileşenleri

Mikrobiyal büyüme ve çoğalma için kullanılan besiyerinin ucuz ve kolay erişilebilir olması ve gerekli besinleri içermesi gerekmektedir. Ayrıca, fermentasyon için kullanılan besiyerinin steril olması gerekmektedir. Sterilizasyon işlemi sırasındaki yüksek sıcaklıklar, ortamın içeriğini ve fermentasyonun sonucunu değiştirebilen bazı termo-bozunur bileşikleri etkileyebilmektedir. Bunun olmasını önlemek ve istenen kaliteyi sağlamak için tüm süreç boyunca sürekli izleme gerekmektedir. Yaygın olarak kullanılan substratlardan bazıları,

glikoz, sakkaroz (karbon kaynağı olarak) ve amonyum sülfattır (azot kaynağı olarak) (Stamenković et al., 2018).

Karbon, mikroorganizmalar için bir enerji kaynağı olduğundan büyümede de önemli bir rol oynamaktadır ve aynı zamanda birincil ve ikincil metabolit üretimi için de en önemli besiyeri bileşenidir. Karbon kaynağının metabolize olma hızı, çoğu zaman biyokütle oluşumunu ve/veya birincil veya ikincil metabolitlerin üretimini etkileyebilmektedir. Deniz bakterilerinden antibiyotik üretimi üzerine yapılan bir çalışmada, galaktoz gibi kademeli olarak kullanılan karbon kaynaklarının genellikle ikincil metabolitlerin (antibiyotikler) üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Ürün maliyetinin önemli bir kısmını hammadde/besiyeri bileşenlerinin oluşturduğu fermentasyon prosesleri için seçimlerin yapılması üretim firmaları için oldukça önemlidir. Karbon kaynaklarının asimilasyon hızına ek olarak, karbon kaynağının doğası da ürünün cinsini ve miktarını etkilemektedir. Bunun bir örneği, hammaddelerin üretim maliyetinin %60-77'sini oluşturduğu etanol veya tek hücre protein üretimidir ve ürünün satış fiyatı büyük ölçüde karbon kaynağının maliyetine göre belirlenmektedir (Singh et al., 2017).

Glikoz, sakkaroz, laktoz ve diğer basit şekerler mikroorganizmalar tarafından kolayca kullanılmaktadır ancak tarımsal endüstriyel atıklara dayalı ekonomik olarak çekici diğer besiyerleri de endüstriyel üretimlerde kullanılabilir. Peynir altı suyu, malt filizleri ve melas içeren besiyeri, formülasyon aşamasında eklenen hücre koruyucuların da etkisiyle birlikte büyük ölçekli üretim koşullarında yüksek uygunluk göstermektedir. Gliserol, biyodizel üretiminden elde edilen yan ürün olması sebebiyle bol miktarda olması ve hücre koruma özellikleri nedeniyle potansiyel bir substrat olarak kullanılmaktadır (Vassileva et al., 2021).

Karbon gibi, azot kaynağının seçimi ve besiyerindeki konsantrasyonu da metabolit üretiminde çok önemli rol oynamaktadır. Mikroorganizmalar inorganik ve/veya organik azot kaynaklarını kullanabilmektedir. Spesifik amino asitlerin kullanımı bazı durumlarda verimliliği artırabilmekteyken uygun olmayan amino asitler ise sekonder metabolitlerin sentezini engelleyebilmektedir. Metabolitlerin verimliliğini artırmak için (örneğin, antibiyotikler vb.), beslenme gereksinimlerinin suştan suşa göre değiştiği gösterilmiştir. Mevcut besinlerin miktarı ve kalitesi ve başarılı bir şekilde özümsebilmesi, mikrobiyal yapının ve metabolik aktivitesinin temel belirleyicileridir. Bu nedenle, besiyeri optimizasyonu sırasında, maksimum metabolit(ler) üretimi elde etmek için

mikroorganizmanın minimum büyüme gereksiniminin karşılanması gerektiği düşünülmektedir (Singh et al., 2017).

Bunun yanı sıra, bakterilerin çoğu büyümek için bazı iz elementlerin ve vitaminlerin varlığını gerektirmektedir. Örneğin, *B.subtilis* suşunda sporülasyonu başlatmak için tiamin gerekirken, kalsiyum ilavesi sporülasyon sürecini attırmaktadır (Stamenkoviç et al., 2018). Kalsiyum, spordaki dipikolinik aside bağlanan ve DNA'yı çevreden korumak için sporu sertleştiren bir bakteriyel spor bileşenidir. Dipikolinik asit serbest su moleküllerine bağlanmakta ve böylece sporların dehidrasyonuna neden olmaktadır. Besiyerine bakteriyel sporları etkileyen kalsiyum dışındaki katyonlar (demir ve manganez) eklendikten sonra sporülasyon incelenmiştir. Manganez ve demirin sporlara kalsiyumdan 180 kat daha az ısı direnci sağladığı bildirilmiştir. Manganez ve demirin bakteriyel sporlanmayı teşvik ettiği ancak sporların ana bileşenleri olmadığı bilinmektedir. Sporların iyon içeriği esas olarak kalsiyumdur, ancak kalsiyumdan daha az da olsa manganez ve demir de mevcuttur. Besiyerindeki kalsiyum iyonlarının seviyesinin, vejetatif hücreler büyüdükçe kademeli olarak azaldığı ve sporlardaki kalsiyum seviyesinin ise manganez ve demir seviyelerinden daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu da, kalsiyumun ana spor bileşeni olduğunu doğrulamaktadır (Ryu et al., 2020).

Hücre canlılığı söz konusu olduğunda, farklı bileşiklerin (polivinilpirolidon veya karboksimetil selüloz) eklenmesinin de oldukça verimli olduğu kanıtlanmıştır. Birçok durumda, fermentasyon sıvısında hücre parçalanması ve hücre sayısında meydana gelen azalmanın bahsi geçen maddelerin eklenmesiyle önlenbildiği bilinmektedir. Bu nedenle birçok araştırmacı, belirli maddelerin oranını ayarlamalarına ve istenen mikroorganizmalarla en iyi sonucu elde etmelerine olanak tanıyan kimyasal olarak tanımlanmış bir besiyeri kullanmayı tercih etmektedir (Stamenkoviç et al., 2018).

2.7.3. Üretim parametreleri

Fermentasyon modundan (batık veya katı kültür) veya hücre durumundan (serbest veya immobilize) bağımsız olarak, başlangıç pH değeri, karıştırma hızı, havalandırma hacmi, inokülasyon konsantrasyonu ve katı kültür fermentasyonunda başlangıç nem değeri ve nemlendirici ajanın türü optimize edilerek proses verimliliği iyileştirilebilmektedir. Farklı fermentasyon parametrelerinin biyokütle birikimi ve depolama sırasında biyoförmülasyonlarda

hücrelerin hayatta kalması üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi, stabil ticari ürünlerin geliştirilmesi için esastır. Optimizasyon çalışmaları, fermentasyon modundan (katı, sıvı, serbest/immobilize hücreler, vb.) bağımsız şekilde kontrollü koşullarda eşzamanlı olarak veya bir seferde tek parametrenin (değişkenin) etkisinin analiz edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Vassileva et al., 2021).

Besiyerinin başlangıç pH değeri, mikrobiyal büyümeyi etkileyen inokülümün adaptasyonu ve daha sonra metabolik aktivitesi ve enzimlerin, antibiyotiklerin, organik asitlerin ve fitohormonların üretimi ve biyokontrol potansiyeli için önemlidir. Mikrobiyal büyüme için pH değeri, hücre yüzeyini etkilemesi ve besin emilimini artırması sebebiyle önem kazanmaktadır. Çoğu mikroorganizmanın, optimal biyokütle üretimi için 4,5 ve 6,5 aralığında hafif asidik ve nötr pH'ı tercih ettiği bilinmektedir (Vassileva et al., 2021).

Sıcaklık bir diğer önemli fermentasyon proses parametresidir. Yüksek veya düşük sıcaklığa duyarlı veya ikisine de duyarlı olmayan bitkilere faydalı mikroorganizmalar bulunmaktadır. Ancak genel olarak, yüksek sıcaklıklar biyokütle büyümesini kolaylaştırmaktadır. Toprak mikrobiyal topluluğunun bileşimi iklim değişikliği ve donma-çözülme döngülerinden etkilendiğinden, sıcaklığın etkisinin daha ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiği öne sürülmektedir (Vassileva et al., 2021).

Bitkiye faydalı mikroorganizmaların biyokütle/spor üretimine yönelik proseslerinin çoğu aerobik fermentasyonlara dayanmaktadır. Batık fermentasyonlarda özellikle önemli olan çözünmüş oksijendir, çünkü bu, metabolik aktiviteyi ve nihai ürün tipini doğrudan etkileyen başarılı mikrobiyal büyüme için gerekli olan temel parametredir. Laboratuvar koşullarında, çözünmüş oksijen seviyesi çalkalayıcı hızı ile manipüle edilebilirken, biyoreaktörler kullanılırken ortam içinde çözünen oksijen, hava akışı veya karıştırıcı hızı değiştirilerek kontrol edilebilmektedir. Akış çarklarının farklı konfigürasyonlarının kullanılması, çözünmüş oksijen seviyesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca ürün oluşumunu iyileştiren hücre morfolojisi, kütle transferi, besiyeri viskozitesi ve reolojisini de etkilemektedir (Vassileva et al., 2021).

Pek çok farklı yönden her fermentasyon sürecinde karıştırma çok önemlidir. Etkili karıştırma prosesi hızlandırmakta, kütle transferini arttırmakta ve hidrolik bekletme süresini azaltmaktadır. Karıştırma ayrıca termal tabakalaşmayı önlemek,

istenen pH değerlerini korumak, substrat ile mikrobiyal kültür arasındaki teması artırmak, köpürmeyi önlemek ve substrat ile mikroorganizmaların homojen dağılımını sağlamak için gereklidir. Bunun yanı sıra, iyi karıştırma, biyoreaktörün zayıf karıştırma ile karakterize edilen alanlarında toksik metabolitlerin birikmesini önlemektedir. Başarılı karıştırma, daha küçük boyutlu biyoreaktörlerde kolayca gerçekleştirilebilir, ancak fermentasyonun kapsamı arttığında ana sorunu temsil etmektedir. Sonuçlar biyoreaktör hacmine bağlı olarak değişebileceğinden, büyük ölçekli işlemler ek araştırmalar gerektirmektedir. Yeterli karıştırma aynı zamanda reaktördeki oksijen konsantrasyonunun etkin kontrolünü de sağlamaktadır (Stamenković et al., 2018).

2.8. *Bacillus* Türleri ile Üretim Optimizasyonu

Fermentasyon, optimizasyonu sıkıcı bir süreç olan çok değişkenli bir prosestir. Proses optimizasyonunun temel amaçları, uygun tekniklerin kullanımıyla miktar ve kaliteyi en üst düzeye çıkararak maliyet ve geliştirme süresini en aza indirmektir. Kritik faktörlerin seçimi başlangıçta yapılmakta ve önemli olduğu kanıtlananlar daha sonra uygun tekniklerle optimize edilmektedir (Shafi et al., 2017b). Proses optimizasyonu, üretim oranlarının ve ürün verimlerinin iyileştirilmesine, ayrıca bunları yöneten proses koşullarına ve operasyonel stratejilere odaklanmaktadır (Rangarajan and Clarke, 2015). Besiyeri tasarımı ve optimizasyonu sırasında, üretim ortamının verimliliğini artırmak için sıklıkla kullanılan çeşitli stratejiler bulunmaktadır (Singh et al., 2017).

Klasik besiyeri optimizasyonu tekniğinde, bir seferde tek faktör (OFAT) deneylerinde, diğer değişkenler sabit tutulurken bir seferde yalnızca bir faktör veya değişken değiştirilmektedir. Seçilen besiyeri bileşenlerinin konsantrasyonları daha sonra istenen bir aralıkta değiştirilmektedir. OFAT, kolaylığı ve rahatlığı nedeniyle, besiyeri bileşenlerinin tasarlanmasında araştırmacılar arasında en çok tercih edilen seçenek olup çeşitli alanlarda ilk aşamalarda kullanılmaktadır. Bu metodoloji, yeni kaynaktan yeni metabolit veya bilinen bileşik üretimi için besiyeri formülasyonunun ilk aşamalarında günümüzde hala kullanılmaktadır. Diğer herhangi bir teknik gibi, OFAT ile besiyeri optimizasyon yönteminin de avantajları ve dezavantajları vardır. OFAT'ın en büyük avantajı basitliğidir. Bir dizi deney gerçekleştirildikten sonra sonuçlar üst düzey istatistiksel analiz/programların yardımı olmadan basit grafikler kullanılarak analiz edilebilmektedir. OFAT'ın en büyük dezavantajı, deneyler rastgele bir dağılım dizisi olduğu için deneylerden etkileşimleri tahmin etmedeki zorluktur. Çok

sayıda değişkenin analizinde harcanan zaman ve analizlerin maliyeti OFAT tekniklerinin başlıca dezavantajları olarak tanımlanmıştır. Bu metodolojide bazen optimum nokta tamamen gözden kaçırılabilir, bu nedenle optimum seviyenin belirlenmesi için çoğu zaman zahmetli, zaman alıcı ve ekonomik olmayan çok sayıda deney yapılması gerekmektedir. Bununla birlikte, OFAT tekniği, besiyeri hakkında hiçbir şey bilinmediğinde kolaylığı ve uygunluğu nedeniyle en iyi tarama aracıdır (Singh et al., 2017). Diğerlerini sabit tutarken tek bir faktörün etkisinin araştırılmasına dayanan bu deneysel tasarım, ilgili tüm faktörlerin etkileşimli etkilerini gösterememektedir (Shafi et al., 2017b). Dahası, bunlar zaman alıcıdır, maliyetlidir ve optimum değerleri bulmak için birden fazla deneme gerektirmektedir (Kumar et al., 2015; Shafi et al., 2017b).

Fermentasyon prosesinde besiyeri optimizasyonu için istatistiksel yöntemin, yani deney tasarımının (DOE) kullanılması, klasik OFAT yönteminin sınırlamalarının üstesinden gelmekte ve metabolit üretiminin optimizasyonu için güçlü bir alternatif olarak görülmektedir. Bir seferde ortamdaki birden fazla bileşeni değiştirmenin, her seferinde yalnızca bir faktörü değiştirmekten daha verimli olabileceğini gösteren temel bir deneysel tasarım teorisi öne sürülmüştür. DOE, bir seferde birden fazla parametrenin çıktısı, yani ürün verimi üzerindeki etkisi hakkında daha büyük miktarda bilgi, elde etmek için stratejik olarak planlanan ve yürütülen bir dizi deneydir. Çoğu DOE prosedürü, sınırlı sayıda deneyde 2-10 besiyeri faktörünün ön taramasına izin vermektedir. Bu yöntemde, birkaç besiyeri faktörü veya bileşeni aynı anda karşılaştırılıp etkiler gözlemlenir ve sonuçlara göre sıralanır. Yanıt değişkenleri belirlenerek sonraki analizden istatistiksel performans parametreleri oluşturulmaktadır. Daha fazla sayıda deney gerektirmesi nedeniyle OFAT zahmetli, zaman alıcı bir süreçtir ve çok sayıda değişken için son derece sıkıcıdır, oysa DOE aynı miktarda bilgiyi elde etmek için daha az deney, daha az zaman ve daha az malzeme gerektirmektedir. Faktörler arasındaki etkileşim DOE'de sistematik olarak tahmin edilebilmektedir. Literatürden veya klasik deneylerden fermentasyon üretim süreci hakkında temel fikir edinildikten sonra, deneylerin tasarlanması, iki veya daha fazla faktörün bir yanıt üzerindeki etkisini belirlemede OFAT'a göre daha etkilidir (Singh et al., 2017).

Tek faktörlü optimizasyonun çeşitli dezavantajları olmasının yanı sıra, hedef ürünün etkin ve verimli üretimi için en uygun koşulların belirlenmesini neredeyse hiç garanti etmemektedir. Bir seferde tek faktör yaklaşımının bu sınırlamaları, yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM) ve yapay sinir ağı (ANN) gibi alternatif

istatistiksel yaklaşımlar kullanılarak aşılabilmektedir. RSM, modeller oluşturmak, deneyler tasarlamak, faktörlerin etkilerini değerlendirmek ve en uygun koşulları aramak için bir grup istatistik tabanlı yaklaşımı kapsamaktadır. Birkaç faktörün eşzamanlı optimizasyonuna izin veren tasarlanmış bir deneysel prosedürdür (Kumar et al., 2015; Shafi et al., 2018). RSM, bir veya iki bağımlı değişken ile bir dizi bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi bulmamıza yardımcı olan faktöriyel bir tasarımıdır (Shafi et al., 2017b). RSM'deki deneysel tepkiler, ikinci dereceden bir fonksiyona uymaktadır. RSM'nin başarılı bir şekilde uygulandığı birçok çalışmada fermentasyon sistemi için en iyi seçimin RSM olduğu önerilmektedir (Shafi et al., 2018). RSM, çok faktörlü deneyler için uygundur ve daha az deneme gerektirmektedir ve herhangi bir süreç için en uygun koşulların belirlenmesi ve yanıtların tahmin edilmesi için çok yararlıdır (Shafi et al., 2017b). RSM kullanmanın temel avantajı, yazılım tarafından oluşturulan yanıt yüzey grafikleri yardımıyla çalışılan değişkenlerin etkileşim etkisini değerlendirmektir. (Kumar et al., 2015).

Box-Behnken Tasarımı (BBD), Box ve Behnken tarafından geliştirilen ve deneysel bir bölgedeki yanıt yüzeyinin doğasını belirlemek için uygulanan üç seviyeli kesirli faktöriyel tasarımıdır. Tasarım, tamamlanmamış bir blok tasarımı ile iki seviyeli faktöriyel tasarımın bir kombinasyonudur ve her blokta, tasarım için belirli sayıda faktör tüm kombinasyonlarda konurken, diğer faktörler merkezi seviyelerde tutulur. Bu tasarımın -1 (düşük), 0 (orta) ve +1 (yüksek) olarak kodlanabilen üç seviyeye sahip olması, bağımsız bir ikinci dereceden tasarım oluşturması ve sonuçları düzenlemenin ve yorumlamanın daha kolay bir yolunu sağlaması gibi birçok avantajı vardır. Box-Behnken tasarımı ayrıca daha az faktör seviyesine sahip olduğu ve aşırı yüksek veya düşük seviyeler içermediği için Central Composite Design (CCD)'a göre daha az zaman alan ve ekonomik bir alternatif olarak görülmektedir. BBD, deney setlerinin sayısını azalttığı için biyomühendislik süreçlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Keskin Gündoğdu et al., 2016). BBD'nin OFAT deneysel yöntemlerinden daha az çalışma gerektirmesi gibi önemli bir avantajı vardır. Bu tasarım, biyomühendislik uygulamalarında ikinci dereceden modellere uyması için yeterli veri sağlamaktadır. BBD yöntemi, CCD'lere alternatif bir yol sunmaktadır. Üç seviyeli tamamlanmamış faktöriyel tasarımlara dayanan döndürülebilir veya neredeyse döndürülebilir ikinci dereceden tasarımların bir sınıfıdır. BBD'nin CCD'lere göre iki ana avantajı bulunmaktadır: (i) birincisi, yalnızca faktörlerin üç düzeyde değiştirilmesini gerektirmeleridir. Deneyde gerçek prototipler ayarlanıyorsa, bu deney maliyetini azaltabilmektedir. (ii) İkincisi, genellikle (beş faktörlü durum

hariç) CCD'den daha az toplam çalışma gerektirmeleridir (Keskin Gündoğdu et al., 2016).

2.9. *Bacillus* Türlerinin Ticarileştirilmesi

Fungisitler tarımda kullanılan toplam kimyasalların %15'ini oluşturmaktadır. Bitki hastalıkları yönetiminde biyolojik kontrol ürünlerinin sayısı artmasına rağmen, bu ürünler hala tarımsal kontrol önlemlerinin sadece %1'ini temsil etmektedir (Junaid et al., 2013). Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriyel suşların başarısı ve ticarileştirilmesi, bilimsel organizasyonlar vesanayi arasındaki bağlantılara bağlıdır (Gupta et al., 2015). Son yıllarda birçok küçük ve büyük girişimci, çeşitli biyokontrol ürünlerinin dünya pazarına girmesiyle sonuçlanan biyokontrol ajanlarının ticari olarak üretimine başlamıştır. Biyokontrol ürünlerinin ticarileştirilmesi, çeşitli faaliyetleri içeren çok aşamalı bir süreçtir: a) Mikroorganizmanın doğal ekosistemden izole edilmesi. b) Biyolojik mücadele etmeninin hem in vitro hem de sera koşullarında değerlendirilmesi c) En iyi izolatin saha koşullarında test edilmesi d) Kitlesel üretim e) Formülasyon f) Teslimat g) Uyumluluk h) Tescil ve piyasaya sunma (Junaid et al., 2013).

Biyolojik ajanların kaydında iki önemli faktör toksisite ve çevresel akıbetir. Herhangi bir biyopestisit tescili için gerekli bilgiler şunlardır: Biyokontrol ajanının sistemik adı ve genel adı, doğal oluşumu, biyokontrol ajanının morfolojik özellikleri, üretim süreci, memeli toksisitesi, çevresel toksisite ve kalıntı analizi (Junaid et al., 2013).

Mikrobiyal temelli ürünlerin pazarlanması ve ticarileştirilmesi, pazar talebine, tutarlılığa, geniş spektrumlu etkiye, taşıyıcı materyallerinin kolay bulunabilirliğine, uzun raf ömrüne, çevre güvenliğine, düşük sermaye maliyetine, çevre dostu davranışa ve endüstriler ile araştırma kanadı arasındaki güçlü ilişkiye dayanmaktadır (Gupta et al., 2015; Mushtaq, 2021). PGPR'nin pazarlanmasını sınırlayan en önemli faktörlerden bazıları şunlardır: 1. Mikrobiyal ürünlerin özgünlüğü 2. Ürün oluşumu için mikrobiyal seçim 3. Çiftçi psikolojisi 4. Stabilitate sorunu 5. İklim koşulları 6. Kalifiye işgücü eksikliği 7. Düzenleyici kurumlar (Mushtaq, 2021).

Biyopestisitler, kimyasal pestisitlere olan aşırı bağımlılığı azaltarak bunların yerini alacak ve böylece gelecekte daha da artacak olan küresel pazar tüketim ihtiyaçlarına gözle görülür bir şekilde katkıda bulunacaktır. Biyopestisitler,

AB'de, mevcut mevzuata birkaç yeni hükmün eklenmesini gerektiren sentetik aktif maddelerin değerlendirilmesi için kullanılan yönetmeliklerle değerlendirilmektedir ve yeni kılavuzların hazırlanması olası biyopestisit ürünlerinin kaydını kolaylaştıracaktır. AB'de kayıtlı biyopestisitlerin aktif maddesinin ABD, Hindistan, Brezilya veya Çin'dekinden daha az olduğu bilinmektedir. Biyopestisit kullanımının 2050'lerin başında sentetiklerle aynı seviyede olması beklenmektedir, ancak özellikle Afrika ve Güneydoğu Asya gibi bölgelerde alım oranlarına ilişkin büyük belirsizlikler bu tür tahminlerde esneklik oluşturmaktadır (Kumar et al., 2021).

Biyolojik hastalık kontrolünün ticari olarak kullanımı ve uygulanması, sahada farklı çevresel koşullar altında değişken performans göstermeleri sebebiyle yavaş ilerlemektedir. Birçok biyokontrol ajanı laboratuvar ve sera koşullarında çok iyi performans gösterse bile sahada uygulandıklarında başarısız olabilmektedir. Bu sorun, sadece biyokontrol ajanlarını etkileyen çevresel parametrelerin daha iyi anlaşılması yoluyla çözülebilmektedir. Ayrıca, bu ürünlerin geliştirilmesi, test edilmesi, tescil ettirilmesi ve pazarlanması için gerekli maliyetin yüksek olması sebebiyle biyokontrol mikroorganizmalarının ticari formülasyonlarının geliştirilmesi ve üretilmesi ile ilgili yatırım oldukça azdır. Günümüzde, fungal bitki hastalıklarının kontrolü için birkaç biyolojik temelli ürün satılmaktadır. Artan sayıda şirket tarafından tescil aşamasında olan yeni ürünler geliştirilmiştir. Bu şirketlerin çoğu küçük ve sınırlı ürün yelpazesine sahip olan firmalardır. Diğerleri ise halka açık olarak işlem görür ve önemli kapitalizasyon değerlerine sahiptir. Ek olarak, çeşitli tarımsal kimyasalları ve biyoteknolojik ürünleri içeren çeşitli ürün hatlarına sahip olan büyük şirketler, bitki patojenlerinin kontrolü için ürünlerin geliştirilmesi ve pazarlanmasında önemli rol oynamaktadırlar. Biyokontrol ürünleri ya tek başına ürünler olarak pazarlanmakta ya da diğer mikrobiyallerle karışımlar halinde formüle edilmektedir. Biyokontrol özelliklerine sahip bazı ürünler tescilli olmayabilir, bunun yerine hastalık kontrolü ile ilgili herhangi bir spesifik iddia olmaksızın bitki güçlendiricileri veya büyüme destekleyicileri olarak satılmaktadır. Biyopestisitlerin etkili ürünler olarak küresel pazardaki algısını iyileştirmeye yardımcı olmak için, Biyopestisit Endüstri Birliği (Biopesticide Industry Alliance) etkinlik, kalite ve tutarlılık için endüstri standartlarını sağlamak amacıyla bir sertifikasyon süreci oluşturmaktadır. Biyolojik hastalık kontrolünün ticari kullanımını ve uygulamasını geliştirmek için, yetiştiricilerin eğitimi, biyokontrol mikroorganizmalarının formülasyonu ve çevresel faktörlerin rolünün araştırılması

dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin vurgulanması son derece önemlidir (Heydari and Pessarakli, 2010).

2.10. Ticari *Bacillus* Biyopreparatları

Biyosüpfektanlar yaygın kullanım için büyük potansiyel göstermesine rağmen, endüstriyel ölçekte üretim ve ticarileştirme tam olarak sağlanamamıştır. Hammaddelerin yüksek maliyetleri, işleme maliyetleri/saflaştırma ve genellikle düşük verim nedeniyle üretimleri zordur. Hammadde maliyetleri toplam üretim maliyetinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Buna rağmen, son yıllarda yayınların ve patentlerin sayısı önemli ölçüde artmıştır, ancak yalnızca bazıları ticarileştirilebilmiştir (Bertrand et al., 2018). Ticarileştirilmiş olan biyosüpfektan ürünlerine örnekler Çizelge 2.9'da verilmiştir.

Çizelge 2.9. Çeşitli çevresel ve biyoteknolojik uygulamalar için ticari ölçekte biyosüpfektan ürünleri geliştiren firmalara örnekler (Jimoh and Lin, 2019).

Ürün İsmi	Üretici Firma İsmi	Üretildiği Ülke
BERO Biyosüpfektan	ZFA Teknoloji	Çin
Lipopeptitler	Lipofabrik	Fransa
KANEKA Süpfaktin	KANEKA Şirketi	Japonya
Rhamnolipidler ve Lipopeptitler	TeeGene Biyoteknoloji Ltd.	Birleşik Krallık
Süpfaktin	Soft Chemical Laboratuvarları	Güney Afrika

Biyopestisitler, dünya çapında yaklaşık 3 milyar ABD doları değerindeki bitki koruma pazarında küçük bir paya sahiptir ve bu da toplam pazarın sadece %5'ini oluşturmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri pazarında 200'den fazla ürün bulunurken, Avrupa Birliği pazarında sadece 60 analog bulunmaktadır. Küresel ölçekte ise biyopestisit kullanımı her yıl yaklaşık %10 artmaktadır (Kumar et al., 2021). Küresel pazarda mevcut biyokontrol preparatları Çizelge 2.10'da verilmiştir.

Çizelge 2.10. Çeşitli *Bacillus* türlerini içeren ticari biyokontrol preparatları (Aloo et al., 2019; Miljaković et al., 2020; Saxena et al., 2020; Anckaert et al., 2021).

Ürün	<i>Bacillus</i> suşu	Patojenler	Bitkiler	Üretici Firma
Amylo-X®WP	<i>B.amyloliquefaciens</i> D747	<i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Monilinia spp</i> , <i>Stemphylium spp.</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sclerotinia spp</i> , <i>Pezicula alba</i>	Sebze üretimi, fidancılık, asma, mantar, meyve ağaçları	Certis EUROPE
DOUBLE NICKEL 55™	<i>B.amyloliquefaciens</i> D747	<i>Sphaerotheca fuliginea</i> , <i>Erysiphe cichoracearum</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>B.cinerea</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Sclerotinia minor</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Salatalık, asma, marul, patates	Certis USA, LLC
Eco-Shot	<i>B.amyloliquefaciens</i> D747	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Podosphaera fuliginea</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Erysiphe polygoni</i> , <i>A. solani</i> , <i>Phyllosticta citricarpa</i> , <i>Cryptosporiopsis perennans</i>	Üzüm, limon, sebzeler, baklagiller	IHARA
Serifel®	<i>B.amyloliquefaciens</i> MBI 600	<i>B. cinerea</i> , <i>Sclerotinia spp.</i>	Üzüm, domates, marul, çilek, mantar, biber, tütün	BASF, Germany
Integral®Pro (SUBTILEX®)	<i>B.amyloliquefaciens</i> MBI 600	<i>Phoma spp.</i>	Kolza tohumu, pirinçgiller	BASF, Germany
FZB24®liquide	<i>B.amyloliquefaciens</i> / <i>B.velezensis</i> FZB42	<i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Oidium spp.</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Sclerotinia spp</i> , <i>Bremia spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i>	Patates, marul	Bayer Crop Science/ABITEP

Çizelge 2.10. (devam)

Ürün	<i>Bacillus</i> suşu	Patojenler	Bitkiler	Üretici Firma
Taegro®	<i>B.amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Oidium</i> spp., <i>B. cinerea</i> , <i>Sclerotinia</i> spp., <i>Bremia</i> spp. <i>Sclerotinia homoeocarpa</i> , <i>Pyricularia grisea</i> , <i>P. oryzae</i> ,	Çilek, salatalık, marul, mısır, asma, hindiba	Syngenta
EcoGuard™ BIOFUNGICIDE	<i>B.licheniformis</i> SB3086	<i>Gloeocercospora sorghi</i> , <i>Puccinia graminis</i> , <i>Alternaria</i> spp., <i>Typhula</i> spp., <i>Microdochium nivale</i> , <i>Drechslera poae</i> , <i>Puccinia</i> spp., <i>Uramyces</i> spp., <i>Calletatrichum graminicola</i>	Çim, süs bitkileri	Novozymes Biologicals Inc.
Sonata®	<i>B.pumilus</i> QST 2808	<i>Oidium</i> spp.	Sebze üretimi, tütün, asma	Bayer Crop Science, previously AgraQuest
Ballad®	<i>B.pumilus</i> QST 2808	<i>Alternaria brassicae</i> , <i>Oidium</i> spp., <i>Rhizoctonia oryzae</i> , <i>Xanthomonas</i> spp., <i>Puccinia sorghi</i> , <i>Erysiphe graminis</i> , <i>Puccinia</i> spp., <i>Xanthomonas</i> spp., <i>Sphaerotheca</i> spp., <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Cercospora</i> spp.	Yağlı tohum bitkileri, tahıllar, çim tohumu, tatlı mısır,	Bayer Crop Science, previously AgraQuest
BSF4®	<i>B.subtilis</i> BSF4	<i>Erwinia amylovora</i> , <i>B. cinerea</i>	Armut, elma, çilek, domates, süs bitkileri, marul	Agribiotech, Italy
Cease®	<i>B.subtilis</i> QST 713	<i>Peronospora belbahrii</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>E.cichoracearum</i>	Süs bitkileri, domates, marul, çilek, tropik meyveler, kenevir	BioWorks®

Çizelge 2.10. (devam)

Ürün	<i>Bacillus</i> suşu	Patojenler	Bitkiler	Üretici Firma
BACSTAR®	<i>B.subtilis</i> D747	<i>E. amylovora</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>P. capsici</i>	Elma, armut, üzüm, kivi, çilek, marul, soğan, süs bitkileri, çim, narenciye	Certis USA, LLC
Companion®	<i>B.subtilis</i> GB03	<i>Sclerotinia spp.</i> , <i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	Bakla, pamuk, yer fıstığı, soya fasülyesi, buğday, arpa, mısır, çilek, üzüm, domates	Growth Products Ltd., USA
Kodiak™	<i>B.subtilis</i> GB03	<i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Alternaria spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	Pamuk, soya fasülyesi, buğday, arpa	Bayer Crop Science, previously Gustafsson LLC
Rhapsody®	<i>B.subtilis</i> QST 713	<i>B. cinerea</i> , <i>Sclerotinia spp.</i> , <i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Pythium spp.</i> , <i>Oidium spp.</i> , <i>Monilinia spp.</i>	Sebze üretimi, asma, süs bitkileri, patates	Bayer Crop Science, previously AgraQuest
Serenade®ASO	<i>B.subtilis</i> QST 713	<i>B. cinerea</i> , <i>Oidium spp.</i> , <i>Golovinomyces cichoracearum</i> , <i>Podosphaera spp.</i>	Sebze üretimi, domates, biber	Bayer Crop Science, previously AgraQuest
Serenade®SOIL	<i>B.subtilis</i> QST 713	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Pythium spp.</i> , <i>Rhizoctonia spp.</i>	Kök sebzeleri, yapraklı sebzeler, pirinçgiller, kabakgiller	Bayer Crop Science, previously AgraQuest
Serenade®OPTI	<i>B.subtilis</i> QST 713	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sclerotinia spp.</i> , <i>G. cichoracearum</i> , <i>Podosphaera spp.</i> , <i>Albugo candida</i> , <i>Oidium spp.</i> , <i>Phytophthora spp.</i> , <i>Peronospora spp.</i> , <i>E. Amylovora</i>	Çekirdekli meyveler, pancar, domates, fidancılık, sebze üretimi	Bayer Crop Science, previously AgraQuest

Çizelge 2.10. (devam)

Ürün	Bacillus suşu	Patojenler	Bitkiler	Üretici Firma
Serenade®MAX	<i>B.subtilis</i> QST 713	<i>B. cinerea</i> , <i>Oidium</i> spp., <i>Colletotrichum</i> spp., <i>Glomerella</i> spp.	Avokado, muz, mantar, salatalık, süs bitkileri, fidancılık, marul, kavun, domates, üzüm	Bayer Crop Science, previously AgraQuest
Pro-Mix®	<i>B.subtilis</i>	-	Soya fasülyesi, süs bitkileri ve diğerleri	Premier Horticulture Inc., Kanada
Bio Safe®	<i>B.subtilis</i>	-	Baklagiller, sebzeler, pamuk	Lab. Biocontrole Farroupilha, Brezilya
Biosubtilin®	<i>B.subtilis</i>	-	Tahıllar, sebzeler, baklagiller, yağlı tohumlar, pamuk	Biotech International Ltd., Hindistan
Bio Yield®	<i>B.amyloliquefaciens</i>	-	Baklagiller, sebzeler, tütün	Gustafson Inc., Amerika
Rhizocell® GC	<i>B.amyloliquefaciens</i>	-	Tahıllar, şeker pancarı	Lallemand Plant Care, Fransa
Botrybel®	<i>B.velezensis</i>	-	Sebzeler, meyveler	Agricaldes, İspanya
Symbion-P®	<i>B.megaterium</i>	-	Tahıllar, baklagiller, yağlı tohumlar, sebzeler	T Stanes&Co. Ltd., Hindistan
Avogreen®	<i>B.subtilis</i>	-	Avokado	Güney Afrika
Kiwa®	<i>B.subtilis</i>	-	Pirinç	Çin

Çizelge 2.10. (devam)

Ürün	<i>Bacillus</i> suşu	Patojenler	Bitkiler	Üretici Firma/Ülke
EM Biocontrol®	<i>B.subtilis</i>	-	Sebzeler, meyveler	Pakistan
VoTiVo®	<i>B.subtilis</i>	-	Faklı ürünler	Amerika
<i>Bacillus</i> SPP®	<i>B.subtilis</i>	-	Çeşitli ürünler	Şili
Hatake®	<i>B.velezensis</i>	-	-	Japonya
RhizoVital 42®	<i>B.velezensis</i>	-	-	Almanya
Amyprotec- 42®	<i>B.velezensis</i>	-	-	İsviçre

2.11. Gelecekteki Durumu

AB'nin Avrupa Yeşil Mutabakatı kapsamında tarım, gıda ve biyoçeşitlilik alanlarındaki hedeflerini içeren tarladan sofraya ve biyoçeşitlilik stratejilerinde, yeterli miktarda uygun gıda tedariki sağlayabilmek amaçlanırken, pestisit kullanımını azaltmanın acil bir ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. Bu çerçevede Eylem Planının “Sürdürülebilir Tarım” başlığı altında belirlenen eylemler kapsamında, AB'nin pestisit kullanımının azaltılmasına yönelik ortaya koyduğu hedefler ile uyumlu bir şekilde ülkemizde pestisit kullanımının azaltılmasına yönelik çalışmalar yürütülmesi planlanmıştır. Bu doğrultuda, biyolojik ve biyoteknik mücadele yöntemlerinin kullanımının yaygınlaştırılması önem kazanmaktadır. Dünyada gelişmekte olan organik tarım ürünlerine yönelik talep, sürdürülebilir ve çevre dostu organik tarım üretiminin geliştirilmesi için fırsatlar yaratmaktadır (Türkiye Cumhuriyeti Ticaret Bakanlığı, 2021).

Mevcut ürün üretimi senaryosunda, biyokontrol son derece önemlidir ancak bu alandaki araştırmaların hala laboratuvarla sınırlı olması ve ticari biyokimyasal formülasyonların üretilmesine yeterli önemin gösterilmemesi nedeniyle bu potansiyelden henüz tam olarak yararlanılamamaktadır. Ayrıca, kullanımıyla ilgili bilgi eksikliği nedeniyle ticari olarak üretilen her şey, çiftçiler tarafından verimli bir şekilde kullanılamamaktadır. Bu nedenle, biyolojik kontrolün üniversite düzeyinden çiftçilere doğru yaygınlaştırılması gerekmektedir. Biyolojik ajanların çoğu laboratuvar koşullarında iyi performans göstermektedir ancak toprağa uygulandıklarında tam performans gösterememektedir. Bu sorun, biyolojik ajanların etkinliğini sınırlayan fizyolojik ve ekolojik kısıtlamaların bir sonucudur. Bu durumun üstesinden gelmek için, genetik mühendisliği ve diğer moleküler yöntemler, biyolojik kontrol ajanlarının seçimini ve karakterizasyonunu geliştirmek için kullanılabilecek yeni imkanlardır. Biyolojik ajanın etkinliğini arttırmaya katkıda bulunabilecek çeşitli yöntemler, polietilen glikol kullanılarak protoplazma füzyonunu ve mutasyonu içermektedir. Ayrıca biyolojik ajanların, kitlesel üretiminin geliştirilmesine, etki mekanizmalarının anlaşılmasına ve hızlı büyümesini destekleyen çevresel faktörlerin değerlendirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır (Junaid et al., 2013).

Günümüz dünyasının ihtiyacı, ürün üretiminin geliştirilmesi ve yüksek verim elde edilmesinin yanı sıra toprak verimliliğinin çevre dostu bir şekilde sürdürülmesidir. Bu nedenle, araştırmalar, bitki ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimde benzersiz rol oynayan biyomoleküllere dayanan ve yeni bir konsept

olan rizomühendislik kavramına odaklanmaktadır. Rizosfer biyolojisinde gelecekteki araştırmalar, rizosfer biyolojisi bilgimizi artırmak ve toprak mikrobiyal popölasyonlarının entegre bir yönetimini sağlamak için moleküler ve biyoteknolojik yaklaşımların geliştirilmesine dayanmaktadır. Sebzeler, meyveler ve çiçekler gibi yüksek değerli ürünler için biyoinokülanların kullanımı için yeni alternatifler araştırılmalıdır. Tek bakteri içeren inokölasyonlardansa çok suşlu bakteri konsorsiyumunun uygulanmasının, stresin bitki büyümesi üzerindeki zararlı etkisini azaltmak için etkili bir yaklaşım olduğu düşünölmektedir. Buz nükleasyon aktivitesine sahip olan bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin eklenmesinin, düşük sıcaklıkta bitki büyümesini arttırmak için etkili bir teknoloji olabileceği de düşünölmektedir (Gupta et al., 2015).

Elde edilen bazı erken başarılar ve biyopestisit pazarının devam eden büyümesi nedeniyle, mikrobiyal biyopestisitlerin performansına yönelik beklentiler de yüksek olmuştur. Ancak, halen üstesinden gelinmesi gereken birçok zorluk bulunmaktadır. İlk olarak, patentli teknolojilerin insani amaçlı kullanımları üzerindeki engellerin yanı sıra kamu tarafından finanse edilen araştırma sonuçlarının mevcudiyeti ve kullanılabilmesi hakkındaki sorunların ortadan kaldırılması gerekmektedir. İkinci olarak, mikrobiyal kontrol stratejileri hakkındaki bilgilerin derlenmesi ve mevcut düzenleyici yönergeler hazırlanması gerekmektedir. Ayrıca, gelişmekte olan ölkelerde yerel üretim planlarını uygulamak için ulusal ve uluslararası düzeyde müdahaleler gerekmektedir. Üçüncü olarak, mikrobiyal biyopestisitlerin kullanımıyla ilgili ekolojik uygunluğun araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle, mikrobiyal biyopestisitlerin mikrobiyal topluluklar üzerindeki etkisi dikkatle izlenmelidir (Koul, 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

3.1.1.1. *Bacillus* izolatları

Çalışmada incelenen 1574 adet *Bacillus* izolatı bir başka çalışma kapsamında, İzmir ve civarından su birikintisi, çamur, bataklık, gölet, çiftliklerdeki hayvan yıkama suları, ağaçlık alanlar gibi habitatlardan gelen su, çamur ve toprak numuneleri olmak üzere toplam 18 adet istasyondan alınan 29 numuneden izole edilmişlerdir (Işıkçı, 2014). Kullanılan numunelerin kodları ve izole edildikleri kaynaklar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

3.1.1.2. Fitopatojenik funguslar

Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden temin edilen *Botrytis cinerea* (Bc), *Fusarium solani* (Fs) ve *Rhizoctonia solani* (Rs) gibi fitopatojenik funguslar *Bacillus* izolatlarının antifungal etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

3.1.2.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Hazırlanan tüm besiyerleri kullanılmadan önce 121°C’de 15 dk boyunca otoklavda sterilize edilmiştir.

- **Patates dekstroza agar (PDA)**

Fitopatojen fungusların üretiminde ve saklanması ticari olarak satılan hazır formülasyon Patates Dekstroza Agar (Oxoid, CM0139) kullanılmıştır.

Bileşenin Adı	Miktarı
Patates Dekstroza Agar	39 g
Distile Su	1000 ml

Çizelge 3.1. Çalışmamızda kullanılan numunelerin kaynakları ve kodları (Işıkcı, 2014).

No	Numune Alınan Yer	Tarih	Numune Sayısı ve Kodu	Numune Cinsi
1	KUŞ cenneti göz. İst. Arkası 3 su birikintisi	15.11.2012 saat 16:00	1-K, 2-K, 3-K, 3-K-S	Su (3 kova)
2	KUŞ cenneti gözlem İst. 300-400 m. uzağı su kanalı	15.11.2012 saat 14:30	4-K-a, 4-K-b	Su (2 kova)
3	Bayındır-Tire yolu, Tire çıkışı 5 km çiftlik (yolun sağında)		T-1, T-2, T-3, T-4	Su (beklemiş havuz suyu) (4 kova)
4	Ödemiş'e gelmeden 2 km sağda çiftlik evi	13.12.2012	Ö-1, Ö-2, Ö-3, Ö-4	Su (beklemiş su) (4 kavanoz)
5	Bayındır / Bayındır Güney yönü / Zeytin bahçesi	21.11.2012	B-1	Toprak (1 kavanoz)
6	Bayındır-Tire yolu Batı Yönü	21.11.2012	B-2	Toprak (Çiftlik toprağı) (1 kavanoz)
7	Tire / İzmir Tire Kuzey yönü / Mısır Tarlası	21.11.2012	T-5	Toprak (1 kavanoz)
8	Ödemiş Bademli / Bademli Barajı kenarı orman toprağı Batı yönü	21.11.2012	Ö-5	Toprak (1 kavanoz)
9	Ödemiş Bademli Güney Yönü Allah deresi Kestane ormanı	21.11.2012	Ö-6	Toprak (1 kavanoz)
10	Torbalı Çaybaşı köyü Hayvan Çiftliği Hayvan Yıkama Havuzu	21.11.2012	Ç-1	Su (1 kova)
11	Torbalı Çaybaşı Sulama havuzu kenarı su birikintisi	21.11.2012	Ç-2	Su (1 kova)
12	Torbalı Çaybaşı Hayvan Çiftliği Yıkama suyu	21.11.2012	Ç-3	Su (1 kova)
13	Kuş Cenneti Gözlem İst. 100-1000 m. çevresi	15.11.2012 saat: 13:30	K-5	Çamur (1 kavanoz)
14	Kuş Cenneti Gözlem İst. Yaklaşık 1000 m. Uzağı Sulama Kanalı	15.11.2012 saat: 14:30	K-6	Çamur (1 kavanoz)
15	Kuş Cenneti Gözlem İst. Yaklaşık 500 m. Kara içi	15.11.2012 saat: 13:50	K-7	Çamur 1 kavanoz)
16	Kuş Cenneti Gözlem İst. Yaklaşık 500 m. Sazlık Alan Etrafı	15.11.2012 saat: 14:00	K-8	Çamur (1 kavanoz)
17	Kuş Cenneti etrafı sulama kanalları ve civarı gözlem ist. Yaklaşık 1 km	15.11.2012 saat: 14:40	K-9	Çamur (1 kavanoz)
18	Ödemiş Gölcük 1 su şişesi		G-1, 30-2, A-1	Su (1 şişe-500 ml)

- **Nutrient broth (NB) ve nutrient agar (NA)**

Bacillus izolatlarının üretiminde ve saklanması ticari olarak satılan hazır formülasyonlardan Nutrient Broth (Oxoid, CM0001) ve Nutrient Agar (Oxoid, CM0003) kullanılmıştır.

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Broth	13 g
Distile Su	1000 ml

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Agar	28 g
Distile su	1000 ml

- **Kanlı agar besiyeri**

Ticari olarak 90 mm steril petrilere dökülmüş şekilde temin edilen hazır kanlı agar besiyeri (RTA Laboratuvarları-02002) kullanılmıştır.

- **Luria-Bertani (LB) broth**

Antifungal lipopeptidlerin sıvı kültürde üretimi amacıyla ticari olarak satılan hazır formülasyon Luria-Bertani Broth (Oxoid, CM0996) kullanılmıştır (Meena et al., 2018; Sarwar et al., 2018; Soussi et al., 2019)

Bileşenin Adı	Miktarı
Luria-Bertani	20 g
Distile Su	1000 ml

- **Proteaz enzim üretim ortamı**

Bacillus izolatlarının sıvı besiyerinde proteaz aktivitelerinin incelenmesi amacıyla aşağıda bileşenleri verilen besiyeri kullanılmıştır (Akbal, 2011).

Bileşenin Adı	Miktarı
Pepton	5 g
Çözünür nişasta	10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 ml

• **Kitinaz enzim üretim ortamı**

Bacillus izolatlarının sıvı besiyerinde kitinaz aktivitelerinin incelenmesi amacıyla aşağıda bileşenleri verilen besiyeri kullanılmıştır (Liaqat, 2018).

Bileşenin Adı	Miktarı
Kolloidal kitin	30 g
Maya ekstraktı	0,05 g
K ₂ HPO ₄	0,7 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
NaCl	4 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂	0,01 g
MnCl ₂	0,01 g
ZnCl ₂	0,01 g
Distile su	1000 ml
pH	7,0

• **Kitosanaz enzim üretim ortamı**

Bacillus izolatlarının sıvı besiyerinde kitosanaz aktivitelerinin incelenmesi amacıyla aşağıda bileşenleri verilen besiyeri kullanılmıştır (Liaqat, 2018).

Bileşenin Adı	Miktarı
Kolloidal kitosan	5 g
Maya ekstraktı	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,7 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,5 g
CaCl ₂	0,1 g
Distile su	1000 ml
pH	6,8

• **HCN üretimi için kullanılan besiyeri**

Bacillus izolatlarının glisini kullanarak HCN üretilip üretilmediğini belirlemek amacıyla aşağıda bileşenleri verilen katı besiyeri kullanılmıştır (Ahmad et al., 2008; Kumar et al., 2012b; Ghodsalavi et al., 2013).

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient agar (Merck)	20 g
Glisin	4,4 g
Distile su	1000 ml

• **Siderofor üretim ortamı**

Bacillus izolatlarının siderofor üretilip üretilmediğinin belirlenmesi amacıyla Çizelge 3.2’de bileşenleri ve hazırlanışı verilen CAS (Krom Azurol S) Agar besiyeri kullanılmıştır (Louden et al., 2011).

Çizelge 3.2. CAS Agar besiyeri içeriği ve hazırlanışı.

Mavi Boya	
Solüsyon 1	0,06 g Krom azurol S 50 ml distile suda çözündürülmüştür.
Solüsyon 2	0,0027 g FeCl ₃ .6H ₂ O, 10 ml 10 mM HCl içerisinde çözündürülmüştür.
Solüsyon 3	0,073 g HDTMA 40 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür.
Önce solüsyon 1 ile 9 ml solüsyon 2 karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım solüsyon 3 ile karıştırılmıştır. Otoklavlanıp plastik şişede saklanmıştır. Bu aşamada boya mavi renkte olmalıdır.	
Karışım Solüsyonu	
Minimal Media 9 (MM9) tuz solüsyonu stoğu	15 g KH ₂ PO ₄ , 25 g NaCl ve 50 g NH ₄ Cl 500 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür.
%20 Glikoz stoğu	20 g glikoz 100 ml distile su içerisinde çözündürülüp ayrı olarak otoklavlanmıştır.
NaOH Stoğu	25 g NaOH 150 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür.
Casamino asit solüsyonu	3 g casamino asit 27 ml distile suda çözündürülmüştür. Filtre ile steril edildikten sonra ortama en son eklenmiştir.
CAS Agar Hazırlanışı	
100 ml MM9 tuz solüsyonu 750 ml distile suya eklenmiştir. 32,24 g piperazine çözündürülmüştür (Piperazine pH 5,0'in altında çözünmez. Bu nedenle pH önce 6,0'ya ayarlanmıştır. Piperazine çözündükten sonra ise pH 6,2'ye ayarlanmıştır). Daha sonra 15 g agar eklenip otoklavlanmıştır. Otoklav ile sterilizasyon sonrası 30 ml steril casamino asit solüsyonu ve 10 ml steril %20 glukoz solüsyonu MM9/Piperazine karışımına eklenmiştir. Son olarak 100 ml mavi boya solüsyonu karışıma yavaşça eklenmiştir.	

• **Tween 20 ve Tween 80 hidroliz testi için besiyeri**

Bacillus izolatlarının Tween 20 ve Tween 80'i hidrolize edebilme yeteneklerini incelemek amacıyla aşağıdaki besiyeri kullanılmıştır (Kumar et al., 2012c; Ramnath et al., 2017).

Bileşenin Adı	Miktarı
Pepton	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g
Tween 20/80	10 ml
Agar	20 g
Distile Su	1000 ml

• **Simmon's Sitrat Agar Besiyeri**

Tek karbon kaynağı olarak sitrat içeren aşağıda bileşenleri verilen besiyerinde izolatlarda sitrat testi amacıyla kullanılmıştır. Besiyerinin pH değeri 6,9 olarak ayarlanmıştır. Yeşil renkli besiyerinin mavi renge dönmesi sitrat kullanımı açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Brown, 1939).

Bileşenin Adı	Miktarı
$C_6H_5Na_3O_7$	2 g
$(NH_4)H_2PO_4$	1 g
K_2HPO_4	1 g
$NaClO_2$	5 g
$MgSO_4$	0,2 g
Bromtimol mavisi	0,08 g
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml

3.1.2.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler

• **0,1 M Sodyum fosfat tamponu, pH 7,0**

Bacillus izolatlarının proteaz aktivite tayininde azokazein substratının çözündürülmesinde kullanılan pH 7,0 olan 0,1 M Sodyum fosfat tamponunun elde edilmesi için iki ayrı çözelti hazırlanmıştır. A çözeltisi için 27,6 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 1 lt suda çözündürülmüştür (0,2 M). B çözeltisi için 53,65 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 1 lt suda çözündürülmüştür (0,2 M). İstenilen pH değerine göre A çözeltisinden 39 ml, B çözeltisinden ise 61 ml alınarak çözelti hacmi 200 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır (Maines, 1999).

• **%1 Azokazein çözeltisi**

Bacillus izolatlarının proteaz aktivite tayininde substrat olarak kullanılmak üzere pH 7,0 olan 0,1 M Sodyum fosfat tamponunun içerisinde %1 oranında azokazein (*Sigma*, A2765) çözündürülmüştür ve +4°C'de saklanmıştır (Maral, 2012).

• **%25 Trikloroasetik asit çözeltisi**

Bacillus izolatlarının proteaz aktivite tayininde reaksiyonu durdurmak amacıyla kullanılmıştır. 25 g trikloroasetik asit 100 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür (Maral, 2012).

• **Kolloidal kitin çözeltisi**

Kolloidal kitin, kitin (Sigma, C7170) kullanılarak hazırlanmıştır. 600 ml HCl'ye 40 g kitin eklenerek 30°C'de 60 dk boyunca kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım 4°C'de soğutulmuş olan 2 lt distile suya yavaş yavaş eklenerek kolloidal bir süspansiyon oluşması sağlanmıştır. Bu süspansiyon kaba filtre kağıdı ile süzülerek içeriğindeki çökelek toplanmıştır ve yaklaşık 5 lt distile su içerisinde süspanse edilerek yıkanmıştır. Yıkama işlemi süspansiyonun pH değeri 4,0 oluncaya kadar tekrarlanmıştır (Liaqat, 2018).

• **0,1 M Sodyum asetat tamponu, pH 5,5**

Bacillus izolatlarının kitinaz aktivite tayininde kolloidal kitin substratının çözündürülmesinde kullanılmak üzere pH 5,5 olan 0,1 M Sodyum asetat tamponunun eldesi için iki ayrı çözelti hazırlanmıştır. A çözeltisi için 11,55 ml asetik asit 1 lt suda çözündürülmüştür (0,2 M). B çözeltisi için 16,4 g sodyum asetat ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) 1 lt suda çözündürülmüştür (0,2 M). İstenilen pH değerine göre A çözeltisinden 4,8 ml, B çözeltisinden ise 45,2 ml alındıktan sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak sodyum asetat tamponu hazırlanmıştır (Maines, 1999).

• **%1'lik Kitin çözeltisi**

Bacillus izolatlarının kitinaz aktivite tayininde substrat olarak kullanılmak üzere pH 5,5 olan 0,1 M Sodyum asetat tamponunun içerisinde %1 oranında kolloidal kitin çözündürülmüştür ve +4°C'de saklanmıştır (Liaqat, 2018).

• **Kolloidal kitosan çözeltisi**

5 g kitosan (Sigma, 448869 düşük moleküler ağırlık %75-85 deasetilatlı), 5 ml 1M HCl ve 100 ml distile su içinde yaklaşık 2 saat çözüldükten sonra %50 NaOH (w/v) ile çözeltinin pH değeri 6,0'ya ayarlanmıştır. Bu karışım 8-10 kez

distile suyla yıkanmış ve koloidal süspansiyon kaba filtre kağıdı ile süzülerek toplanmıştır. Koloidal kitosan otoklavda sterilize edilip daha sonra kullanılmak üzere 4°C'de saklanmıştır (Liaqat, 2018).

• **0,2 M Sodyum asetat tamponu, pH 5,5**

Bacillus izolatlarının kitosanaz aktivite tayininde koloidal kitosan substratının çözündürülmesinde kullanılmak üzere pH 5,5 olan 0,2 M Sodyum asetat tamponunun eldesi için iki ayrı çözelti hazırlanmıştır. A çözeltisi için 11,55 ml asetik asit 1 lt suda çözündürülmüştür (0,2 M). B çözeltisi için 16,4 g sodyum asetat ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) 1 lt suda çözündürülmüştür (0,2 M). İstenilen pH değerine göre A çözeltisinden 9,6 ml, B çözeltisinden ise 90,4 ml alınarak 100 ml sodyum asetat tamponu hazırlanmıştır (Maines, 1999).

• **%1'lik Kitosan çözeltisi**

Bacillus izolatlarının kitosanaz aktivite tayininde substrat olarak kullanılmak üzere pH 5,5 olan 0,2 M Sodyum asetat tamponunun içerisinde %1 koloidal kitosan çözündürülmüştür ve +4°C'de saklanmıştır (Liaqat, 2018).

• **Dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi**

Kitinaz ve kitosanaz enzim aktivitesi tayininde kullanılan DNS çözeltisi hazırlanırken tüm bileşenler istenilen miktarda tartılıp 500 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra 5,4 ml fenol de eklenerek toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Tüm bileşenler iyice karıştırıldıktan sonra ise DNS çözeltisi filtreden geçirilerek kahverengi şişede saklanmıştır (Liaqat, 2018).

Bileşenin Adı	Miktarı
Dinitrosalisilik asit	7,5 g
NaOH	14,0 g
K-Na tartarat	216,1 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	5,9 g
Fenol	5,4 ml
Distile su	1000 ml

• **Pikrik asit çözeltisi**

Bacillus izolatlarında hidrojen siyanür (HCN) varlığının belirlenmesi için indikatör olarak kullanılacak pikrik asit çözeltisi %2 sodyum karbonat ve %0,5 pikrik asit içerecek şekilde hazırlanmıştır (Ahmad et al., 2008; Kumar et al., 2012b; GhodsSalavi et al., 2013).

3.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar

3.1.3.1. Hassas terazi

Kullanılan besiyeri ve çözelti bileşenlerinin tartılmasında Mettler Toledo marka (AL204 model) hassas terazi kullanılmıştır.

3.1.3.2. pH Metre

Hazırlanan besiyeri ve çözeltilerin istenilen pH değerine ayarlanması amacıyla Milwaukee marka Mi 150 model pH metre kullanılmıştır.

3.1.3.3. Isıtıcı manyetik karıştırıcı

Hazırlanan besiyeri ve çözelti bileşenlerinin homojen şekilde çözündürülmesi ya da ısıtılması amacıyla Heidolph marka MR 3001 model ısıtıcı manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.3.4. Otoklav

Hazırlanan besiyeri ve çözeltilerin sterilizasyonunu sağlamak amacıyla Hirayama marka Hiclave HVE-50 model otoklav kullanılmıştır.

3.1.3.5. İnkübatör

Kullanılan bakteri ve fungus kültürlerinin inkübasyonu amacıyla Nüve ES 110 ve Sanyo inkübatör kullanılmıştır.

3.1.3.6. Çalkalamalı inkübatör

Sıvı kültürde bakteri üretimi amacıyla Infors Multitron marka çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır.

3.1.3.7. Pastör fırını

Çalışmada kullanılan cam malzemelerin sterilizasyonu amacıyla Binder marka pastör fırını kullanılmıştır.

3.1.3.8. Vorteks

Homojen karıştırmayı sağlamak amacıyla Yellowline marka TTS2 model vorteks kullanılmıştır.

3.1.3.9. Santrifüj

Farklı amaçlarla sıvı besiyerinde büyütülen biyokütlenin üretim ortamından ayrılmasında Pro-Research K241R Medium Prime Refrigerated marka santrifüj kullanılmıştır.

3.1.3.10. Spektrofotometre

Enzim aktivitesi ve protein tayininde absorbans değerlerinin ölçülmesinde AquaMate Plus UV-Vis 9423AQA2100E model spektrofotometre kullanılmıştır.

3.1.3.11. Su banyosu

Enzim aktivitesi tayininde istenilen reaksiyon sıcaklığının elde edilmesi amacıyla Memmert marka su banyosu kullanılmıştır.

3.1.3.12. Liyofilizatör

Kullanılan *Bacillus* izolatlarının uzun süre kontaminasyondan uzak şekilde dondurularak kurutulup saklanması amacıyla CHRIST-ALPHA marka 1-4 LD Plus model liyofilizatör kullanılmıştır.

3.1.3.13. Q-TOF

Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (Ege-MATAL) bünyesinde bulunan Agilent 6550 QTOF LC/MS cihazı kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan mikroorganizmaların saflık kontrolü ve aktifleştirilmesi

Çalışmada kullanılan *Bacillus* izolatlarının her biri için nutrient agar (NA) besiyerinde çizgi ekim teknikleri ile saflık kontrolü yapılmıştır. Bir gece boyunca 30°C’de inkübe edildikten sonra saf olduğu belirlenen izolatlar çalışmalarda kullanılmıştır. Tüm izolatlar, NA besiyeri kullanılarak yatık agar hazırlanmış olan kapaklı cam tüplerde 1 gece 30°C’de inkübe edilip aktifleştirildikten sonra diğer çalışmalarda kullanılmak üzere 4°C’de saklanmıştır.

Fitopatojenik funguslar ise patates dekstrozu agar (PDA) besiyeri içerecek şekilde hazırlanan petrilerde 5-6 gün boyunca 28°C’de aktifleştirildikten sonra kullanılmışlardır. Ayrıca, PDA besiyeri kullanılarak yatık agar hazırlanmış olan kapaklı cam tüplerde 5-6 gün 28°C’de inkübe edilip aktifleştirildikten sonra diğer çalışmalarda kullanılmak üzere 4°C’de saklanmıştır.

3.2.2. *Bacillus* izolatlarının in vitro koşullarda antifungal etkisinin incelenmesi

3.2.2.1. Dörtlü ekim tekniği ile ön tarama

PDA besiyeri içeren petrilerde 5-6 gün sresince kültüre edilen fitopatojenik funguslardan içi boş steril bir cam çubuk yardımıyla alınan eşit çaptaki agar diskleri (5 mm) PDA besiyeri içeren başka bir petrinin tam ortasına bırakılmıştır. Aynı petri dörde bölünerek her bir kısma farklı bir bakteri izolatı üç tekrarlı olacak şekilde inoküle edilmiştir ve 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Aralarındaki etkileşim 7 gün boyunca takip edilmiştir (Chenniappan et al., 2019; Gajbhiye et al., 2010; Nihorimbere and Ongena, 2017; Zhu et al., 2020; Diabankana et al., 2021; Huang et al., 2021; Liu et al., 2021; Baptista et al., 2022). Literatürdeki sınıflandırma modifiye edilerek antifungal etki gösteren *Bacillus* izolatları fitopatojenik funguslara karşı gösterdikleri etki şekillerine göre inhibisyon zonu, çıkmaza girdi ve etkisiz olarak sınıflandırılmıştır (Berger et al., 2015; Krause et al., 2020; D’Ambrosio et al., 2022; VS et al., 2022). Her üç fitopatojene karşı da inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenen izolatlar ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

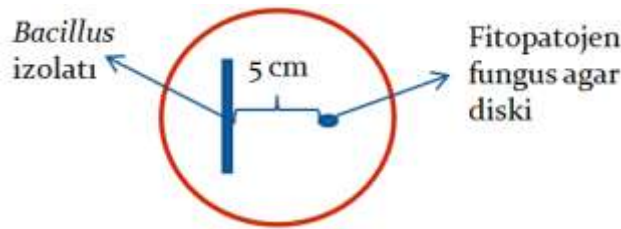
3.2.2.2. İkili kültür testi yöntemi ile *Bacillus* izolatlarının yüzde (%) büyüme inhibisyon değerlerinin belirlenmesi

Kısım 3.2.2.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen antifungal etki taraması sonucunda her üç fitopatojene karşı da inhibisyon zonu oluşturan izolatlar seçildikten sonra ikili kültür testi yöntemi kullanılarak bu izolatların fitopatojenlere karşı yüzde büyüme inhibisyon (Percentage of Growth Inhibition, PGI) değeri hesaplanmıştır. PDA besiyerinde 5-6 gün süreyle kültive edilen fitopatojenik funguslardan içi boş steril bir cam çubuk yardımıyla alınan eşit çaptaki agar diskleri (5 mm), PDA besiyeri içeren petrinin sol yarım tarafına bırakılmıştır. Fitopatojenik fungus diskinden 5 cm uzaklığa ise bakteri izolatlarından yukarıdan aşağıya doğru çizgi şeklinde ekim yapılmıştır (Şekil 3.1) ve petriler 7 gün süreyle 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kontrol olarak tek başına petrinin sol yarım tarafına konulan agar diskinden gelişen fitopatojenik fungus kolonisinin yarıçap değeri kullanılmıştır. Yüzde büyüme inhibisyon değeri hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$\text{Büyüme İnhibisyonu (\%)} = [(R-r)/R]*100$$

Bu formülde, R: Fitopatojenik fungus kolonisinin kontrol petrisindeki yarıçap değerini, r: Fitopatojenik fungusun bakteriye doğru büyüyen koloni yarıçap değerini ifade etmektedir (ŽIVKOVIC et al., 2010; Daniel et al., 2022; Hong et al., 2022).

Yüzde büyüme inhibisyonu değerleri, büyüme inhibisyon kategorisine (Growth Inhibition Category, GIC) göre 0-4 arasında derecelendirilmiştir. 0:Büyüme inhibisyonu yok, 1:%1-25 büyüme inhibisyonu, 2:%26-50 büyüme inhibisyonu, 3:%51-75 büyüme inhibisyonu, 4:%76-100 büyüme inhibisyonu (Alvindia and Natsuaki, 2009; ŽIVKOVIC et al., 2010; Mahmoud et al., 2015; Soltan et al., 2022).



Şekil 3.1. İkili kültür testi için şematize gösterim.

3.2.3. *Bacillus* izolatları tarafından antifungal lipopeptid üretiminin incelenmesi

3.2.3.1. Ön tarama testi olarak hemolitik aktivitenin belirlenmesi

Hemolitik aktivite testinde şeffaf zon oluşumu biyosüpfaktan üretiminin bir göstergesi olduğundan *Bacillus* izolatları ticari olarak temin edilen kanlı agar besiyerine üç nokta şeklinde inoküle edilmiştir. Petriler 30°C’de 72 saat boyunca inkübe edildikten sonra incelenmiştir ve oluşan şeffaf zon çapları üç farklı yerden ölçülerek ortalaması alınmıştır. Pozitif kontrol olarak insan patojeni olan *Staphylococcus aureus* BAA-40 suşu kullanılmıştır. Çalışma her bir izolat için üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Thavasi et al., 2011; Deepak and Jayapradha, 2015; Shoeb et al., 2015; Mouafi et al., 2016; Kumar et al., 2017; Sarwar et al., 2018).

3.2.3.2. Antifungal lipopeptidlerin üretimi

Bacillus izolatlarının antifungal lipopeptid üretimlerinin incelenmesi için LB besiyeri kullanılmıştır. 250 ml’lik erlenlerde 100 ml olacak şekilde hazırlanıp steril edilen besiyerlerine Nutrient broth besiyerinde 24 saat 30°C’de inkübe edilen izolatlardan, üç tekrarlı olacak şekilde erlenlere %2 oranında inokülasyon yapılmıştır. Erlenler çalkalamalı inkübatörde 30°C ve 150 rpm’de 96 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 45 ml kültür sıvısı, 15 dakika süresince 9000 rpm’de santrifüjlenerek ekstraksiyon işleminin gerçekleştirileceği süpernatant elde edilmiştir (Chen et al., 2008; Grover et al., 2010; Beriç et al., 2012; Kumar et al., 2012a; Al-Saraireh et al., 2015; Khattab et al., 2016; Dimkiç et al., 2017; Mardanova et al., 2017).

3.2.3.3. Antifungal lipopeptidlerin etil asetat kullanılarak ekstraksiyonu

Kısım 3.2.3.2’de anlatıldığı gibi elde edilmiş olan süpernatantlar 1:1 oranında etil asetat ile ekstrakte edilmiştir ve etil asetat fazı ayırma hunisi yardımıyla kültür sıvısından ayrılmıştır. Elde edilen ekstrakt fazı 40°C’de döner vakumlu evaporatörde uçurulmuştur. Kalan presipitat 2 ml etil asetat içerisinde çözülerek ham ekstrakt elde edilmiştir. Elde edilen ham ekstrakt, 0,45 µm por çaplı naylon şırınga filtresinden geçirilerek steril edilmiştir ve ileride yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır (Beriç et al., 2012; Al-Saraireh et al., 2015; Khattab et al., 2016; Dimkiç et al., 2017).

3.2.3.4. Antifungal lipopeptidlerin HCl-Metanol kullanılarak ekstraksiyonu

Literatürde kullanılan yöntemler incelendikten sonra bu çalışmada kullanılan modifiye ekstraksiyon yöntemi belirlenmiştir. Kısım 3.2.3.2’de anlatıldığı gibi elde edilen süpernatantların pH değeri 2,0 oluncaya kadar 6 N HCl eklenmiştir ve gece boyunca +4°C’de bekletilmiştir. Daha sonra 15 dakika süresince 9000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Elde edilen pelletler 2 ml metanol ile iki kez ekstrakte edilmiştir. İkinci ekstraksiyon işlemi sonrası toplamda 4 ml metanolde ham ekstrakt elde edilmiştir. Elde edilen ham ekstrakt, 0,45 µm por çaplı naylon şırınga filtresinden geçirilerek steril edilmiştir ve ileride yapılacak çalışmalar için -20°C’de saklanmıştır (Chen et al., 2008; Chen et al., 2010; Chenniappan et al., 2019; Cozzolino et al., 2020; Grover et al., 2010; Liu et al., 2012; Zhang et al., 2012; Kumar et al., 2012a; Dimkiç et al., 2017; Mardanova et al., 2017; Bartal et al., 2018; Meena et al., 2018; Sarwar et al., 2018; Soussi et al., 2019; Meena et al., 2020; Chen et al., 2021).

3.2.3.5. Ham ekstraktların agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile antifungal etkisinin belirlenmesi

Ham ekstrakt örneklerinde *Bacillus* izolatları tarafından üretildiği düşünülen lipopeptid antibiyotiklerin fitopatojenik funguslara karşı antifungal etkisinin belirlenmesi amacıyla 3.2.3.3 ve 3.2.3.4’te anlatılan yöntemler kullanılarak elde edilen ve -20°C’de saklanmış olan ham ekstraktlar agar kuyucuk difüzyon yönteminde antifungal etkinin incelenmesi amacıyla kullanılmıştır. Yüzde büyüme inhibisyon değeri açısından daha iyi sonuç veren yöntem seçilerek *Bacillus* izolatlarından lipopeptid antibiyotiklerin ekstraksiyonu amacıyla kullanılmıştır.

Bu amaçla, her izolat için elde edilen ham ekstraktlardan 100 µl, PDA içeren petriplakasında steril içi boş cam çubuk ile açılan kuyucuğa konulmuştur. Bu kuyucuğun karşısına arada 5 cm mesafe olacak şekilde fitopatojenik fungus kolonisinden alınan agar diskisi yerleştirilmiştir. Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ham ekstrakt içermeyen petri plakaları kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca, metanolün fitopatojenler üzerindeki inhibisyon etkisi de agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. *Botrytis cinerea* ve *Fusarium solani* içeren petri kapları 10 gün süreyle, *Rhizoctonia solani* içerenler ise 5 gün süreyle 30°C’de inkübe edilmişlerdir. Bu üç fitopatojenik fungusa karşı *Bacillus* izolatlarının yüzde büyüme inhibisyon değerleri hesaplanmıştır ve GIC’ye göre

derecelendirilmiştir (Grover et al., 2010; Raton et al., 2012; Meena et al., 2014; Meena et al., 2018).

3.2.3.6. Ham ekstraktların Kuadrupol Uçuş Zamanlı (Q-TOF) Kütle Kromatografisi ile kantitatif analiz

Antifungal etkileri belirlenmek üzere yüzde büyüme inhibisyon değeri açısından daha iyi sonuç veren yönteme göre gerçekleştirilmiş ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ham ekstraktlar içerisindeki sürfaktin (m/z 1036) ve iturin A (m/z 1043) lipopeptid antibiyotiklerin miktarının belirlenmesi Q-TOF ile kantitatif inceleme sonucu gerçekleştirilmiştir. Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu kısmı Ege-MATAL'da hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir (Chen et al., 2010; Wen et al., 2011; Toral et al., 2018; Xu et al., 2018; Wu et al., 2019).

3.2.4. *Bacillus* izolatlarının litik enzim üretimlerinin incelenmesi

3.2.4.1. Proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

3.2.4.1.1. Sıvı kültürde proteaz enzim üretimi

Bacillus izolatlarının sıvı besiyerinde proteaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla 250 ml'lik erlenlerde 50 ml olacak şekilde Kısım 3.1.2.1'de içeriği verilen proteaz enzim üretim ortamı hazırlanmıştır. Nutrient broth besiyerinde 24 saat 30°C'de inkübe edilen izolatlardan, her izolat için üç erlene %2 oranında inokülasyon yapılmıştır. Erlenler, çalkalamalı inkübatörde 30°C ve 150 rpm'de 72 saat süresince inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda kültür sıvısı, 15 dakika süresince 9000 rpm'de santrifüjlenerek proteaz enzim aktivite tayininin yapılacağı süpernatant elde edilmiştir (Maral, 2012).

3.2.4.1.2. Proteaz enzim aktivite tayini

450 µl %1 Azokazein çözeltisi (Bkz. 3.1.2.2) ve 50 µl enzim sıvısı 30 dakika boyunca 50°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon 250 µl %25 Trikloroasetik asit çözeltisi (Bkz. 3.1.2.2) eklenerek durdurulmuştur. 10000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra 600 µl süpernatant ve 600 µl 1N NaOH karıştırılmıştır. Elde edilen örneğin absorbans değeri 440 nm'de okunmuştur. Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Proteaz enzim aktivitesi,

bir dakikada absorbans değeri 0,01 oranında artış olarak tanımlanmaktadır. 1U Proteaz = (Abs/0,01)/30 x 20 (Maral, 2012; Bhowmik et al., 2015). Her bir örnek için protein miktarı Kısım 3.2.4.3.4'te anlatıldığı gibi belirlenmiştir ve proteaz enzimi için spesifik aktivite değeri hesaplanmıştır.

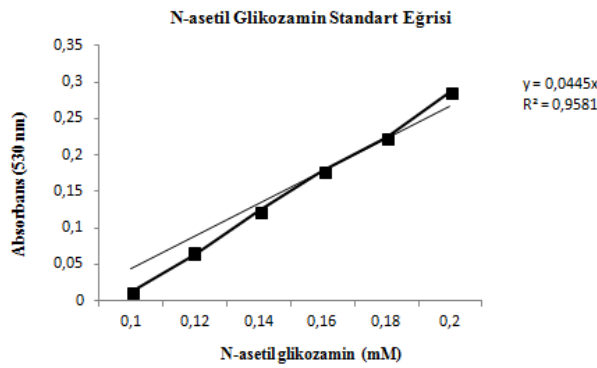
3.2.4.2. Kitinaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

3.2.4.2.1. Sıvı kültürde kitinaz enzim üretimi

Bacillus izolatlarının sıvı besiyerinde kitinaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla 250 ml'lik erlenlerde 50 ml olacak şekilde Kısım 3.1.2.1'de verilen kitinaz enzim üretim ortamı hazırlanmıştır. Nutrient broth besiyerinde 24 saat 30°C'de inkübe edilen izolatlardan, her izolat için üç erlene %2 oranında inokülasyon yapılmıştır. Erlenler çalkalamalı inkübatörde 30°C ve 150 rpm'de 120 saat süresince inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda kültür sıvısı, 15 dakika süresince 9000 rpm'de santrifüjlenerek kitinaz enzim aktivite tayininin yapılacağı süpernatant elde edilmiştir (Liaqat, 2018).

3.2.4.2.2. Kitinaz enzimi için standart eğri grafiği

Kitinaz enzim aktivitesini belirlemek amacıyla standart olarak N-asetil-glukozamin kullanılmıştır ve çizilen standart eğri grafiği Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Kitinaz enzim aktivitesi için standart eğri grafiği.

3.2.4.2.3. Kitinaz enzim aktivite tayini

Kitinaz enzim aktivitesi %1 koloidal kitin kullanılarak DNS yöntemi ile belirlenmiştir. 0,9 ml %1 koloidal kitin (0,1 M sodyum asetat tamponu, pH 5,5) ve 0,1 ml üretim sıvısı 60 dakika boyunca 55°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 1 ml DNS çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve kullanılmayan kitosanın uzaklaştırılması amacıyla 5 dakika boyunca 9000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. Elde edilen süpernatant 5 dk kaynatılıp soğutulduktan sonra 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değeri ölçülmüştür. Çalışma 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Standart eğri grafiğinden elde edilen formül kullanılarak kitinaz enzim aktivite miktarı hesaplanmıştır. 1 U kitinaz aktivitesi, 1 saatte 1 µmol indirgen şeker oluşturmak için gerekli enzim miktarı olarak kabul edilmiştir. Her bir örnek için protein miktarı Kısım 3.2.4.3.4’te anlatıldığı gibi belirlenmiştir ve kitinaz enzimi için spesifik aktivite hesaplanmıştır (Vahed et al., 2013).

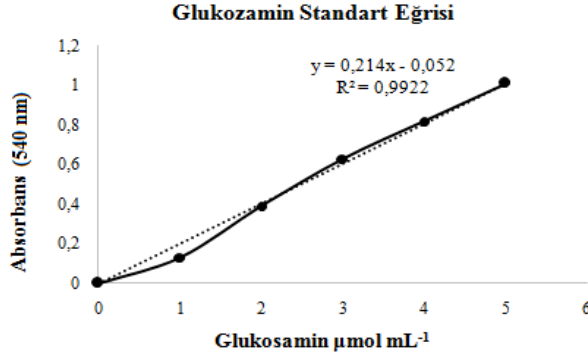
3.2.4.3. Kitosanaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

3.2.4.3.1. Sıvı kültürde kitosanaz enzim üretimi

Bacillus izolatlarının sıvı besiyerinde kitosanaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla 250 ml’lik erlenlerde 50 ml olacak şekilde Kısım 3.1.2.1’de verilen kitosanaz enzim üretim ortamı hazırlanmıştır. Nutrient broth besiyerinde 24 saat 30°C’de inkübe edilen izolatlardan, her izolat için üç tekrarlı olacak şekilde erlenlere %2 oranında inokülasyon yapılmıştır. Erlenler çalkalamalı inkübatörde 30°C ve 150 rpm’de 120 saat süresince inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda kültür sıvısı, 15 dakika süresince 9000 rpm’de santrifüjlenerek kitosanaz enzim aktivite tayininin yapılacağı süpernatant elde edilmiştir (Liaqat, 2018).

3.2.4.3.2. Kitosanaz enzimi için standart eğri grafiği

Kitosanaz enzim aktivitesini belirlemek amacıyla standart olarak D-glukozamin kullanılmıştır ve çizilen standart eğri grafiği Şekil 3.3’te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Kitosanaz enzim aktivitesi için standart eğri grafiği.

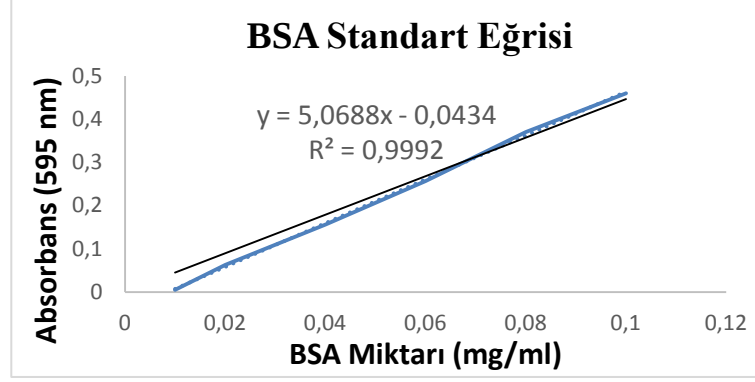
3.2.4.3.3. Kitosanaz enzim aktivite tayini

Kitosanaz enzim aktivitesi %1 kolloidal kitosan kullanılarak DNS yöntemi ile belirlenmiştir. 0,9 ml %1 kolloidal kitosan (0,2 M sodyum asetat tamponu, pH 5,5) ve 0,1 ml üretim sıvısı 10 dakika boyunca 50°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 1 ml DNS çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve kullanılmayan kitosanın uzaklaştırılması amacıyla 5 dakika boyunca 9000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant 5 dk kaynatılıp soğutulduktan sonra 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülmüştür. Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Standart eğri grafiğinden elde edilen formül kullanılarak kitosanaz enzim aktivite miktarı hesaplanmıştır. 1 U kitosanaz aktivitesi, 1 saatte 1 µmol indirgen şeker oluşturmak için gerekli enzim miktarı olarak kabul edilmiştir. Her bir örnek için protein miktarı Kısım 3.2.4.3.4’te anlatıldığı gibi belirlenmiştir ve kitosanaz enzimi için spesifik aktivite hesaplanmıştır (Liaqat, 2018).

3.2.4.3.4. Protein tayini

Proteaz, kitinaz ve kitosanaz enzim aktivitesi ölçülen her örnekte Bradford yöntemi kullanılarak protein tayini de gerçekleştirilmiştir (Bradford, 1976). Bu amaçla, ticari olarak satılan Bradford Reagent (Merck, 110306) kullanılmıştır. Standart olarak ise Bovine Serum Albumine (BSA) kullanılmıştır ve standart eğri grafiği çizilmiştir (Şekil 3.4). Her üç enzim için de spesifik enzim aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Spesifik Enzim Aktivitesi (U/mg)} = \frac{\text{Toplam Enzim Aktivitesi}}{\text{Toplam Protein Miktarı}}$$



Şekil 3.4. Protein miktarı için standart eğri grafiği.

3.2.5. HCN üretiminin belirlenmesi

Kısım 3.1.2.1’de belirtilen HCN üretimi için hazırlanan petri plakalarına her bir *Bacillus* izolatından çizgi ekim yapılmıştır. Daha sonra Kısım 3.1.2.2’de içeriği verilmiş olan pikrik asit çözeltisine batırılmış steril Whatman no:1 filtre kağıtları petri kaplarının kapaklarına aseptik koşullarda yerleştirilmiştir. Parafilm ile sarılan petriler 30°C’de 4 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Filtre kağıdında oluşan farklı renk değişimleri incelenerek *Bacillus* izolatlarının HCN üretim potansiyelleri belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak HCN ürettiği bilinen *Pseudomonas spp.* izolatı kullanılmıştır. HCN üretimleri dört farklı skalada değerlendirilmiştir: Sarı renk:0; Krem:1, Açık kahverengi:2 Koyu kahverengi:3; Kırmızı kahverengi:4 (Ahmad et al., 2008; Kumar et al., 2012b; Ghodsalavi et al., 2013).

3.2.6. Siderofor üretiminin belirlenmesi

Bacillus izolatlarının siderofor üreten üretenlerinin belirlenmesi amacıyla Kısım 3.1.2.1’de belirtilen siderofor üretim ortamı CAS Agar hazırlanmıştır. Petri kaplarına dökülüp katılan her bir petri plağına tek bir türden üç tekrarlı olacak şekilde nokta ekim yapılmıştır. Petriler 30°C’de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmışlardır ve turuncu zon oluşturan izolatların zon çapı ve bakteri çapı için ölçüm alınmıştır (Ghodsalavi et al., 2013; Sharma et al., 2013). Siderofor üretici izolatlar için aşağıdaki formül kullanılarak siderofor indeks değeri hesaplanmıştır (Abirammi et al., 2018).

$$\text{Siderofor indeks değeri} = \frac{\text{Oluşan zon çapı}}{\text{Bakteri koloni çapı}}$$

3.2.7. *Bacillus* izolatlarının patojenitesinin incelenmesi

Her üç fitopatojen fungusa karşı da hem ikili kültür testi yöntemi ile hem de agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile etkili olarak bulunan *Bacillus* izolatlarının koagülaz aktivitesi incelenmiştir. *Bacillus* izolatları nutrient broth besiyerinde 24 saat 30°C’de inkübe edilmiştir. Aktifleştirilen bakteri kültürlerinden 200 µl alınarak 1 ml steril defibrine edilmiş kan plazması üzerine eklenmiştir. 37°C’de 4 saat boyunca inkübe edilmiştir ve her saat başı tüplerdeki değişim takip edilmiştir. Tüm örnekler sonuçtan emin olmak adına 37°C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Tüplerde oluşan viskozite artışı veya pıhtılaşma pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Jungkind et al., 1984; Lopez and Alippi, 2009; Riskuwa-Shehu et al., 2019). Koagülaz pozitif izolatlar 1-4 arasında derecelendirilmiştir. Buna göre; 1) Küçük düzensiz pıhtılar, 2) Küçük düzenli pıhtılar; 3) Büyük düzenli pıhtılar; 4) Tüp içeriğinin tamamı pıhtılaşır ve tüp ters çevrildiği zaman bile yer değiştirmez (Sperber and Tatini, 1975).

3.2.8. *Bacillus* izolatlarının moleküler tanımlanması

Tez çalışması kapsamında biyokontrol özellikleri incelenen *Bacillus* izolatlarından olası biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılabilecek yüksek miktarda lipopeptid üreten ve yüksek antifungal etkiye sahip olanlar arasından seçilen 19 adet *Bacillus* izolatının tür tanımlaması hizmet alımı şeklinde BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti. tarafından yapılmıştır. NCBI üzerindeki en yakın tür baz alınarak gerçekleştirilen eşleştirmelere göre sonuçlar belirlenmiştir. Ancak, bazı izolatlarda benzerlik oranı ve dizi eşleşme oranı aynı olan farklı türler olduğu görülmüştür. Bu nedenle izolatların hangi tür olduğunun belirlenmesi amacıyla polifazik moleküler tanımlama yöntemi kullanılmıştır. Bu izolatların morfolojik özellikleri, Tween 20, Tween 80 (Ruiz-Garcia et al., 2005) ve sitrat kullanımları (Wu and Ahn, 2011; Seenivasan et al., 2012; Kumar et al., 2015; Ge et al., 2016; Rajashekhar et al., 2017; Yuan et al., 2019; Akarapisan et al., 2020; Ngalimat et al., 2021) incelenmiştir. Filogenetik ağaç, Neighbor Joining (NJ) yöntemi kullanılarak çıkarılmıştır.

3.2.9. Seçilen *Bacillus* izolatlarının biyokütle üretiminin incelenmesi

Tür tanımlaması yapılan izolatlar arasından yüksek antifungal etki gösteren ve farklı türe ait olduğu belirlenenlerden beş tanesi seçilerek biyokütle üretim

kapasiteleri belirlenmiştir. Bu amaçla, Nutrient broth besiyerinde 24 saat 30°C’de inkübe edilen her tür için üç tekrarlı olacak şekilde 500 ml’lik erlenlerde 100 ml LB sıvı besiyerine %2 oranında inokülasyon yapılmıştır. 30°C ve 150 rpm’de çalkalamalı inkübatörde 5 gün süreyle üretim gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonucunda dökme plaka yöntemi kullanılarak canlı hücre sayımı koloni oluşturan birim (kob/ml) olarak hesaplanmıştır (Yezza et al., 2004). İncelenen tüm antifungal özelliklere göre en yüksek antagonistik aktiviteyi gösteren ve kitlesel üretim için uygun olduğu düşünülen tür biyokütle üretim optimizasyonunda kullanılmak üzere seçilmiştir.

3.2.10. Seçilen suş için büyüme eğrisinin belirlenmesi

LB sıvı besiyeri içeren tüplerde 24 saat boyunca 30°C’de aktifleştirilen kültürden %2 oranında alınarak 100 ml LB sıvı besiyeri içeren 500 ml’lik erlenlere inokülasyon yapılmıştır. Aşı kültürü olarak hazırlanan bu erlenler 12 saat, 180 rpm ve 30°C’de aktifleştirildikten sonra, bu erlenlerden 400 ml LB sıvı besiyeri içeren 2 lt’lik üretim erlenlerine %2 oranında inokülasyon yapılmıştır. Üretim 180 rpm ve 30°C’de gerçekleştirilmiştir ve 4 gün süreyle farklı zamanlarda örnekler alınmıştır. Alınan örneklerden 0., 3., 6., 9., 12., 15., 18., 21., 24., 30., 36., 42., 48., 60., 72., 84. ve 96. saatlerde canlı hücre sayımı, OD ölçümü ve lipopeptid ekstraksiyonu yapılmıştır. Lipopeptid ekstraktlarının antifungal etkisi agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle *B.cinerea*, *F.solani* ve *R.solani*’ye karşı belirlenmiştir. Ayrıca alınan her örnek için pH ölçümü de yapılmıştır (Zhao et al., 2014; Ryu et al., 2020).

3.2.11. Seçilen suş için laboratuvar ölçeğinde üretim ortamı optimizasyonu

3.2.11.1. Çeşitli karbon ve azot kaynakları ile diğer üretim ortamı bileşenlerinin hücre büyümesi ve antifungal etki üzerindeki etkisinin incelemesi

Seçilen suşun canlı hücre sayısının ve antifungal etkisinin artırılmasına glikoz, fruktoz, sakkaroz, mısır nişastası, patates ekstraktı, melas, peynir altı suyu, laktoz, maltoz, inulin, tween 20, tween 80, pirinç unu, gliserol, atık yağ, zeytinyağı gibi farklı karbon kaynaklarının (Luo et al., 2013; Bertrand et al., 2018; Fooladi et al., 2018; Meena et al., 2018; Ming et al., 2019; Dang et al., 2019; Singh et al., 2019; Petrila et al., 2020), pepton, soya unu, NH₄Cl, üre, maya ekstraktı, et ekstraktı, tripton, (NH₄)₂SO₄, damıtık mısır+çözünür maddeleri

(DMÇM) (Distillers Dried Grain with Solubles, DDGS), sodyum glutamat, KNO_3 , NaNO_3 , mısır ıslatma sıvısı gibi azot kaynaklarının (Luo et al., 2013; Bertrand et al., 2018; Fooladi et al., 2018; Meena et al., 2018; Ming et al., 2019; Dang et al., 2019; Singh et al., 2019; Petrila et al., 2020) ve CaCl_2 , MgCl_2 , KH_2PO_4 , FeCl_3 , ZnSO_4 , MnSO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , CuSO_4 , KI , K_2HPO_4 , CoCl_2 , EDTA, H_3PO_4 , H_3BO_3 , NaCl , MnCl_2 gibi diğer besiyeri bileşenlerinin (Bertrand et al., 2018; Singh et al., 2019; Petrila et al., 2020) etkisi incelenmiştir.

Tüm bileşenler 100 ml Luria Bertani sıvı besiyeri içeren 500 ml'lik erlene üç tekrarlı olacak şekilde %1 oranında eklenmiştir. Daha sonra, Kısım 3.2.10'daki gibi büyütülen aşı kültüründen %2 oranında inokülasyon yapılarak 180 rpm ve 30°C 'de 3 gün süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sonucunda alınan örneklerden canlı hücre sayısı ve lipopeptid ekstraksiyonu gerçekleştirilerek *F.solani*'ye karşı yüzde büyüme inhibisyon değeri belirlenmiştir. Karbon ve azot kaynakları ile diğer besiyeri bileşenlerinin her birinden en iyi sonucun alındığı üç besiyeri bileşeni daha sonra gerçekleştirilecek olan Yanıt Yüzeyi Yöntemi (Response Surface Method, RSM) ile üretim ortamı optimizasyonu çalışmasında kullanılmak üzere seçilmiştir (Zhao et al., 2014; Meena et al., 2018).

3.2.11.2. Seçilen üretim ortamı bileşenlerinin hücre büyümesi ve antifungal aktivite üzerindeki etkisinin incelenmesi

Kısım 3.2.11.1'de anlatıldığı şekilde seçilen üç farklı besiyeri bileşeni farklı oranlarda birlikte kullanıldıklarında hücre büyümesi ve antifungal aktivite üzerinde gösterdikleri etki incelenmiştir. Bu amaçla Çizelge 3.3'te gösterilen miktarlarda besiyeri bileşenlerini içeren üretim ortamları hazırlanmıştır (Besiyeri 1-7). Ayrıca incelenen bileşenlerin her birinin %1 oranında eklendiği LB sıvı besiyeri (Besiyeri 8) ve kontrol olarak sadece LB sıvı besiyeri kullanılmıştır.

Çizelge 3.3'te verilen besiyerlerinin her birine kısım 3.2.10'daki gibi büyütülen aşı kültüründen %2 oranında inokülasyon yapılarak 180 rpm ve 30°C 'de 3 gün süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sonucunda alınan örneklerden canlı hücre sayısı ve lipopeptid ekstraksiyonu gerçekleştirilerek *F.solani*'ye karşı yüzde büyüme inhibisyon değeri belirlenmiştir. Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu deneme setinde farklı miktarlarda kullanılan besiyeri bileşenlerinden yola çıkılarak RSM ile üretim ortamı optimizasyonunda kullanılacak değer aralıkları belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Hazırlanan besiyerlerinde bulunan karbon ve azot kaynakları ile diğer besiyeri bileşenlerinin miktarları.

Kullanılan besiyerleri	Besiyeri bileşenleri (%)		
	En uygun karbon kaynağı	En uygun azot kaynağı	En uygun diğer besiyeri bileşeni
Besiyeri 1	1	1	1
Besiyeri 2	1	10	1
Besiyeri 3	5	10	1
Besiyeri 4	1	10	0,5
Besiyeri 5	5	10	0,5
Besiyeri 6	10	10	0,5
Besiyeri 7	10	10	1
Besiyeri 8	LB + 1	LB + 1	LB + 1
Kontrol	LB sıvı besiyeri		

3.2.11.3. Seçilen üretim ortamı bileşenlerinin RSM ile optimizasyonu

Seçilen suş için en yüksek canlı hücre sayısının ve büyüme inhibisyon değerinin elde edildiği besiyeri bileşenlerinin birlikte etkilerinin incelendiği Kısım 3.2.11.2’de anlatılan ön denemeden yola çıkılarak Box-Behnken denemesinde kullanılacak minimum ve maksimum referans değerleri olarak karbon kaynağı için %0,1-1, azot kaynağı için %1-10 ve diğer besiyeri bileşeni için ise %0,5-1 değer aralıkları belirlenmiştir. On yedi deney setinden oluşan çalışmada hazırlanan besiyeri bileşenlerinin miktarları Çizelge 3.4’te verilmiştir. Öngörülen/tahminlenen yanıt olarak canlı hücre sayısı (kob/ml) ve antifungal etki (yüzde büyüme inhibisyon değeri) incelenmiştir.

Tasarlanan 17 deney seti için farklı miktarlarda bileşenleri içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Kısım 3.2.10’daki gibi büyütülen aşı kültüründen %2 oranında inokülasyon yapılarak 180 rpm ve 30°C’de 3 gün süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonucunda alınan örneklerden canlı hücre sayısı ve lipopeptid ekstraksiyonu gerçekleştirilerek *F.solani*’ye karşı yüzde büyüme inhibisyon değeri belirlenmiştir. Elde edilen veriler programda yanıt olarak girilerek üretim ortamı içerikleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. Üç değişkenli Box-Behnken deney tasarımında kullanılan besiyeri bileşenlerinin miktarları.

	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3
	A: Karbon kaynağı (%)	B: Azot kaynağı (%)	C: Diğer besiyeri bileşeni (%)
1	0.10	1.0	0.75
2	1.00	1.0	0.75
3	0.10	10.0	0.75
4	1.00	10.0	0.75
5	0.10	5.50	0.50
6	1.00	5.50	0.50
7	0.10	5.50	1.00
8	1.00	5.50	1.00
9	0.55	1.00	0.50
10	0.55	10.00	0.50
11	0.55	1.00	1.00
12	0.55	10.00	1.00
13	0.55	5.50	0.75
14	0.55	5.50	0.75
15	0.55	5.50	0.75
16	0.55	5.50	0.75
17	0.55	5.50	0.75

3.2.11.4. Üretim ortamı tasarımı için validasyon

Box-Behnken deney tasarımı ile seçilen besiyeri bileşenleri için belirlenen optimum miktarları içeren üretim ortamlarında seçilen suş için üretim gerçekleştirilmiştir. Kısım 3.2.10'daki gibi büyütülen aşısı kültüründen %2 oranında üç tekrarlı olacak şekilde inokülasyon yapılarak 180 rpm ve 30°C'de 3 gün süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonucunda alınan örneklerden canlı hücre sayısı ve lipopeptid ekstraksiyonu gerçekleştirilerek *F.solani*'ye karşı yüzde büyüme inhibisyon değeri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile RSM sonucu tahminlenen değerler karşılaştırılarak besiyeri optimizasyonu çalışmasının geçerliliği değerlendirilmiştir.

3.2.11.5. Üretim ortamına gliserol eklenmesinin canlı hücre sayısı ve antifungal etkiye olan etkisinin incelenmesi

Mikrobiyal üretimlerde karbon kaynağı olarak kullanılan gliserolün biyolojik mücadele preparatlarının sıvı formülasyonunda koruyucu olarak kullanılması da oldukça yaygındır. Gliserol yüksek mikrobiyal sayıların korunmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca abiyotik stress faktörlerine karşı daha yüksek direnç gösteren kist ve sporların oluşumunu teşvik etmektedir. Böylece bakterilerin hayatta kaldıkları süreyi uzatmaktadır (Vassilev et al., 2017; Gopi et al., 2019; Lobo et al., 2019). Bu nedenle, Kısım 3.2.11.4'te optimize edilen üretim ortamı içerisine %1, %2, %5 ve %10 oranında gliserol ilave edilmiştir. Kısım 3.2.10'daki gibi büyütülen aşı kültüründen %2 oranında inokülasyon yapılmıştır ve 180 rpm çalkalayıcı hızında 3 gün süreyle 30°C inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonucunda alınan örneklerden canlı hücre sayısı ve lipopeptid ekstraksiyonu gerçekleştirilerek *F.solani*'ye karşı yüzde büyüme inhibisyon değeri belirlenmiştir.

3.2.12. Seçilen suş için laboratuvar ölçeğinde üretim parametrelerinin optimizasyonu

Seçilen suş için üretim parametreleri arasından sıcaklık bir seferde tek faktör yöntemi kullanılarak optimize edilirken, çalkalayıcı hızı (rpm), pH değeri ve inokülasyon oranı (%) Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak RSM ile optimize edilmiştir.

3.2.12.1. Seçilen suş için sıcaklık optimizasyonu

Altı farklı sıcaklığın canlı hücre sayısı ve antifungal aktivite üzerindeki etkisi incelenmiştir. Kısım 3.2.11.4'te RSM ile optimize edilen üretim ortamı içerisine Kısım 3.2.10'daki gibi büyütülen aşı kültüründen %2 oranında inokülasyon yapılmıştır ve 180 rpm çalkalayıcı hızında 3 gün süreyle 24°C, 27°C, 30°C, 33°C, 36°C ve 40°C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, Kısım 3.2.11.4'te RSM ile optimize edilen besiyeri içerisine Kısım 3.2.11.5'te belirlenen gliserol miktarı eklenerek 180 rpm çalkalayıcı hızında 3 gün süreyle 30°C, 33°C, 36°C ve 40°C'de de üretim gerçekleştirilmiştir. Tüm çalışmalar üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonucunda alınan örneklerden canlı hücre

sayısı ve lipopeptid ekstraksiyonu gerçekleştirilerek *F.solani*'ye karşı yüzde büyüme inhibisyon değeri belirlenmiştir.

3.2.12.2. Seçilen suş için çalkalayıcı hızı (rpm), pH ve inokülasyon oranının RSM ile optimizasyonu

Seçilen suş için en yüksek canlı hücre sayısının ve büyüme inhibisyon değerinin elde edilebilmesi amacıyla Box-Behnken denemesinde kullanılacak minimum ve maksimum referans değerleri olarak çalkalayıcı hızı için 150-210 rpm, pH için 5,0-9,0 ve inokülasyon oranı için %1-5 değer aralıkları belirlenmiştir. On yedi deney setinden oluşan çalışmada kullanılan üretim parametrelerinin değerleri Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Üç değişkenli Box-Behnken deney tasarımında kullanılan üretim parametreleri için değerler.

	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3
	A: Karıştırma hızı	B: pH	C: İnokülasyon oranı (%)
1	150.0	5,0	3.0
2	210.0	5,0	3.0
3	150.0	9,0	3.0
4	210.0	9,0	3.0
5	150.0	7,0	1.0
6	210.0	7,0	1.0
7	150.0	7,0	5.0
8	210.0	7,0	5.0
9	180.0	5,0	1.0
10	180.0	9,0	1.0
11	180.0	5,0	5.0
12	180.0	9,0	5.0
13	180.0	7,0	3.0
14	180.0	7,0	3.0
15	180.0	7,0	3.0
16	180.0	7,0	3.0
17	180.0	7,0	3.0

Kısım 3.2.11.4'te RSM ile optimize edilen besiyeri içerisine Kısım 3.2.11.5'te belirlenen gliserol miktarı eklenerek optimize edilmiş olan üretim ortamına Kısım 3.2.10'daki gibi büyütülen aşı kültüründen %2 oranında

inokülasyon yapılmıştır ve 17 deney setindeki farklı koşullarda 30°C’de 3 gün süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonucunda alınan örneklerden canlı hücre sayısı ve lipopeptid ekstraksiyonu gerçekleştirilerek *F.solani*’ye karşı yüzde büyüme inhibisyon değeri belirlenmiştir. Elde edilen veriler programda yanıt olarak girilerek canlı hücre sayısını ve antifungal etkiyi arttırmaya uygun olduğu belirlenen üretim parametreleri için bundan sonraki çalışmalarda kullanılacak değerler belirlenmiştir.

3.2.12.3. Üretim parametrelerinin optimizasyonu için validasyon

Optimize edilen üretim ortamı ve optimum üretim parametreleri kullanılarak 3 gün boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Çalışma üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonucunda alınan örneklerden canlı hücre sayısı ve lipopeptid ekstraksiyonu gerçekleştirilerek *F.solani*’ye karşı yüzde büyüme inhibisyon değeri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile RSM sonucu tahminlenen değerler karşılaştırılarak üretim parametreleri optimizasyonu çalışmasının geçerliliği değerlendirilmiştir.

3.2.13. Üretim ortamı bileşenleri için maliyet hesabı

Seçilen suşun biyolojik mücadele etmeni olarak üretilmesinde kullanılmak üzere optimize edilen üretim ortamının hazır toz formda ticari olarak satılan besiyeri ile maliyet açısından karşılaştırması, 1 lt üretim ortamı hazırlamak için sadece gerekli bileşen miktarları temel alınarak yapılmıştır. Ayrıca, 1 lt üretim ortamı kullanılarak gerçekleştirilen inkübasyonlar sonucu 10^7 kob/ml canlı hücre sayısı içerecek şekilde formüle edilmiş ürünü üretebilmek için sadece gerekli üretim ortamı bileşenleri için de maliyet karşılaştırması yapılmıştır.

3.2.14. İstatistiksel analiz

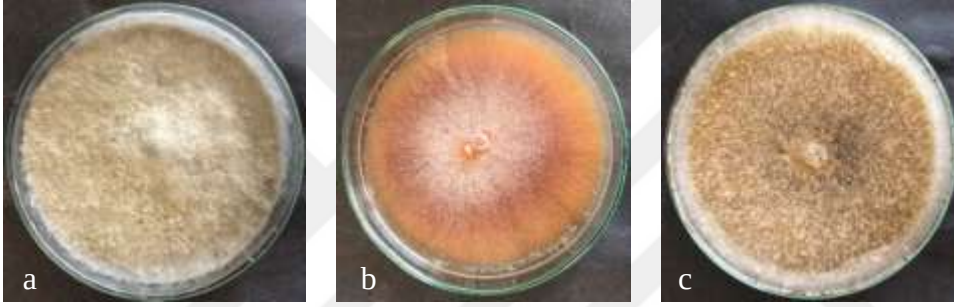
Tez çalışması kapsamında tüm çalışmalar üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve standart sapma değeri hesaplanmıştır. Veri setleri, önemli farklılıklar açısından SPSS paket program kullanılarak ANOVA ile incelenmiştir. $p < 0.05$ ’teki farklılıklar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Ortalama $\pm$ standart hata ($n=3$) olarak belirtilen değerlerdeki önemli farklılıkları göstermek için Tukey Aralık Testi kullanılmıştır (SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Bacillus* İzolatlarının in vitro koşullarda Antifungal Etkisinin İncelenmesi

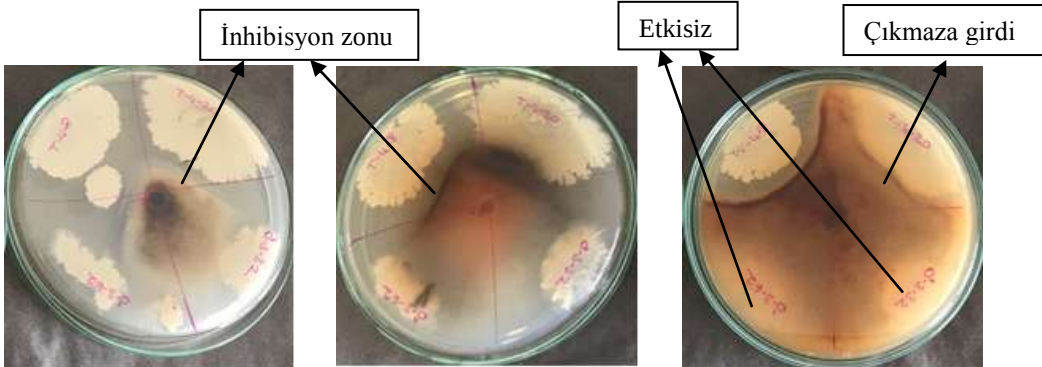
4.1.1. Dörtlü ekim tekniği ile ön tarama

Çalışmamızda çok sayıda *Bacillus* izolatu tarandığı için, malzeme, zaman ve iş gücünden tasarruf etmek amacıyla dual test modifiye edilerek PDA besiyeri içeren petri plaklarında gerçekleştirilen dörtlü ekim yöntemi ile toplamda 1574 adet *Bacillus* izolatının antifungal etkisi incelenmiştir. Kullanılan fitopatojenik funguslara ait kontrol petrilerinin görüntüleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



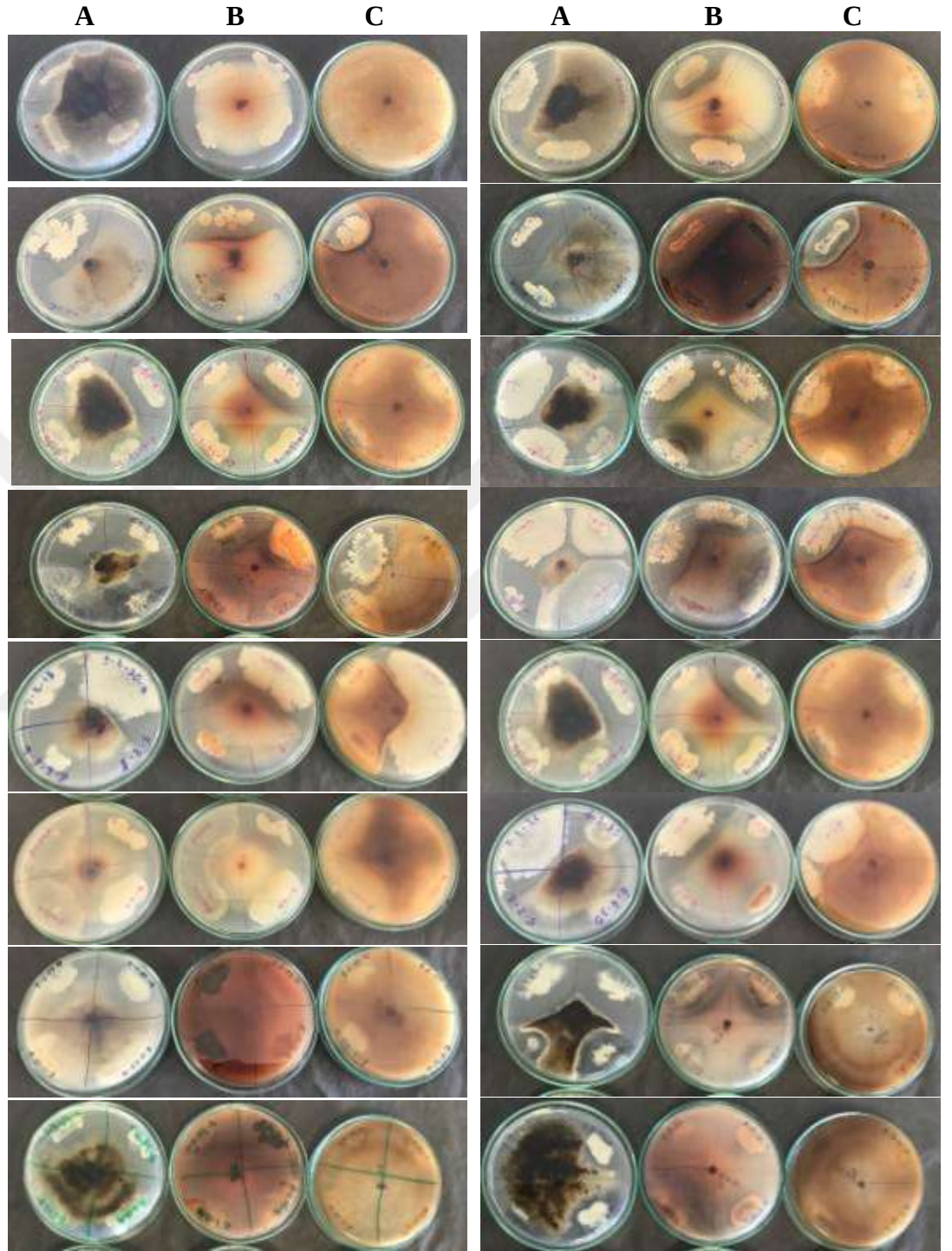
Şekil 4.1. Fitopatojenik fungusların 10.gündeki koloni morfolojileri; a) *Botrytis cinerea*, b) *Fusarium solani*, c) *Rhizoctonia solani*.

Bacillus izolatları ile her bir fitopatojen fungus arasındaki etkileşimler incelendiğinde (Şekil 4.2); iki türün birbirine değemediği aralarında boş bir alan oluşturdukları etkileşim şekli “**İnhibisyon zonu**”, iki türün birbirine değdiği fakat birbirleri üzerine büyüyemedikleri etkileşim şekli “**Çıkmaza girdi**” ve fitopatojenik fungusların bakteri izolatları üzerine büyüyebildiği etkileşim şekli ise “**Etkisiz**” olarak sınıflandırılmıştır (Berger et al., 2015; Krause et al., 2020; D’Ambrosio et al., 2022; VS et al., 2022).



Şekil 4.2. Antifungal etkinin sınıflandırılmasında kullanılan etkileşim şekilleri için örnekler.

Üç fitopatojen fungusa karşı antifungal etkileri incelenen bazı *Bacillus* izolatlarına ait petri görüntüleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

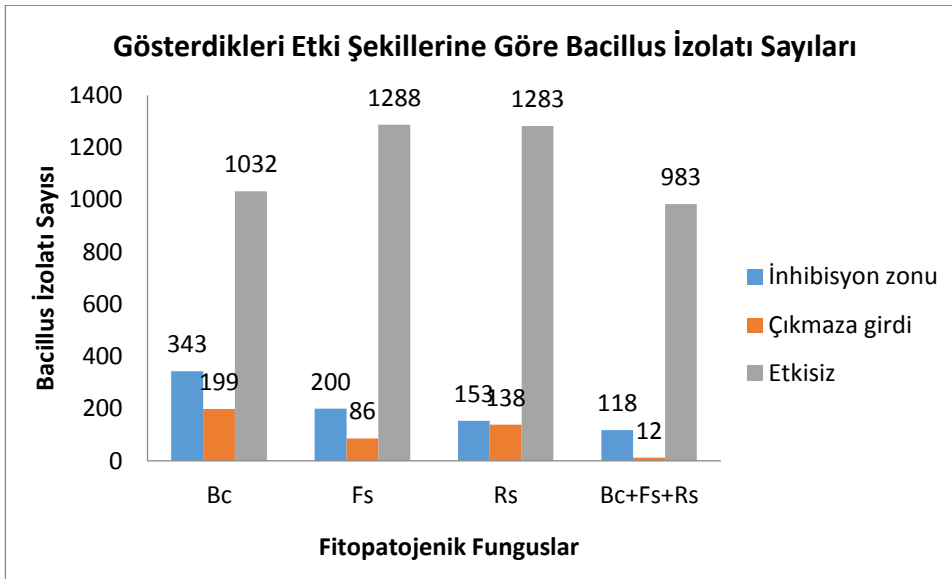


Şekil 4.3. Antifungal etkileri incelenen bazı *Bacillus* izolatlarının fitopatojenik funguslara karşı gösterdikleri etki şekilleri (Fitopatojenik funguslar soldan sağa doğru sırasıyla; A) *Botrytis cinerea*, B) *Fusarium solani*, C) *Rhizoctonia solani*).

Çalışmada antifungal etkileri incelenen 1574 adet *Bacillus* izolatu arasında 983 adet (%62,45) izolatin her üç fitopatojene karşı da herhangi bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. Bakteri izolatlarını içeren bu petrilerde, fitopatojenik fungusların aynı kontrol petrilerinde olduğu gibi bakteri izolatlarının üzerine büyüyerek tüm petriyi kaplayacak şekilde gelişmelerine devam ettikleri gözlemlenmiştir. Ayrıca, incelenen *Bacillus* izolatları arasında 12 adet (%0,76) izolatin ise her üç fitopatojene karşı çıkmaza girdiği belirlenmiştir. Yani, herhangi bir tür diğerine karşı üstünlük sağlayamamıştır.

Tez projesindeki amaçlardan ilkinin fitopatojenik funguslara karşı antifungal aktivite gösteren özgün ve yerel *Bacillus* izolatlarının *in vitro* koşullarda belirlenmesi olduğu düşünüldüğünde, her üç fitopatojene karşı da inhibisyon zonu oluşturabilen izolatların belirlenmesi ileride gerçekleştirilecek çalışmalar bakımından oldukça önemlidir.

Antifungal etkileri bakımından incelenen 1574 adet *Bacillus* izolatu arasında 330 adet (%21) izolatin *Botrytis cinerea*'ya, 187 adet (%11,9) izolatin *Fusarium solani*'ye ve 140 adet (%8,9) izolatin ise *Rhizoctonia solani*'ye karşı inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir. 118 adet (%7,5) *Bacillus* izolatu ise her üç fitopatojene karşı da inhibisyon zonu oluşturmuştur. Her bir fitopatojen fungusa karşı inhibisyon zonu, çıkmaza girdi ve üzerine büyüdü şeklinde etki gösteren *Bacillus* izolatlarının sayıları Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Fitopatojenik funguslara karşı gösterdikleri etki şekillerine göre *Bacillus* izolatu sayıları.

Gerçekleştirilecek sonraki çalışmalarda Çizelge 4.1’de kodları verilmiş olan 118 adet *Bacillus* izolatının kullanılması uygun görülmüştür.

Çizelge 4.1. Dörtlü ön tarama testi sonucunda her üç fitopatogene karşı da inhibisyon zonu oluşturan *Bacillus* izolatlarının kodları.

<i>Bacillus</i> izolatlarının kodları				
Ö-1-31-b	Ç-1-14	T-3-12-a	B-2-24-a-b	3-K-S-19
Ö-1-57-b	Ç-1-16-a	T-3-12-b	1-K-21	3-K-S-31
Ö-1-59-b	Ç-1-16-b	T-4-8	1-K-49	3-K-S-37
Ö-1-85	Ç-2-1-a	T-4-9	1-K-49-a	3-K-S-39-a
Ö-2-38	Ç-2-1-b	T-4-13-a	1-K-49-b	3-K-S-44
Ö-2-44-b	Ç-2-30-a	T-4-14-a	1-K-55-b	3-K-S-47
Ö-2-55-a	Ç-2-30-b	T-4-14-b	2-K-5	3-K-S-49-a
Ö-2-55-b	Ç-2-36	T-4-15	2-K-13-a	3-K-S-49-b
Ö-2-61-a	Ç-3-10	T-4-17	2-K-13-b	3-K-S-60-a
Ö-2-61-c	Ç-3-15-a	T-4-19	2-K-29	3-K-S-60-b
Ö-2-80-b	Ç-3-19	T-4-20-e-a	2-K-35-a	3-K-S-61
Ö-3-5	Ç-3-20-a	T-4-20-e-b	2-K-35-b	3-K-S-64
Ö-3-21	Ç-3-20-b	T-4-20-c-b-a	2-K-37	4-Ka-22
Ö-3-30	Ç-3-22-a	T-4-20-c-b-b	3-K-10	4-Ka-46-b
Ö-4-11-a	Ç-3-22-b	T-11-8	3-K-12-b-a	4-Ka-58-1
Ö-4-13-a	Ç-3-23	K-6-13-b-a	3-K-12-b-b	4-Ka-59-a-a
Ö-4-50	Ç-3-31	K-6-22	3-K-25	4-Ka-59-a-b
Ö-4-57-a	T-1-18	K-7-4	3-K-41-a-a	4-Ka-61-3-a
Ö-4-57-b	T-1-18-a	K-7-14-1	3-K-41-a-b	8-4-a
Ö-4-68	T-1-18-b	K-8-10-a	3-K-S-1-a	11-8
Ö-4-82	T-2-2	K-9-37-a	3-K-S-2	11-9
Ö-5-1	T-2-16	B-1-4-a-2-b	3-K-S-14	30-2
Ö-6-50-a	T-3-10	B-2-6-b	3-K-S-17-a	A-1
Ö-6-50-b	T-3-10-b-b-1	B-2-24-a-a		

Çalışmada kullanılan 1574 adet *Bacillus* izolatının *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* ve *Rhizoctonia solani* gibi fitopatojenik funguslara karşı antagonistik etkisi incelenmiştir ve her üç fitopatojene karşı da inhibisyon zonu oluşturan 118 adet izolat olası biyolojik mücadele etmeni olarak seçilmiştir.

Benzer konuda gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde bu kadar yüksek sayıda izolat ile antifungal etki bakımından gerçekleştirilen kapsamlı bir in vitro tarama çalışmasına rastlanamamıştır. Lee et al (2008), 41 adet *Bacillus* izolatının *Phytophthora capsici*'ye karşı antifungal etkisini incelemişlerdir ve 12 adet izolatın antagonistik etki gösterdiğini belirlemişlerdir. İncir bahçesinden izole edilen 92 adet *Bacillus* izolatının *Aspergillus* ve *Fusarium* türlerine karşı antagonistik etkisi incelenmiştir (Öztopuz vd., 2018). Saha et al. (2012) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada, 141 adet *Bacillus* izolatı arasından *F.solani*'ye karşı inhibisyon zonu oluşturan 33 adet izolatın 10 farklı fitopatojene karşı ikili kültür testi yöntemi ile antagonistik etkisi incelenmiştir. Vignesh et al. (2021), 20 farklı bölgeden izole ettikleri 146 adet *Bacillus* izolatının çeşitli fitopatojenik funguslara karşı antagonistik etkisini incelemişlerdir. Bir başka çalışmada Zhu et al. (2020), izole edilen 45 adet *Bacillus* izolatından 12 tanesinin *Fusarium oxysporium f. sp. niveum*'a karşı etkili olduğunu göstermişlerdir. Tez çalışmasında yerel ve çok sayıda izolat kullanılmış olması, çalışmanın özgünlüğü açısından oldukça önemlidir (Gajbhiye, A., 2010; Mardanova, A.M., 2017; Chenniappan et al., 2019).

4.1.2. İkili kültür testi yöntemi ile yüzde (%) büyüme inhibisyon değerlerinin belirlenmesi

Çalışmada ilk olarak gerçekleştirilen dörtlü ekim yönteminde her üç fitopatojene karşı da inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenen 118 adet izolat için ikili kültür testi yöntemi kullanılarak yüzde büyüme inhibisyon değeri belirlenmiştir. Bu denemede fitopatojenik funguslar için kullanılan kontrol petrileri Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Ayrıca kontrol petrilerinde *B.cinerea*, *F.solani* ve *R.solani* için 7. günde ölçülen yarıçap değerleri sırasıyla 4,80 cm, 4,03 cm ve 6,5 cm'dir.



Şekil 4.5. Çalışmada kullanılan fitopatojenik fungusların 7. gündeki kontrol petrileri (Soldan sağa; *B.cinerea*, *F.solani* ve *R.solani*).

Dörtlü ekim tekniği ile yapılan incelemede her üç fitopatojene karşı zon oluşturduğu belirlenen izolatlar, ikili kültür testi ile incelendiğinde bazılarının bir ya da birkaç fitopatojene karşı zon oluşturmadığı görülmüştür. *Bacillus* izolatlarının fitopatojenik funguslar üzerinde gerçekleştirdikleri yüzde büyüme inhibisyon değerleri (PGI) ve büyüme inhibisyon kategorisine (GIC) göre derecelendirilmeleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Her üç fitopatojenik fungusa karşı etkili çıkan *Bacillus* izolatlarının fitopatojenik funguslar üzerindeki yüzde büyüme inhibisyon değerleri ve bu değerlerin büyüme inhibisyon kategorisine (GIC) göre derecelendirilmesi.

<i>Bacillus</i> İzolat Kodları		Fitopatojenik Funguslar Üzerindeki Büyüme İnhibisyon Değerleri (%)±SS* (Büyüme inhibisyon kategorisi)		
		<i>B.cinerea</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
1	T-1-18	38,7±1,8 (2)	23,9±9,3 (1)	45,4±0 (2)
2	T-1-18-a	41,7±2,9 (2)	35,5±9,5 (2)	51,0±0 (3)
3	T-1-18-b	44,3±3,7 (2)	24,2±1,9 (1)	46,2±0 (2)
4	T-2-2	43,7±0 (2)	33,5±0,7 (2)	49,6±1,2 (2)
5	T-2-16	44,3±3,7 (2)	34,0±0 (2)	49,7±3,7 (2)
6	T-3-10	46,5±3,8 (2)	31,3±3,9 (2)	44,5±1,2 (2)
7	T-4-8	45,7±1,6 (2)	32,1±1,2 (2)	51,0±2,4 (3)
8	T-4-9	45,7±4,9 (2)	35,0±0 (2)	48,5±0,4 (2)
9	T-4-13-a	45,2±2,4 (2)	38,0±0 (2)	53,0±1,2 (3)
10	T-4-14-a	39,9±3,4 (2)	34,6±4,7 (2)	53,8±0 (3)
11	T-4-14-b	44,6±3,2 (2)	41,1±4,4 (2)	55,6±2,5 (3)

*SS:Standart sapma

Çizelge 4.2. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolat Kodları		Fitopatojenik Funguslar Üzerindeki Büyüme İnhibisyon Değerleri (%)±SS* (Büyüme inhibisyon kategorisi)		
		<i>B.cinerea</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
12	T-4-15	48,4±2,2 (2)	38,1±1,9 (2)	51,3±1,2 (3)
13	T-4-17	35,2±3,2 (2)	24,1±5,6 (1)	39,5±1,4 (2)
14	T-4-19	39,9±3,4 (2)	21,3±1,8 (1)	40,2±2,5 (2)
15	T-11-8	46,9±1,5 (2)	30,9±0,5 (2)	49,8±1,4 (2)
16	Ç-2-1-a	34,4±1,5 (2)	23,1±0 (1)	38,4±2,3 (2)
17	Ç-2-1-b	37,6±3,4 (2)	23,0±0,2 (1)	40,0±0 (2)
18	Ç-2-30-a	41,1±1,6 (2)	42,2±3,9 (2)	52,9±1,3 (3)
19	Ç-2-30-b	38,8±1,8 (2)	30,3±2,1 (2)	49,1±1,3 (2)
20	Ç-2-36	36,5±1,5 (2)	22,5±4,4 (1)	42,4±2,7 (2)
21	Ç-3-10	45,4±0 (2)	33,4±2,3 (2)	48,2±0 (2)
22	Ç-3-15-a	43,4±1,6 (2)	36,7±3,9 (2)	48,2±0 (2)
23	Ç-3-19	50,3±4,9 (2)	35,4±5,8 (2)	53,9±2,5 (3)
24	Ç-3-22-a	45,4±0 (2)	41,1±4,4 (2)	49,6±1,2 (2)
25	Ç-3-22-b	50,3±4,9 (2)	33,4±2,3 (2)	47,2±1,4 (2)
26	Ç-3-23	49,2±0 (2)	36,7±3,9 (2)	50,0±5,4 (2)
27	Ç-3-31	42,0±0,4 (2)	28,5±0 (2)	47,7±2,2 (2)
28	Ö-1-31-b	46,9±1,5 (2)	26,0±3,5 (2)	46,2±0 (2)
29	Ö-1-57-b	45,8±2,9 (2)	25,4±3,7 (1)	33,8±0 (2)
30	Ö-1-59-b	50,0±0 (2)	31,8±5,3 (2)	51,5±1,1 (3)
31	Ö-1-85	44,8±1,5 (2)	29,3±1,8 (2)	48,2±1,5 (2)
32	Ö-2-38	46,9±1,5 (2)	34,2±5,3 (2)	51,0±0 (3)
33	Ö-2-44-b	43,8±0 (2)	35,5±0 (2)	48,2±0,8 (2)
34	Ö-2-61-a	45,8±2,9 (2)	26,0±3,5 (2)	48,5±1,1 (2)
35	Ö-2-61-c	43,8±2,9 (2)	33,0±3,5 (2)	47,7±0 (2)
36	Ö-3-5-b	45,8±0 (2)	23,0±0,2 (1)	47,7±2,2 (2)
37	Ö-3-21	41,7±2,9 (2)	34,2±1,8 (2)	51,5±1,1 (3)
38	Ö-3-30	43,8±8,8 (2)	26,8±1,8 (2)	34,4±1,4 (2)
39	Ö-4-11-a	46,9±1,5 (2)	28,0±3,5 (2)	52,3±0 (3)
40	Ö-4-13-a	45,8±0 (2)	26,0±3,9 (2)	48,5±1,1 (2)
41	Ö-4-57-a	47,9±0 (2)	28,0±3,5 (2)	46,6±0,7 (2)

*SS:Standart sapma

Çizelge 4.2. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolat Kodları		Fitopatojenik Funguslar Üzerindeki Büyüme İnhibisyon Değerleri (%)±SS* (Büyüme inhibisyon kategorisi)		
		<i>B.cinerea</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
42	Ö-4-68	46,9±1,5 (2)	31,8±1,8 (2)	48,2±0,8 (2)
43	Ö-4-82	51,0±1,5 (3)	21,5±5,8 (1)	50,0±1,1 (2)
44	Ö-5-1	41,7±0 (2)	34,2±1,8 (2)	53,0±1,2 (3)
45	B-2-6-b	41,0±8,2 (2)	29,9±1,9 (2)	45,4±2,4 (2)
46	B-2-24-a-a	18,8±5,9 (1)	1,0±0 (1)	0 (0)
47	B-2-24-a-b	36,5±4,4 (2)	23,1±0 (1)	38,5±0 (2)
48	K-6-22	45,7±1,6 (2)	31,8±1,8 (2)	49,8±0 (2)
49	K-8-10-a	45,3±2,2 (2)	28,5±0 (2)	41,5±2,2 (2)
50	K-9-37-a	42,2±6,6 (2)	35,4±5,8 (2)	48,8±0 (2)
51	4-Ka-22	50,3±4,9 (2)	32,6±5,8 (2)	48,8±0 (2)
52	4-Ka-58-1	31,3±5,9 (2)	3,2±0 (1)	7,7±0 (1)
53	4-Ka-61-3-a	30,2±4,4 (2)	3,2±0 (1)	0 (0)
54	A-1	46,4±0,7 (2)	27,0±2,1 (2)	48,9±2,6 (2)
55	Ö-2-55-a	39,6±3,6 (2)	29,8±1,5 (2)	48,1±0 (2)
56	Ö-2-55-b	36,4±3,6 (2)	28,9±2,6 (2)	48,6±1,7 (2)
57	Ö-2-80-b	11,4±9,0 (1)	7,9±4,5 (1)	0 (0)
58	Ö-4-57-b	40,6±3,1 (2)	35,1±8,0 (2)	48,1±2,6 (2)
59	T-3-12-a	62,5±17,7 (3)	35,1±10,9 (2)	48,6±0,8 (2)
60	T-3-12-b	43,7±0 (2)	32,4±3,0 (2)	48,1±0 (2)
61	T-4-20-c-b-a	0 (0)	3,5±1,5 (1)	0 (0)
62	T-4-20-c-b-b	29,7±11,0 (1)	7,9±2,6 (1)	0 (0)
63	T-4-20-e-a	48,9±10,0 (2)	24,6±4,0 (1)	47,2±0,8 (2)
64	T-4-20-e-b	48,4±2,2 (2)	21,0±7,0 (1)	49,1±0,8 (2)
65	Ç-3-20-a	63,5±4,8 (3)	31,6±2,6 (2)	48,6±0,8 (2)
66	Ç-3-20-b	61,4±1,8 (3)	30,7±3,0 (2)	48,6±0,8 (2)
67	B-1-4-a-2-b	29,2±21,3 (2)	0 (0)	33,3±5,3 (2)
68	K-7-4	14,0±2,2 (1)	6,6±1,9 (1)	31,8±2,1 (2)
69	K-7-14-1	37,5±0 (2)	23,7±2,6 (1)	47,2±0,8 (2)
70	1-K-49	5,2±3,6 (1)	9,6±3,0 (1)	33,3±5,3 (2)
71	1-K-49-a	43,7±5,4 (2)	31,6±2,6 (2)	50,6±0,8 (2)

*SS:Standart sapma

Çizelge 4.2. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolat Kodları		Fitopatojenik Funguslar Üzerindeki Büyüme İnhibisyon Değerleri (%)±SS* (Büyüme inhibisyon kategorisi)		
		<i>B.cinerea</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
72	1-K-49-b	43,7±0 (2)	36,0±4,0 (2)	51,1±1,5 (3)
73	2-K-5	56,2±3,1 (3)	28,9±4,5 (2)	50,6±0,8 (2)
74	2-K-13-a	53,1±8,8 (3)	24,6±1,5 (1)	46,2±0,8 (2)
75	2-K-13-b	40,6±3,1 (2)	25,4±1,5 (1)	49,6±1,5 (2)
76	2-K-29	43,7±0 (2)	28,9±7,0 (2)	48,1±0 (2)
77	2-K-35-a	46,9±3,1 (2)	34,2±0 (2)	51,1±1,5 (3)
78	2-K-35-b	46,9±3,1 (2)	36,0±1,5 (2)	51,1±1,5 (3)
79	2-K-37	30,2±1,8 (2)	26,3±4,5 (2)	45,7±0,8 (2)
80	3-K-10	56,2±16,5 (3)	22,8±4,0 (1)	47,1±1,7 (2)
81	3-K-12-b-a	54,2±21,3 (3)	8,8±3,0 (1)	41,2±1,7 (2)
82	3-K-12-b-b	8,3±6,5 (1)	0 (0)	0 (0)
83	3-K-25	42,7±19,8 (2)	28,9±2,6 (2)	46,2±1,7 (2)
84	3-K-41-a-a	0 (0)	2,6±0 (1)	0 (0)
85	3-K-41-a-b	6,2±3,1 (1)	14,9±7,6 (1)	31,8±1,5 (2)
86	4-Ka-59-a-a	37,5±0 (2)	28,1±1,5 (2)	45,7±0,8 (2)
87	4-Ka-59-a-b	65,6±4,4 (3)	37,7±10,9 (2)	48,1±1,5 (2)
88	4-Ka-46-b	0 (0)	0 (0)	0 (0)
89	11-9	35,4±16,0 (2)	14,0±5,5 (1)	34,8±1,5 (2)
90	30-2	4,7±2,2 (1)	14,9±9,2 (1)	23,4±8,5 (1)
91	1-K-21	32,8±1,7 (2)	0 (0)	10,1±4,8 (1)
92	1-K-55-b	54,1±3,0 (3)	21,9±0 (1)	33,3±1,5 (2)
93	3-K-S-1-a	52,6±1,5 (3)	29,3±0 (2)	48,1±0 (2)
94	3-K-S-2	52,6±1,5 (3)	19,5±2,4 (1)	36,3±1,5 (2)
95	3-K-S-14	60,0±1,5 (3)	34,9±3,7 (2)	49,6±0 (2)
96	3-K-S-17-a	61,5±3,0 (3)	31,7±0 (2)	48,1±1,5 (2)
97	3-K-S-19	59,0±3,0 (3)	32,5±3,7 (2)	35,8±0,8 (2)
98	3-K-S-31	54,6±1,7 (3)	26,0±1,4 (2)	34,8±1,5 (2)
99	3-K-S-37	54,1±1,5 (3)	34,1±0 (2)	43,2±3,1 (2)
100	3-K-S-39-a	55,1±6,2 (3)	33,3±1,4 (2)	47,6±0,8 (2)
101	3-K-S-44	45,2±2,1 (2)	0 (0)	0 (0)

*SS:Standart sapma

Çizelge 4.2. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolat Kodları		Fitopatojenik Funguslar Üzerindeki Büyüme İnhibisyon Değerleri (%)±SS* (Büyüme inhibisyon kategorisi)		
		<i>B.cinerea</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
102	3-K-S-47-a	61,0±1,7 (3)	34,1±2,4 (2)	48,1±1,5 (2)
103	3-K-S-47-b	34,8±1,5 (2)	0 (0)	0 (0)
104	3-K-S-49	51,6±3,1 (3)	30,9±1,4 (2)	42,2±1,5 (2)
105	3-K-S-60-a	60,0±1,5 (3)	35,8±3,7 (2)	49,1±1,7 (2)
106	3-K-S-60-b	47,2±2,3 (2)	17,1±2,4 (1)	45,2±0 (2)
107	3-K-S-61	57,5±3,1 (3)	34,9±2,8 (2)	47,6±0,8 (2)
108	3-K-S-64	58,0±0,8 (3)	33,3±1,4 (2)	49,6±1,5 (2)
109	K-6-13-b-a	55,5±3,0 (3)	28,4±5,6 (2)	47,6±0,8 (2)
110	T-3-10-b-b-1	55,1±2,3 (3)	26,0±1,4 (2)	33,3±0 (2)
111	Ö-4-50	34,8±1,5 (2)	0 (0)	0 (0)
112	Ö-6-50-a	58,0±8,5 (3)	30,9±1,4 (2)	46,7±1,5 (2)
113	Ö-6-50-b	33,8±0,8 (2)	0 (0)	1,2±0,8 (1)
114	Ç-1-14	50,6±3,1 (2)	23,6±1,4 (1)	33,3±0 (2)
115	Ç-1-16-a	54,1±3,0 (3)	32,5±1,4 (2)	46,7±1,5 (2)
116	Ç-1-16-b	50,1±5,2 (2)	36,6±2,4 (2)	47,6±0,8 (2)
117	8-4-a	39,7±4,8 (2)	18,7±1,4 (1)	32,8±0,8 (2)
118	11-8	38,8±2,3 (2)	17,1±2,4 (1)	36,3±3,0 (2)

*SS:Standart sapma

Antifungal etkisi incelenen *Bacillus* izolatları arasından 4-Ka-61-3-a, Ö-2-80-b, T-4-20-c-b-a, T-4-20-c-b-b, B-1-4-a-2-b, Ö-6-50-b, 3-K-41-a-a, 4-Ka-46-b, 1-K-21, 3-K-S-44, 3-K-S-47-b, Ö-4-50 ve 3-K-12-b-b kodlu 13 adet izolatın bir ya da birkaç fitopatojenik fungusa karşı zon oluşturmadığı belirlenmiştir.

B-2-24-a-a, K-8-10-a, K-7-4, 1-K-49, 3-K-12-b-a, 3-K-41-a-b, 11-9, 30-2, 1-K-55-b, 3-K-S-2, 3-K-S-19, 3-K-S-31, T-3-10-b-b-1, Ç-1-14, 8-4-a ve 11-8 kodlu 16 adet izolatın ise özellikle *R.solani*'ye karşı çıkmaza girdiği belirlenmiştir.

Ayrıca, T-1-18, Ö-2-55, T-4-20-e, Ç-3-20, 1-K-49, 2-K-13, 2-K-35, 4-Ka-59-a, 3-K-S-60 ve Ç-1-16 kodlu 10 adet izolat saflık kontrolü sırasında a ve b

olarak iki farklı koloni olarak değerlendirilmelerine rağmen yapılan ikili kültür testi sonucunda benzer değerler elde edildiği için bu izolatların aynı izolatlar oldukları varsayılmıştır ve bu izolatlar teke indirilmiştir. İncelenen Ç-2-1-a ve Ç-2-1-b kodlu izolatların ise detaylı inceleme sonucunda Gram (-) oldukları belirlenmiş ve incelemeden çıkarılmıştır. Böylece, dörtlü ekim tekniği ile gerçekleştirilen inceleme sonucunda ortaya çıkan hatalar ikili kültür testi yöntemi kullanılarak ortadan kaldırılmıştır. Sonuç olarak bundan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere her üç fitopatojenik fungusa karşı da inhibisyon zonu oluşturduğu kesin olarak tespit edilen 77 adet *Bacillus* izolatı belirlenmiştir.

Birçok *Bacillus* suşunun çeşitli fitopatojenlerin büyümesini engelleyebildiği ve biyolojik mücadele etmeni olarak kullanıldığı bilinmektedir (Kumari et al., 2017). Konuyla ilgili literatürler incelendiğinde, Vignesh et al. (2021)'un yaptıkları çalışmada *Bacillus velezensis* NKMV-3 suşunun *R. solani*'yi %41,3 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Bir başka çalışmada *B.methylophilus* TA-1 suşu kullanıldığında *R.solani*'ye karşı %62,3 oranında inhibisyon sağlanmıştır. Ayrıca, aynı suşun *Botrytis cinerea*'ya karşı %59,7 oranında inhibisyon sağladığı da belirtilmiştir (Cheng et al., 2019).

Saha et al. (2012), yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* A101 ve A103 suşlarının *F.solani*'ye karşı sırasıyla %66,7 ve %65,2, *R.solani*'ye karşı ise sırasıyla %87,4 ve %85,1 oranında inhibisyon gösterdiklerini belirlemişlerdir. Yirmi *Bacillus* izolatının antagonistik etkisinin incelendiği bir başka çalışmada ise, *Bacillus* izolatlarının *R.solani*'ye karşı %43,4-84,4 aralığında inhibisyon etkisi gösterdikleri belirtilmiştir (Jamali et al., 2019). *Bacillus* türlerinin *Fusarium* türleri üzerindeki etkisinin incelendiği biyokontrol çalışmalarında, *B.velezensis* NKMV-3 suşunun *F.oxysporium f.sp. lycopersici*'ye karşı %49,4 (Vignesh et al., 2021), *Bacillus* izolatının *Fusarium* türüne karşı %39,13 (Kumari et al., 2017), *Bacillus* B1 ve *Bacillus* N2(2) izolatları ile *F.oxysporium*'a karşı sırasıyla %52 ve %54,6 (Singh and Pandey, 2020) oranında inhibisyon elde edilmiştir. *Bacillus subtilis* B3 ve *Bacillus sp.* B5 izolatları ile ise *F.solani*'ye karşı herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir (Brzezinska et al., 2020). Harba et al. (2020) yaptıkları çalışmada farklı *Bacillus* türleri ile *F.solani* ve *F.culmorum*'a karşı ortalama %57,32 ve %49,49 oranında inhibisyon gerçekleştiğini göstermişlerdir. Ayrıca bir başka çalışmada farklı *Bacillus* türlerinin *F.oxysporium f. sp. niveum*'a karşı gösterdikleri inhibisyon değerlerinin ortalaması %55,84 olarak belirlenmiştir (Zhu et al., 2020).

Tez çalışmasında incelenen 118 *Bacillus* izolatının üç farklı fitopatogene karşı farklı değerlerde yüzde büyüme inhibisyonu gösterdiği belirlenmiştir. *B.cinerea*'ya karşı %0-%65,6±4,4 arasında, *F.solani*'ye karşı %0-%42,2±3,9 arasında ve *R.solani*'ye karşı ise %0-%55,6±2,5 arasında değişen oranlarda yüzde büyüme inhibisyon değeri elde edilmiştir. Çalışmada 118 izolat arasından T-3-12-a, Ç-3-20-a, Ç-3-20-b, 4-Ka-59-a-b, 3-K-S-14, 3-K-S-17-a, 3-K-S-47-a ve 3-K-S-60-a kodlu olanların fitopatogenik funguslar üzerinde en yüksek yüzde büyüme inhibisyon değeri gösterdiği belirlenmiştir. Tez çalışmasından elde edilen yüzde inhibisyon değerleri değerlendirildiğinde, *Fusarium solani*'nin *Bacillus* izolatlarına karşı daha az antagonistik duyarlılık gösterdiği görülmüştür. Bu sonuç Harba et al. (2020) tarafından elde edilen sonuçlarla da benzerlik göstermektedir. *Fusarium* türlerinin *Bacillus* izolatlarına karşı daha az duyarlı olmaları bazı mikotoksinleri üretmelerine ve *Bacillus* türleri ile birlikte büyüyen *Fusarium* türlerinin hifsel yapısının çeşitli değişimlerine bağlanmıştır.

Mahmoud et al. (2015), yaptıkları çalışmada üç farklı *Bacillus* izolatını büyüme inhibisyon kategorilerine göre derecelendirmişlerdir. Bu izolatların *R.solani*'ye karşı sırasıyla 4, 4 ve 3.derecede, *F.solani*'ye karşı 2, 2 ve 1.derecede, *F.semitictum*'a karşı ise 3.derecede etki gösterdiklerini belirlemişlerdir. *Bacillus* izolatlarının büyüme inhibisyon kategorilerine göre derecelendirildiği bir başka çalışmada ise incelenen on *Bacillus* izolatının *R.solani*, *F.solani* ve *Fusarium spp.*'ye karşı 3.derecede etkili olduğu gösterilmiştir (Soltan et al., 2022). Bir başka çalışmada ise, *B.amyloliquefaciens*'in *Fusarium verticillioides* üzerindeki inhibisyon etkisi büyüme inhibisyon kategorisine göre 4.derece olarak belirlenmiştir (Alvindia and Natsuaki, 2009).

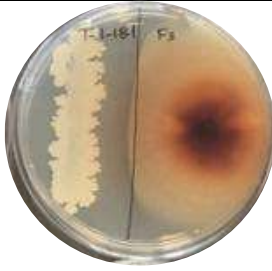
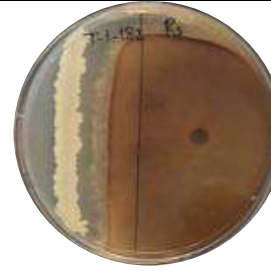
Çalışmamızda, büyüme inhibisyon kategorisine göre yapılan değerlendirmede en etkili izolatlar olarak belirlenen T-1-18-a, T-4-8, T-4-13-a, T-4-14-a, T-4-14-b, T-4-15, Ç-2-30-a, Ç-3-19, Ö-1-59-b, Ö-2-38, Ö-3-21, Ö-4-11-a, Ö-5-1, 1-K-49-b, 2-K-35-a ve 2-K-35-b kodlu 16 adet *Bacillus* izolatı, *R.solani* üzerinde 3.derece, *B.cinerea* ve *F.solani* üzerinde ise 2.derecede etkili olarak sınıflandırılmışlardır. Ayrıca, T-3-12-a, Ç-3-20-a, 2-K-5, 4-Ka-59-a-b, 3-K-S-1-a, 3-K-S-14, 3-K-S-17-a, 3-K-S-37, 3-K-S-39-a, 3-K-S-47-a, 3-K-S-49, 3-K-S-60-a, 3-K-S-61, 3-K-S-64, K-6-13-b-a, Ö-6-50-a ve Ç-1-16-a kodlu 17 adet *Bacillus* izolatı, büyüme inhibisyon kategorisine göre *B.cinerea* üzerinde 3.derece, *F.solani* ve *R.solani* üzerinde ise 2.derecede etkili olarak sınıflandırılmışlardır.

Büyüme inhibisyon kategorisine göre her bir inhibisyon derecesini kaç farklı *Bacillus* izolatının gösterdiğine dair elde edilen veriler ise Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Buna göre çalışmamızdaki *Bacillus* izolatlarının hiçbir fitopatogene karşı 4. derecede inhibisyon etkisi göstermediği belirlenmiştir. Özellikle *F.solani*'ye karşı ise 3. derecede inhibisyon etkisi gösteren *Bacillus* izolatı belirlenememiştir. Genel olarak bakıldığında kullanılan *Bacillus* izolatları ile *B.cinerea*'ya karşı en güçlü etki, *F.solani*'ye karşı ise en zayıf etki elde edilmiştir.

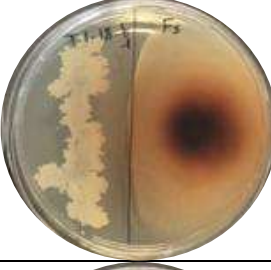
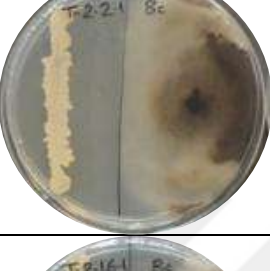
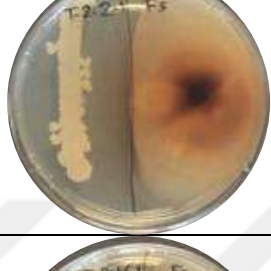
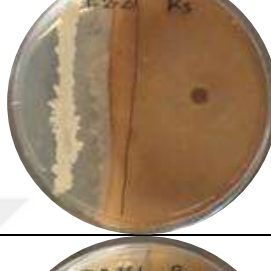
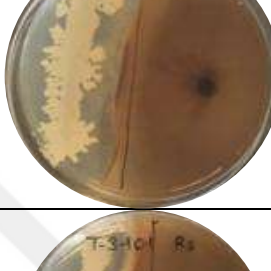
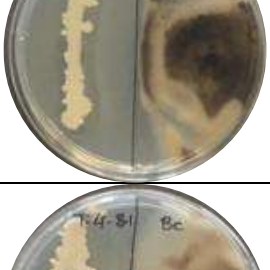
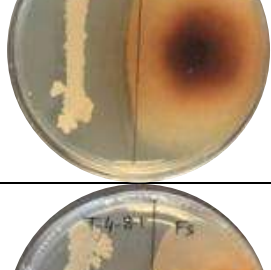
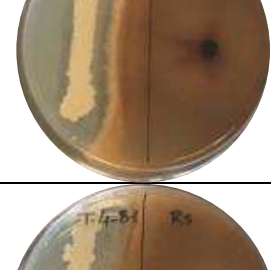
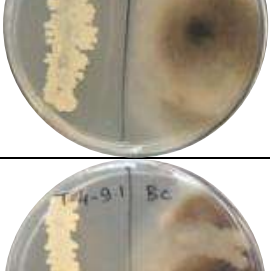
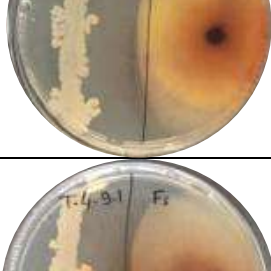
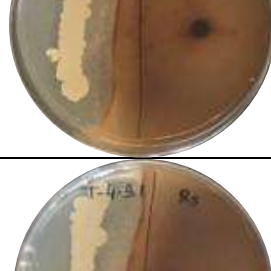
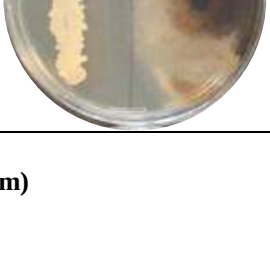
Çizelge 4.3. Kullanılan *Bacillus* izolatlarının fitopatogenik funguslara karşı gösterdikleri inhibisyon etkilerinin büyüme inhibisyon kategorilerine göre sayıları.

Fitopatogenik Funguslar	Büyüme İnhibisyon Kategorilerine Göre <i>Bacillus</i> İzolatı Sayıları				
	0.derece	1.derece	2.derece	3.derece	4.derece
<i>B.cinerea</i>	3	8	80	27	0
<i>F.solani</i>	8	36	74	0	0
<i>R.solani</i>	11	4	87	16	0

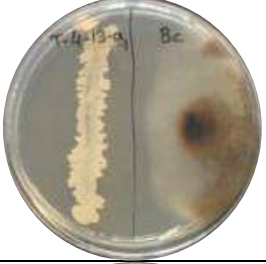
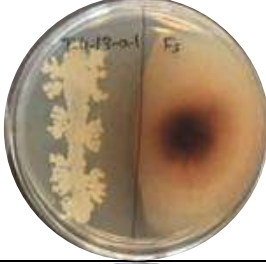
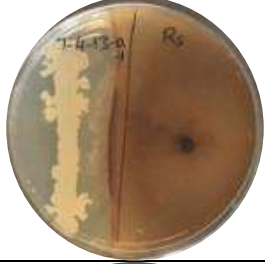
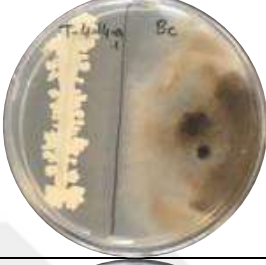
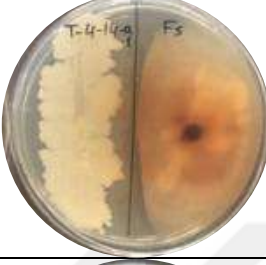
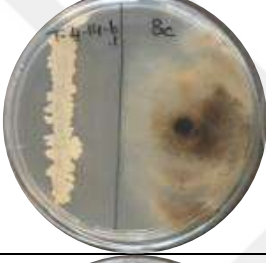
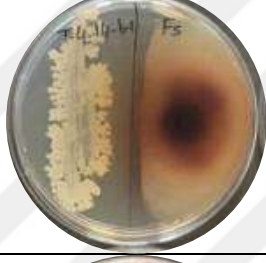
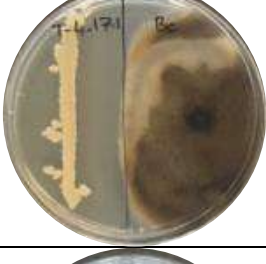
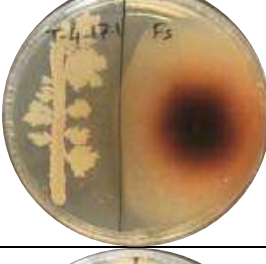
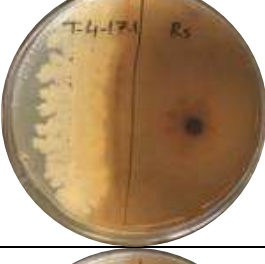
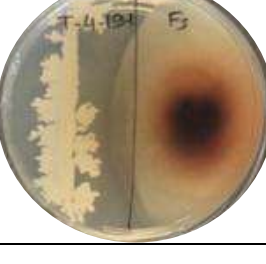
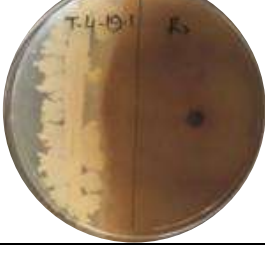
Bacillus izolatları ile *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* ve *Rhizoctonia solani* gibi fitopatogenik funguslara karşı gerçekleştirilen ikili kültür testi yöntemine ait 7.gündeki petri görselleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatogenik Funguslar		
	<i>B.cinerea</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
T-1-18			
T-1-18-a			

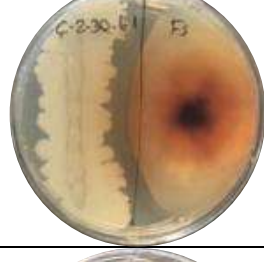
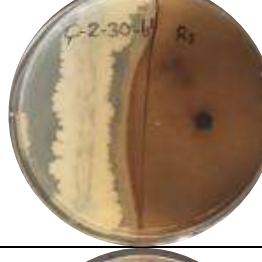
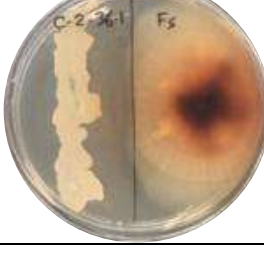
Şekil 4.6. *Bacillus* izolatlarının ikili kültür testi yöntemi ile belirlenen antifungal etkilerinin petri görüntüleri (7.gün).

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
T-1-18-b			
T-2-2			
T-2-16			
T-3-10			
T-4-8			
T-4-9			

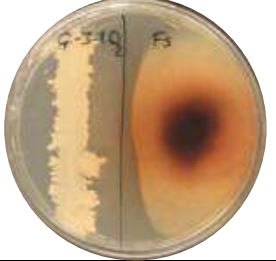
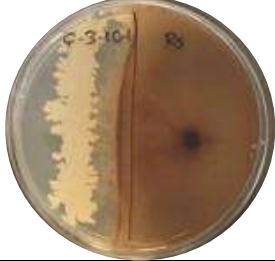
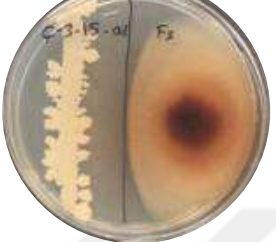
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
T-4-13-a			
T-4-14-a			
T-4-14-b			
T-4-15			
T-4-17			
T-4-19			

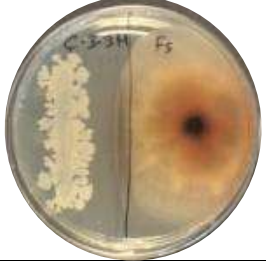
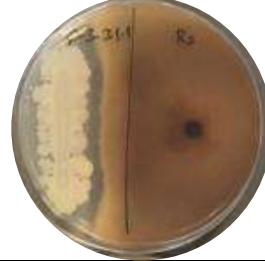
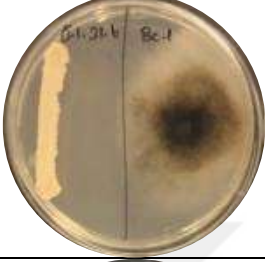
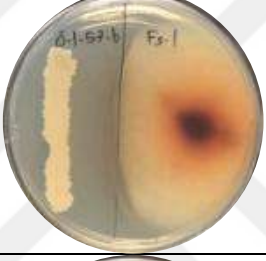
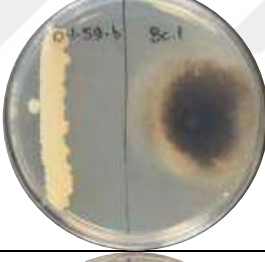
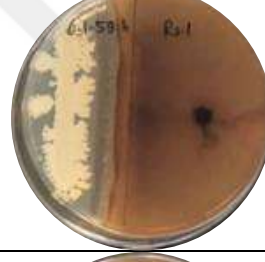
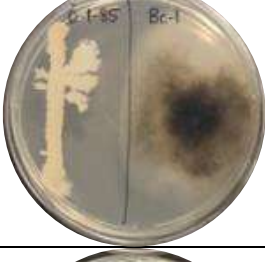
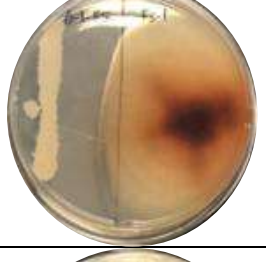
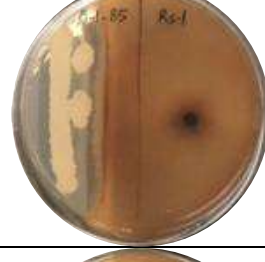
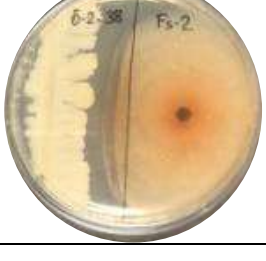
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatogenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
T-11-8			
Ç-2-1-a			
Ç-2-1-b			
Ç-2-30-a			
Ç-2-30-b			
Ç-2-36			

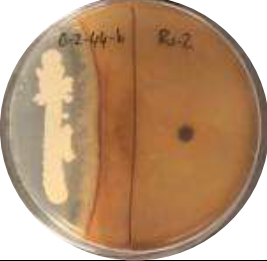
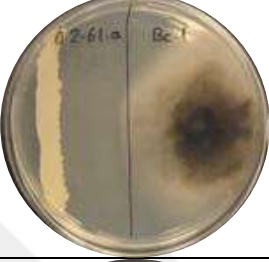
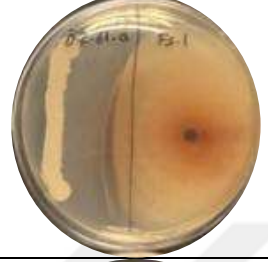
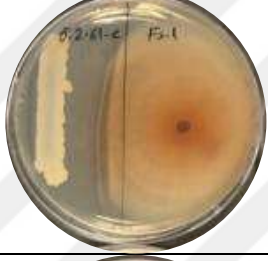
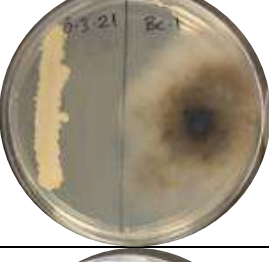
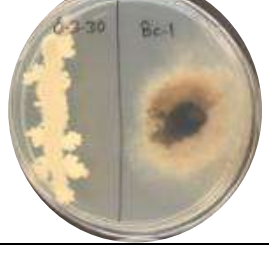
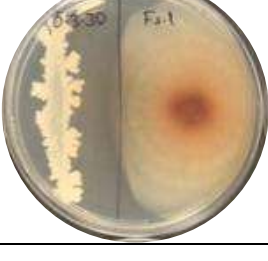
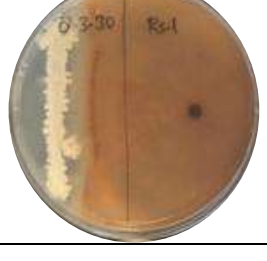
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
Ç-3-10			
Ç-3-15-a			
Ç-3-19			
Ç-3-22-a			
Ç-3-22-b			
Ç-3-23			

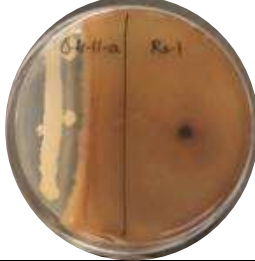
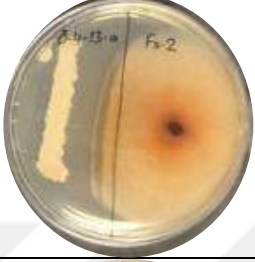
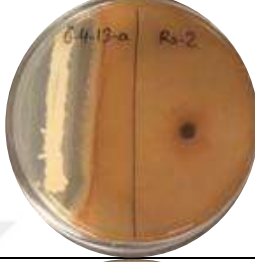
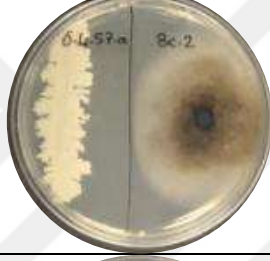
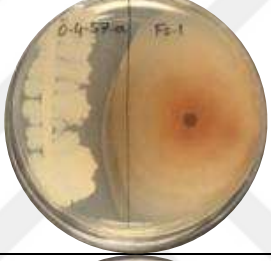
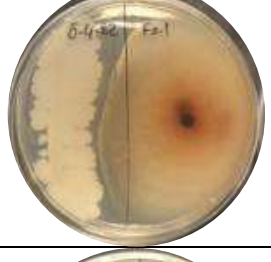
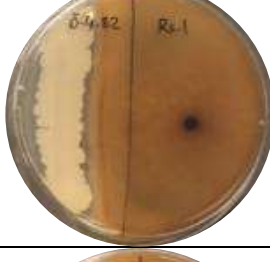
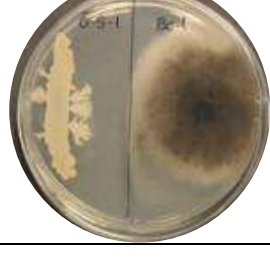
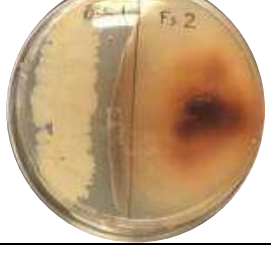
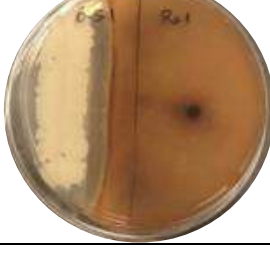
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
Ç-3-31			
Ö-1-31-b			
Ö-1-57-b			
Ö-1-59-b			
Ö-1-85			
Ö-2-38			

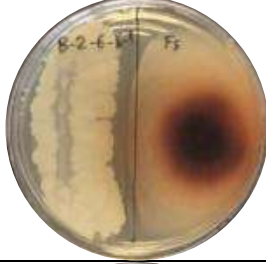
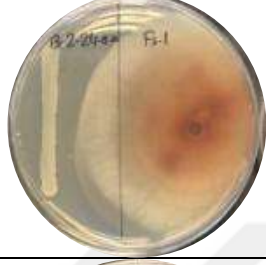
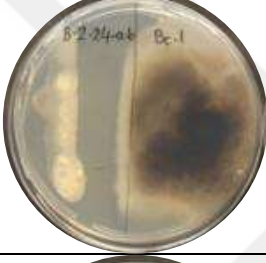
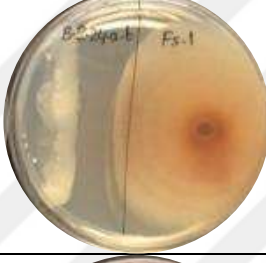
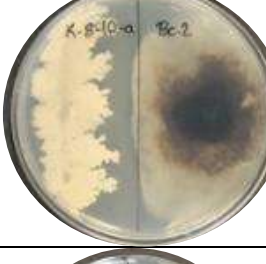
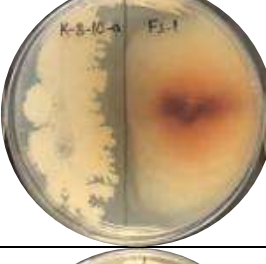
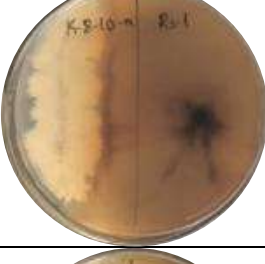
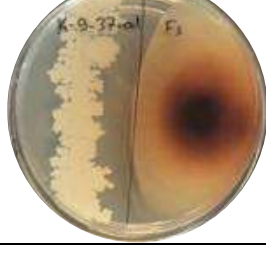
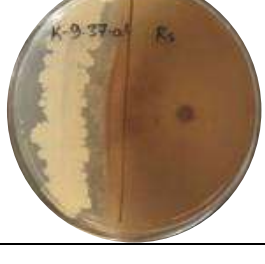
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
Ö-2-44-b			
Ö-2-61-a			
Ö-2-61-c			
Ö-3-5-b			
Ö-3-21			
Ö-3-30			

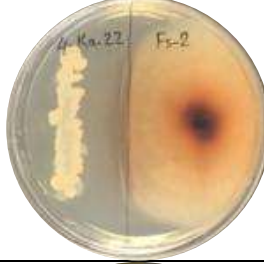
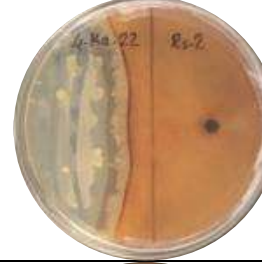
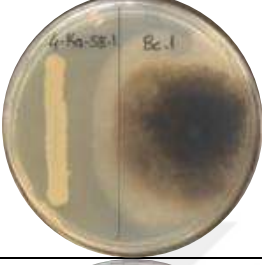
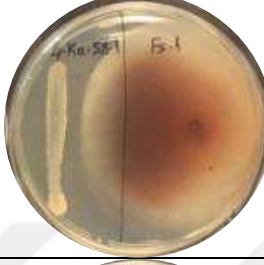
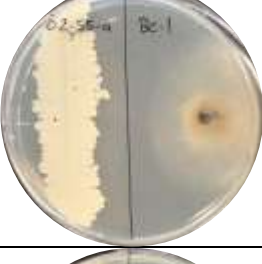
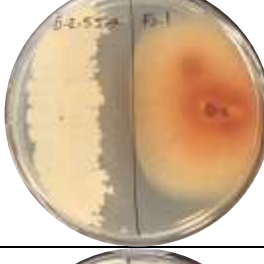
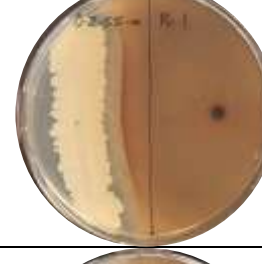
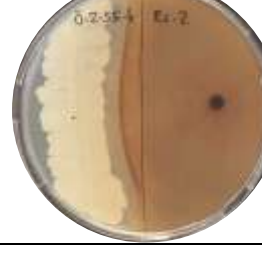
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
Ö-4-11-a			
Ö-4-13-a			
Ö-4-57-a			
Ö-4-68			
Ö-4-82			
Ö-5-1			

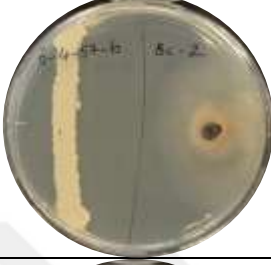
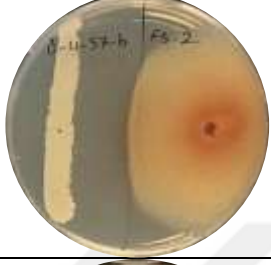
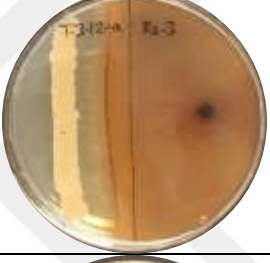
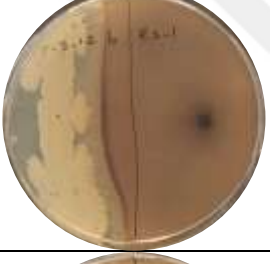
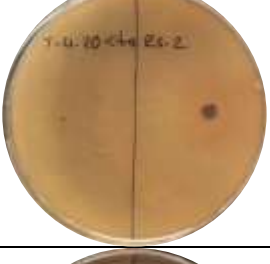
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
B-2-6-b			
B-2-24-a-a			
B-2-24-a-b			
K-6-22			
K-8-10-a			
K-9-37-a			

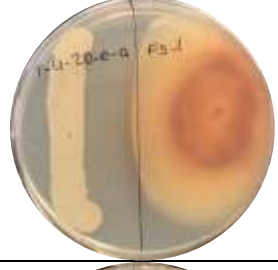
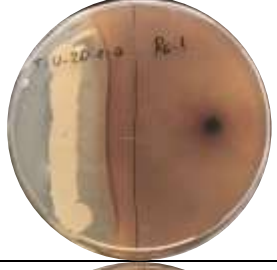
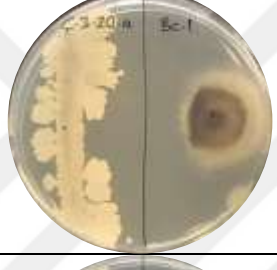
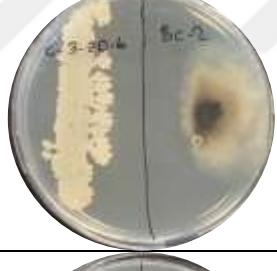
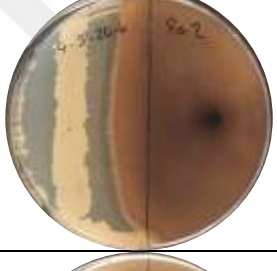
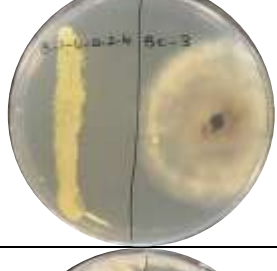
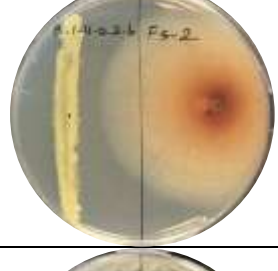
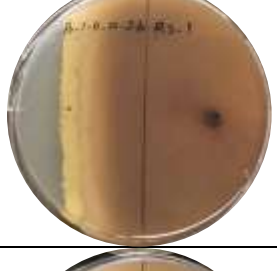
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
4-Ka-22			
4-Ka-58-1			
4-Ka-61-3-a			
A1			
Ö-2-55-a			
Ö-2-55-b			

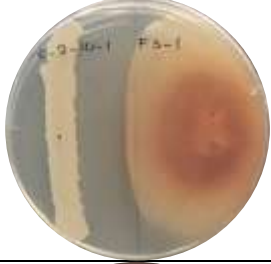
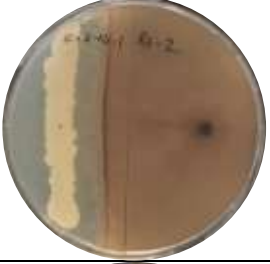
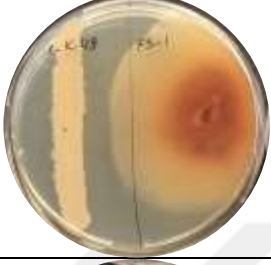
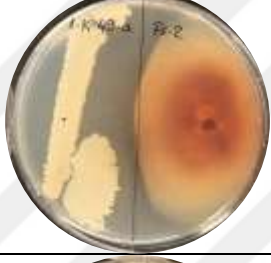
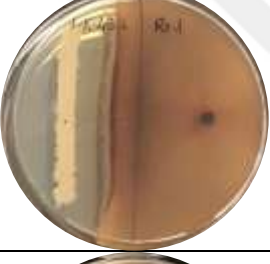
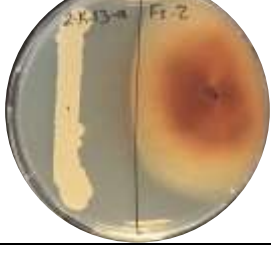
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
Ö-2-80-b			
Ö-4-57-b			
T-3-12-a			
T-3-12-b			
T-4-20-c- b-a			
T-4-20-c- b-b			

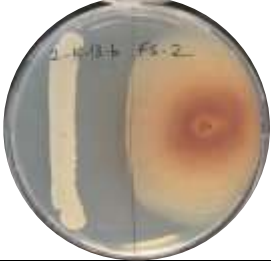
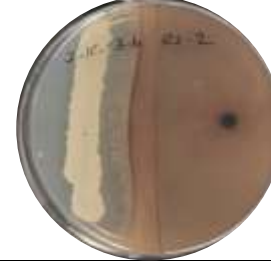
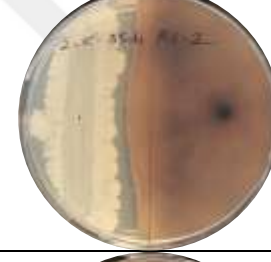
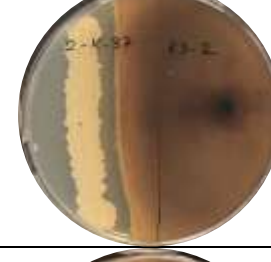
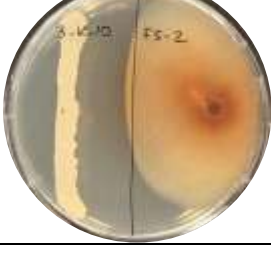
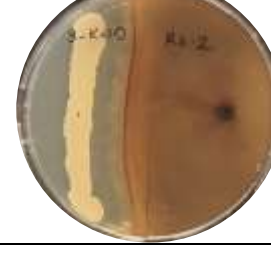
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
T-4-20-e-a			
T-4-20-e-b			
Ç-3-20-a			
Ç-3-20-b			
B-1-4-a-2-b			
K-7-4			

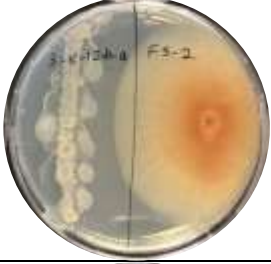
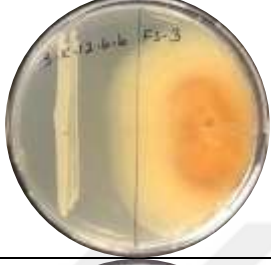
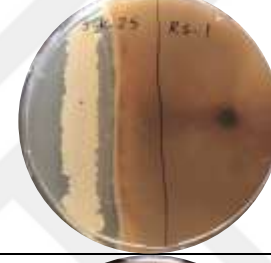
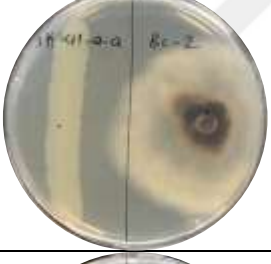
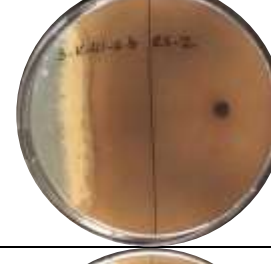
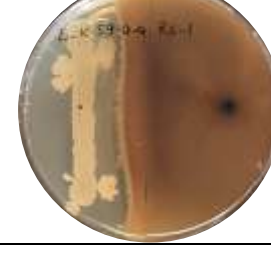
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
K-7-14-1			
1-K-49			
1-K-49-a			
1-K-49-b			
2-K-5			
2-K-13-a			

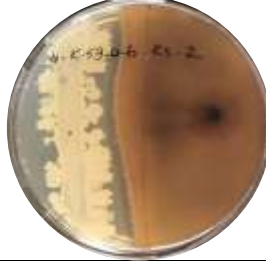
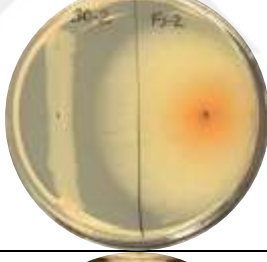
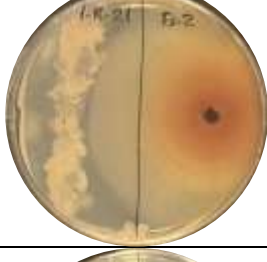
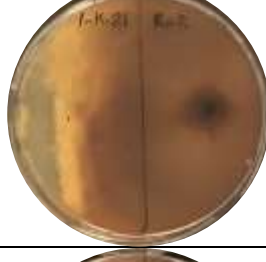
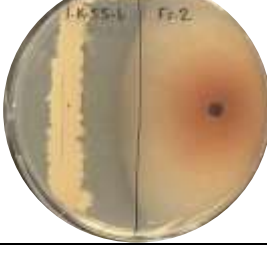
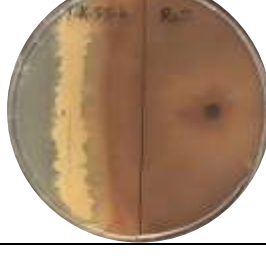
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
2-K-13-b			
2-K-29			
2-K-35-a			
2-K-35-b			
2-K-37			
3-K-10			

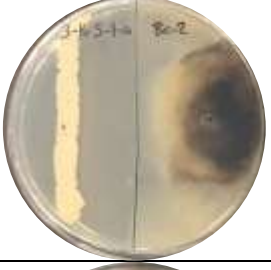
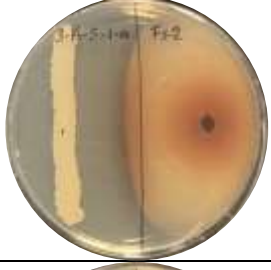
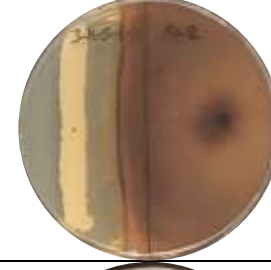
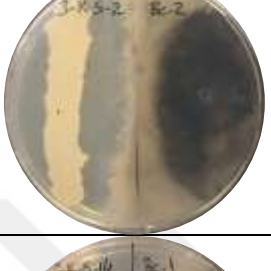
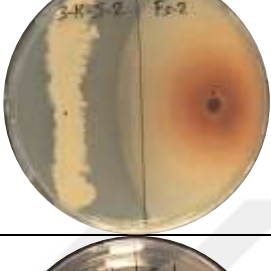
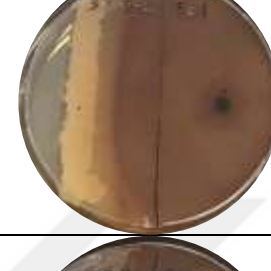
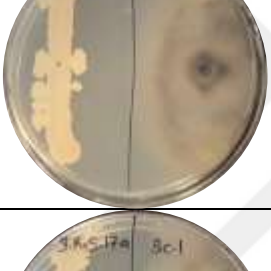
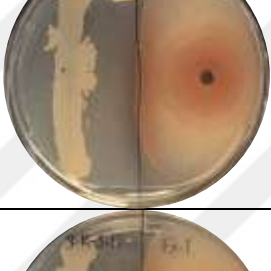
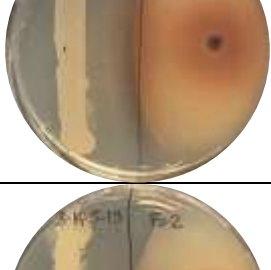
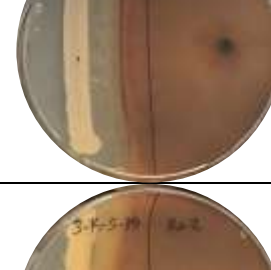
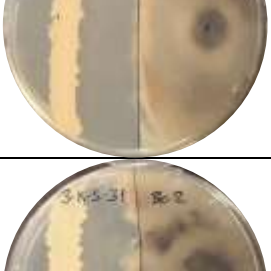
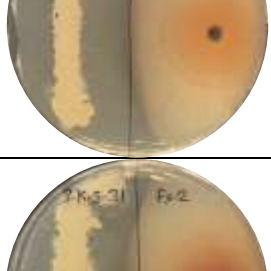
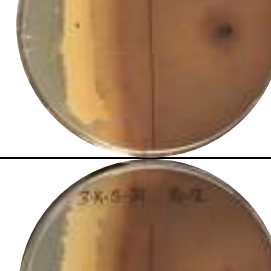
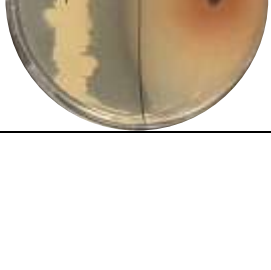
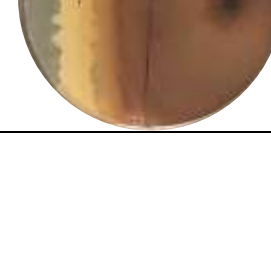
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
3-K-12-b-a			
3-K-12-b-b			
3-K-25			
3-K-41-a-a			
3-K-41-a-b			
4-Ka-59-a-a			

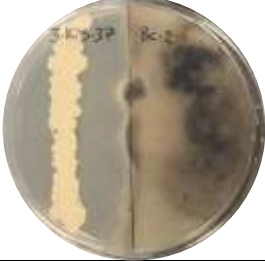
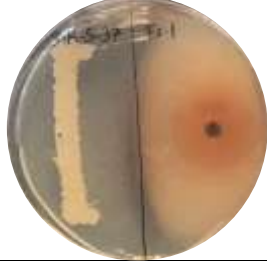
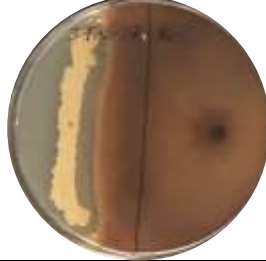
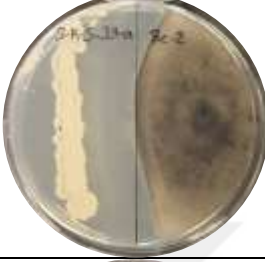
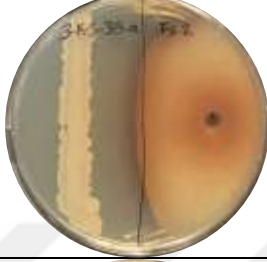
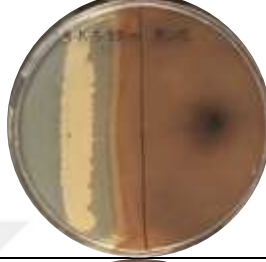
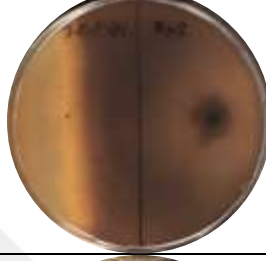
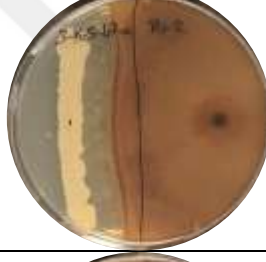
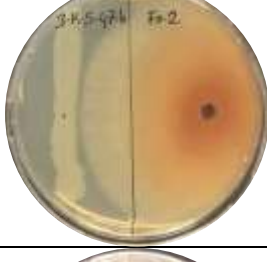
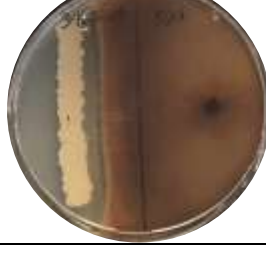
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
4-Ka-59-a-b			
4-Ka-46-b			
11-9			
30-2			
1-K-21			
1-K-55-b			

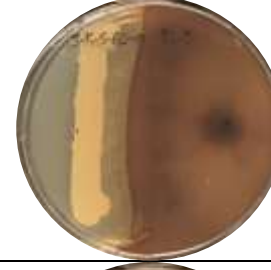
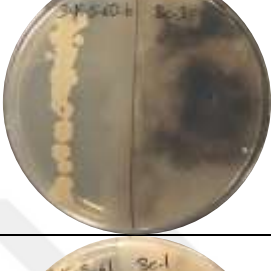
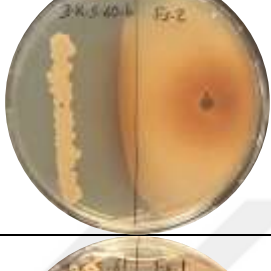
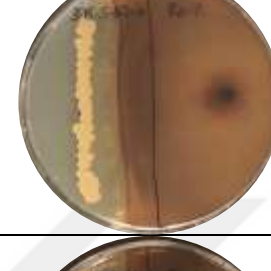
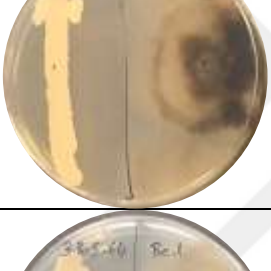
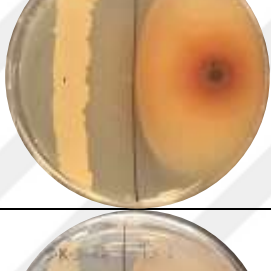
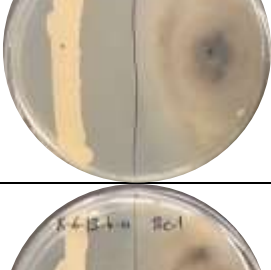
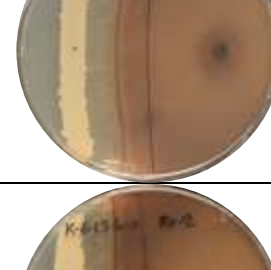
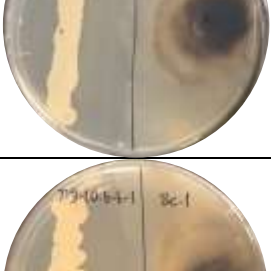
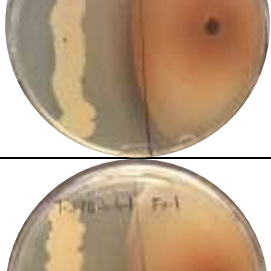
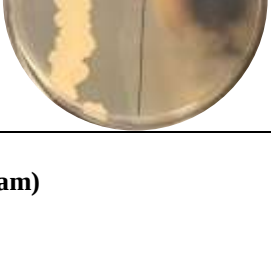
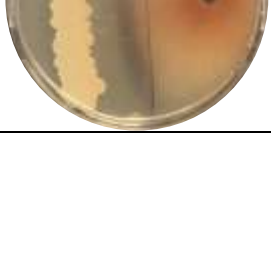
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
3-K-S-1-a			
3-K-S-2			
3-K-S-14			
3-K-S-17-a			
3-K-S-19			
3-K-S-31			

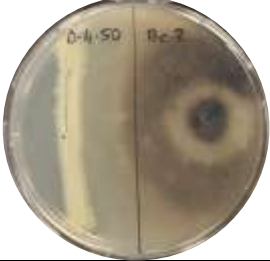
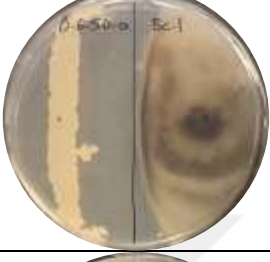
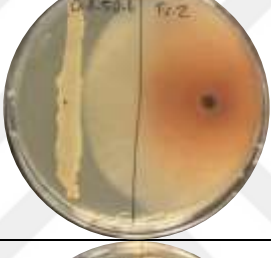
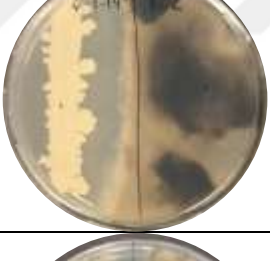
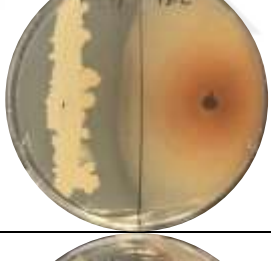
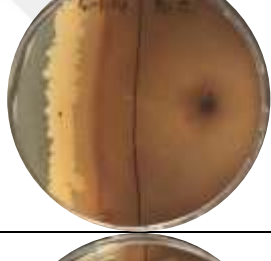
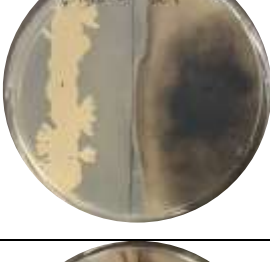
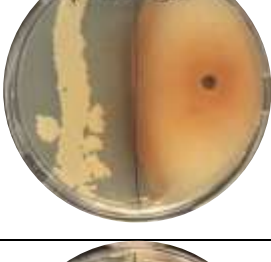
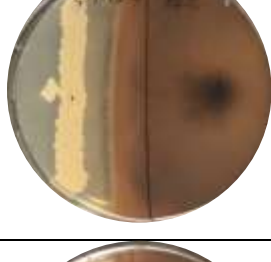
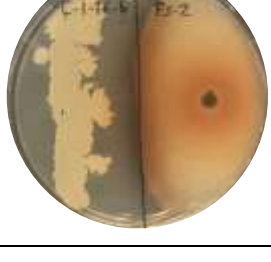
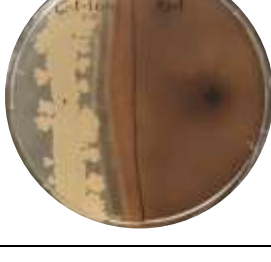
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
3-K-S-37			
3-K-S-39-a			
3-K-S-44			
3-K-S-47-a			
3-K-S-47-b			
3-K-S-49			

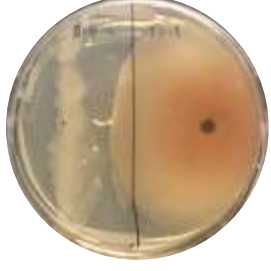
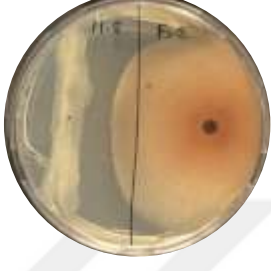
Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
3-K-S-60-a			
3-K-S-60-b			
3-K-S-61			
3-K-S-64			
K-6-13-b-a			
T-3-10-b-b-1			

Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
Ö-4-50			
Ö-6-50-a			
Ö-6-50-b			
Ç-1-14			
Ç-1-16-a			
Ç-1-16-b			

Şekil 4.6. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatogenik Funguslar		
	<i>B.cineria</i>	<i>F.solani</i>	<i>R.solani</i>
8-4-a			
11-8			

Şekil 4.6. (devam)

4.2. *Bacillus* İzolatları Tarafından Üretilen Antifungal Lipopeptidlerin İncelenmesi

Bacillus türleri tarafından üretilen antibiyotik maddeler arasında siklik lipopeptitler gibi biyosümfaktanlar bulunmaktadır. Bunlar, sümfaktinleri, iturinleri, likenisinleri, fengisinleri, pumilasinleri ve izohalobasilinleri içermektedir (Pueyo et al., 2009). Biyokimyasal özelliklerinden dolayı kozmetik, ilaç, tarım, gıda ve petrokimya endüstrileri dahil olmak üzere çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmak üzere ilgi görmektedirler (Bertrand et al., 2018). *Bacillus* türleri, bu tür biyoaktif moleküllerin büyük ölçekli üretimi için verimli üreticiler olarak kabul edilmektedir. Bitki hastalıklarının biyolojik kontrolü için *Bacillus* lipopeptitlerinin üç ailesi, yani sümfaktin, iturin ve fengisin, çeşitli fitopatogenlere karşı güçlü antagonistik aktiviteleri bakımından incelenmektedir. Bu nedenle, bu bileşikler yaygın olarak geleneksel antibiyotiklere, fungus hastalıklarına ve yaşamı tehdit eden hastalıklara karşı artan direnç sorununa potansiyel alternatifler olarak kabul edilmektedir (Meena and Kanwar, 2015). Ayrıca, lipopeptidler toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen ve hatta biyolojik olarak uyumlu maddeler olarak bilinmektedir. Lipopeptidler bu özellikleri sebebiyle kimyasal pestisitlerin yerine kullanılabilecek doğal pestisitler olarak değerlendirilmektedirler. *Bacillus sp.* tarafından üretilen sümfaktin, iturin ve fengisin antibakteriyel ve antifungal etkilerine ek olarak toprakta besin kullanımını uyarabilmekte ve sistemik direnci indükleyebilmektedirler. Bu

sayede, tarımsal ürünlere lipopeptit üreten mikroorganizmaların suşlarının eklenmesinin, organik ve sürdürülebilir tarımsal üretimin geliştirilmesi için bir çözüm sunabileceği düşünülmektedir (Petrila et al., 2020).

4.2.1. Ön tarama testi olarak hemolitik aktivitenin belirlenmesi

Biyosüpfaktan üreten bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması için ön tarama testi olarak hemoliz testi kullanılmaktadır (Walter et al., 2010; Shoeb et al., 2015; Sarwar et al., 2018). Kullanılan *Bacillus* izolatlarının da biyosüpfaktan özellikli lipopeptid antibiyotik üretimlerinin belirlenmesi için kanlı agar besiyerinde ön tarama testi olarak hemoliz aktivitesi incelenmiştir. Şeffaf zon oluşturan izolatların antifungal lipopeptid ürettikleri bilinmektedir.

T-2-16, T-4-9, T-4-14-b, T-4-15, K-9-37-a, A-1, 2-K-37, 3-K-25, 3-K-S-37 ve 3-K-S-49 kodlu *Bacillus* izolatları ile en yüksek zon çapı değerleri elde edilmiştir. Ayrıca, T-4-20-c-b-a, T-4-20-c-b-b, Ö-2-80-b, K-7-4, 30-2, 3-K-12-b-b ve 3-K-S-44 kodlu izolatlar da hemolitik aktivite saptanmamıştır. Çalışmada kullanılan çoğu izolat ile (0-2,1 cm) kontrol olarak kullanılan insan patojeni bir bakteri olan *S.aureus* BAA-40 ile elde edilen zon çapından ($1,2 \pm 0,11$ cm) daha yüksek zon çapı değerleri elde edilmiştir. Ancak bu sonuç izolatların patojenitesi sebebiyle değil antifungal lipopeptid üretimleri ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmada kullanılan *Bacillus* izolatları ile elde edilen hemoliz zon çapı değerleri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan *Bacillus* izolatları ile elde edilen hemoliz zon çapları.

<i>Bacillus</i> İzolatları	Hemoliz Zon Çapı (cm±SS)	<i>Bacillus</i> İzolatları	Hemoliz Zon Çapı (cm±SS)
T-1-18	1,6±0,05	Ç-1-16-a	1,3±0,15
T-1-18-a	1,6±0,05	Ç-1-16-b	1,3±0,05
T-2-2	1,9±0,05	Ç-3-20-a	1,3±0,15
T-2-16	2,0±0,05	Ç-3-20-b	1,1±0,1
T-3-10	1,4±0,1	Ö-2-55-a	1,3±0,05
T-4-8	1,8±0,1	Ö-2-55-b	1,0±0,1
T-4-9	2,0±0,05	Ö-2-80-b	0

Çizelge 4.4. (devam)

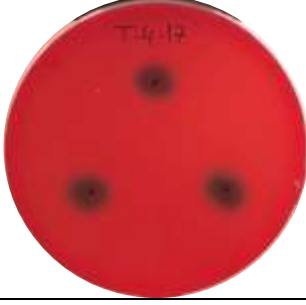
<i>Bacillus</i> İzolatları	Hemoliz Zon Çapı (cm±SS)	<i>Bacillus</i> İzolatları	Hemoliz Zon Çapı (cm±SS)
T-4-13-a	1,9±0,1	Ö-4-50	1,5±0,15
T-4-14-a	1,7±0,1	Ö-4-57-b	1,4±0,05
T-4-14-b	2,0±0,1	Ö-6-50-a	1,4±0,17
T-4-15	2,1±0,2	Ö-6-50-b	1,0±0,05
T-4-17	1,2±0,1	B-1-4-a-2-b	1,3±0,2
T-4-19	1,3±0,05	K-6-13-b-a	1,3±0
T-11-8	1,5±0,05	K-7-4	0
Ç-2-30-a	0,9±0,1	K-7-14-1	1,3±0,05
Ç-2-30-b	1,3±0,1	8-4-a	1,1±0,1
Ç-2-36	1,3±0,05	11-8	1,2±0,11
Ç-3-10	1,8±0,11	11-9	1,2±0,1
Ç-3-15-a	1,2±0	30-2	0
Ç-3-19	1,3±0,1	1-K-21	1,4±0,2
Ç-3-22-a	1,3±0,1	1-K-49	3,4±0,1
Ç-3-22-b	1,6±0,05	1-K-49-a	1,4±0,1
Ç-3-23	1,3±0,17	1-K-49-b	1,6±0,1
Ç-3-31	1,6±0,1	1-K-55-b	1,5±0,05
Ö-1-31-b	1,6±0,1	2-K-5	1,3±0,05
Ö-1-57-b	1,4±0,1	2-K-13-a	1,2±0,05
Ö-1-59-b	1,6±0,1	2-K-13-b	1,3±0,05
Ö-1-85	1,2±0,05	2-K-29	1,3±0,05
Ö-2-38	1,6±0,1	2-K-35-a	1,1±0,1
Ö-2-44-b	1,9±0,1	2-K-35-b	1,3±0,1
Ö-2-61-a	1,7±0,1	2-K-37	2,1±0,05
Ö-2-61-c	1,5±0,05	3-K-10	1,3±0,1
Ö-3-5-b	1,2±0,1	3-K-12-b-a	1,0±0,05
Ö-3-21	1,6±0,05	3-K-12-b-b	0
Ö-3-30	1,9±0,11	3-K-25	2,0±0,05
Ö-4-11-a	1,4±0,05	3-K-41-a-a	0,7±0,1
Ö-4-13-a	1,4±0,11	3-K-41-a-b	1,9±0,1
Ö-4-57-a	1,1±0,1	4-Ka-59-a-a	1,7±0,36
Ö-4-68	1,5±0,1	4-Ka-59-a-b	1,6±0,1

Çizelge 4.4. (devam)

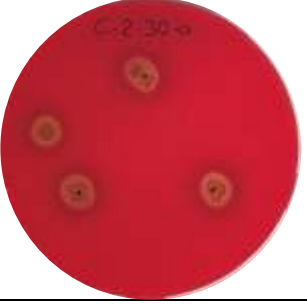
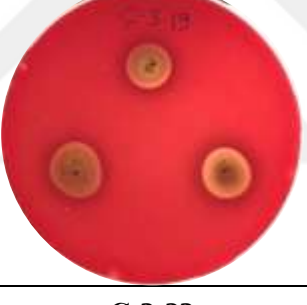
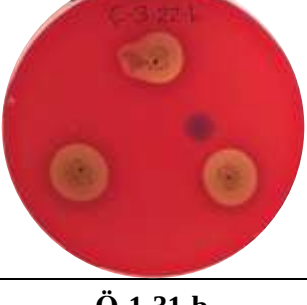
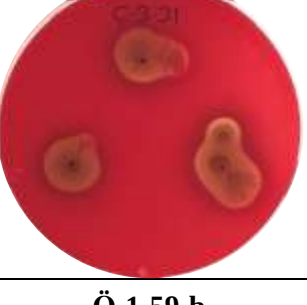
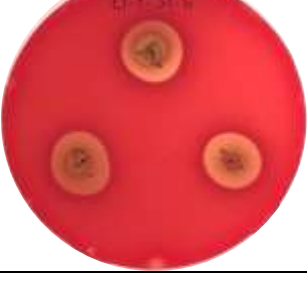
<i>Bacillus</i> İzolatları	Hemoliz Zon Çapı (cm±SS)	<i>Bacillus</i> İzolatları	Hemoliz Zon Çapı (cm±SS)
Ö-4-82	1,8±0,2	3-K-S-1-a	1,3±0,05
Ö-5-1	1,5±0,1	3-K-S-2	1,4±0,1
B-2-6-b	1,3±0,2	3-K-S-14	1,3±0
B-2-24-a-b	1,3±0,1	3-K-S-17-a	1,5±0,05
K-6-22	1,7±0,05	3-K-S-19	1,3±0,05
K-9-37-a	2,1±0,23	3-K-S-31	1,2±0,1
4-Ka-22	1,8±0,05	3-K-S-37	2,0±0
4-Ka-58-1	1,9±0,1	3-K-S-39-a	1,2±0,1
A-1	2,0±0,11	3-K-S-44	0
T-3-10-b-b-1	1,4±0,05	3-K-S-47-a	1,3±0,05
T-3-12-a	1,4±0,05	3-K-S-47-b	0,8±0,1
T-3-12-b	1,6±0,1	3-K-S-49	2,0±0,26
T-4-20-c-b-a	0	3-K-S-60-a	1,5±0,17
T-4-20-c-b-b	0	3-K-S-60-b	1,3±0
T-4-20-e-a	1,4±0	3-K-S-61	1,3±0
T-4-20-e-b	1,3±0,05	3-K-S-64	1,3±0,05
Ç-1-14	1,2±0,1	4-Ka-46-b	0,7±0,1

Bundan sonra gerçekleştirilecek olan Q-TOF ile kantitatif sürfaktin ve iturin A analizlerinde yüzde büyüme inhibisyon değeri yüksek olan, hemoliz testi pozitif çıkan ve yüksek hemoliz zon çapı oluşturan izolatların kullanılmasına karar verilmiştir.

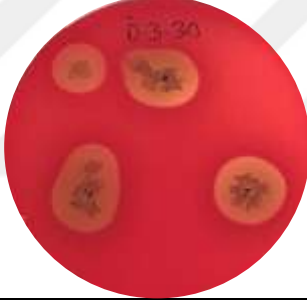
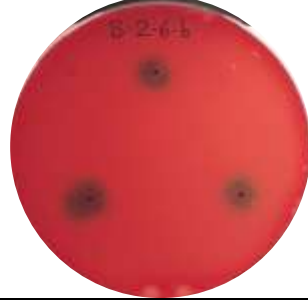
Elde edilen sonuçlara ait üçüncü gündeki zon oluşumlarını gösteren fotoğraflar Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

Bacillus İzolatlarının Hemolitik Aktivite Sonuçları		
Negatif Kontrol		Pozitif Kontrol
		
T-1-18	T-1-18-a	T-2-2
		
T-2-16	T-3-10	T-4-8
		
T-4-9	T-4-13-a	T-4-14-a
		
T-4-14-b	T-4-15	T-4-17
		

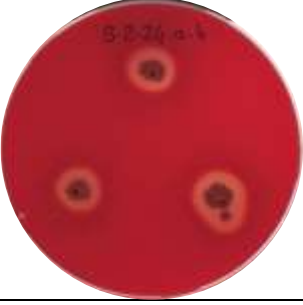
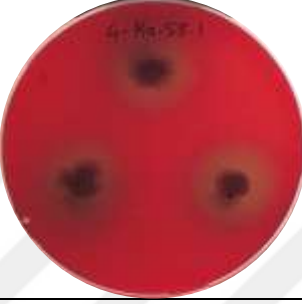
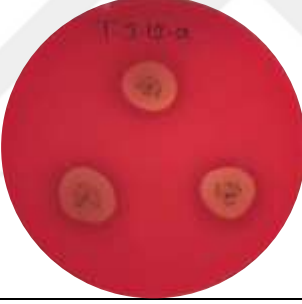
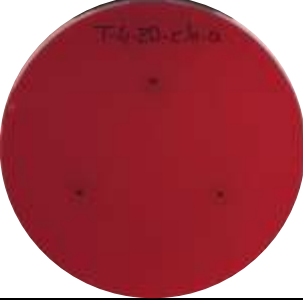
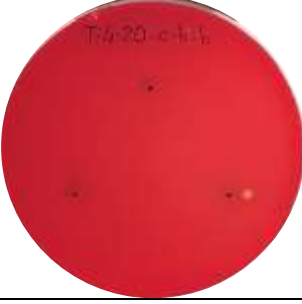
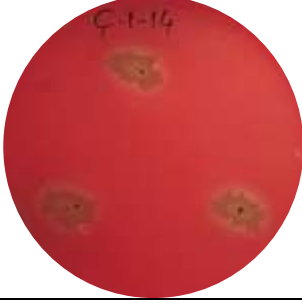
Şekil 4.7. Çalışmada kullanılan *Bacillus* izolatlarının hemolitik aktivite sonuçları (3. gün).

Bacillus İzolatlarının Hemolitik Aktivite Sonuçları		
T-4-19	T-11-8	Ç-2-30-a
		
Ç-2-30-b	Ç-2-36	Ç-3-10
		
Ç-3-15-a	Ç-3-19	Ç-3-22-a
		
Ç-3-22-b	Ç-3-23	Ç-3-31
		
Ö-1-31-b	Ö-1-57-b	Ö-1-59-b
		

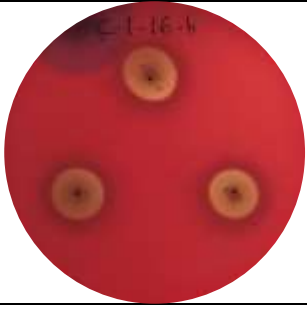
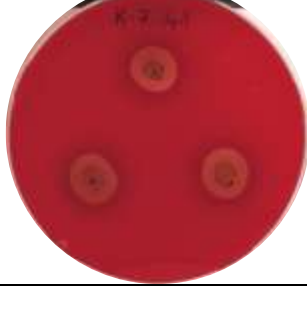
Şekil 4.7. (devam)

Bacillus İzolatlarının Hemolitik Aktivite Sonuçları		
Ö-1-85	Ö-2-38	Ö-2-44-b
		
Ö-2-61-a	Ö-2-61-c	Ö-3-5-b
		
Ö-3-21	Ö-3-30	Ö-4-11-a
		
Ö-4-13-a	Ö-4-57-a	Ö-4-68
		
Ö-4-82	Ö-5-1	B-2-6-b
		

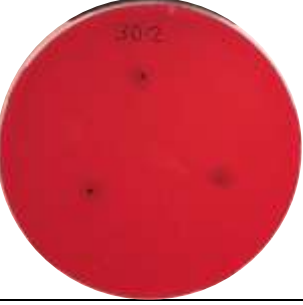
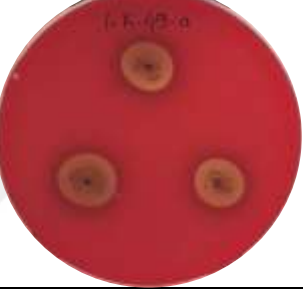
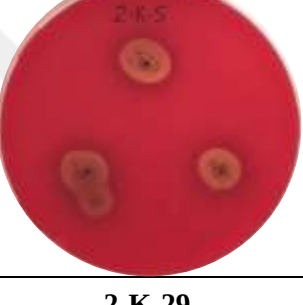
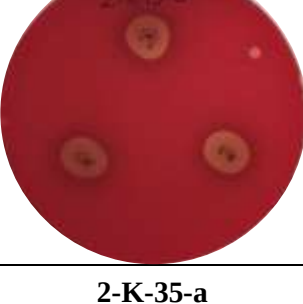
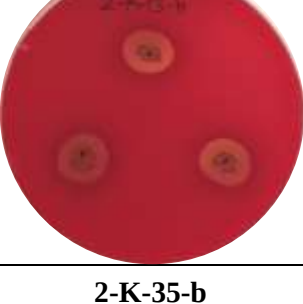
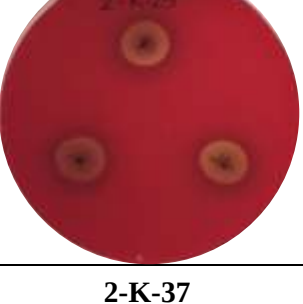
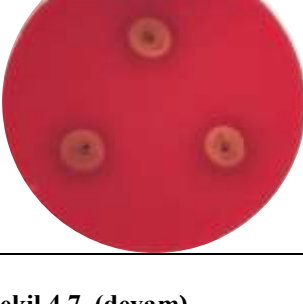
Şekil 4.7. (devam)

Bacillus İzolatlarının Hemolitik Aktivite Sonuçları		
B-2-24-a-b	K-6-22	K-9-37-a
		
4-Ka-22	4-Ka-58-1	A-1
		
T-3-10-b-b-1	T-3-12-a	T-3-12-b
		
T-4-20-c-b-a	T-4-20-c-b-b	T-4-20-e-a
		
T-4-20-e-b	Ç-1-14	Ç-1-16-a
		

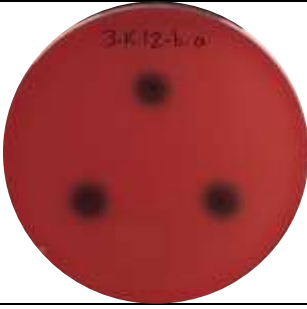
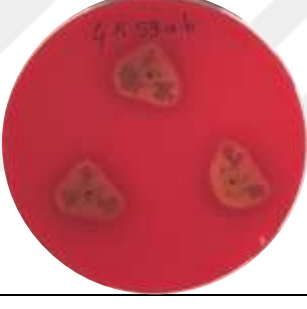
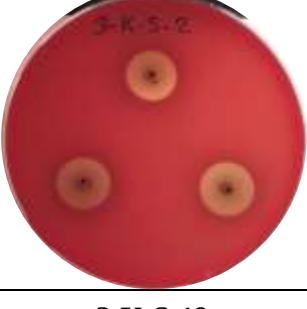
Şekil 4.7. (devam)

Bacillus İzolatlarının Hemolitik Aktivite Sonuçları		
Ç-1-16-b	Ç-3-20-a	Ç-3-20-b
		
Ö-2-55-a	Ö-2-55-b	Ö-2-80-b
		
Ö-4-50	Ö-4-57-b	Ö-6-50-a
		
Ö-6-50-b	B-1-4-a-2-b	K-6-13-b-a
		
K-7-4	K-7-14-1	8-4-a
		

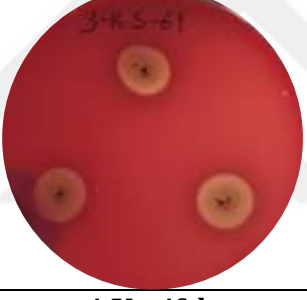
Şekil 4.7. (devam)

Bacillus İzolatlarının Hemolitik Aktivite Sonuçları		
11-8	11-9	30-2
		
1-K-21	1-K-49	1-K-49-a
		
1-K-49-b	1-K-55-b	2-K-5
		
2-K-13-a	2-K-13-b	2-K-29
		
2-K-35-a	2-K-35-b	2-K-37
		

Şekil 4.7. (devam)

Bacillus İzolatlarının Hemolitik Aktivite Sonuçları		
3-K-10	3-K-12-b-a	3-K-12-b-b
		
3-K-25	3-K-41-a-a	3-K-41-a-b
		
4-Ka-59-a-a	4-Ka-59-a-b	3-K-S-1-a
		
3-K-S-2	3-K-S-14	3-K-S-17-a
		
3-K-S-19	3-K-S-31	3-K-S-37
		

Şekil 4.7. (devam)

Bacillus İzolatlarının Hemolitik Aktivite Sonuçları		
3-K-S-39-a	3-K-S-44	3-K-S-47-a
		
3-K-S-47-b	3-K-S-49	3-K-S-60-a
		
3-K-S-60-b	3-K-S-61	3-K-S-64
		
	4-Ka-46-b	
		

Şekil 4.7. (devam)

4.2.2. Antifungal lipopeptidlerin üretimi

Bacillus izolatlarının antifungal lipopeptid üretimlerinin incelenmesi için LB besiyerinde 30°C ve 150 rpm’de 96 saat süresince gerçekleştirilen inkübasyon sonunda her bir izolattan alınan 45 ml kültür sıvısı 15 dakika süresince 9000 rpm’de santrifüjlenerak ekstraksiyon işleminin gerçekleştirileceği süpernatant elde edilmiştir. Tüm izolatlardan eşit hacimde kültür sıvısı ekstrakte edilmesine dikkat edilmiştir.

4.2.3. Antifungal lipopeptidlerin etil asetat kullanılarak ekstraksiyonu

Organik solventlerin kullanımı, lipopeptitlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bu amaçla kloroform, metanol, petrol eteri, etil asetat, n-heksan, eter, etanol ve heptan gibi farklı polarite indekslerine sahip solventler kullanılmaktadır (Valenzuela Ruiz et al., 2020; Venkataraman et al., 2022). Bu solventler, asit çöktürme için tamamlayıcı bir yöntem olarak kullanılabilir. Bu durumda, asit çöktürme ile elde edilen çökelti, bahsedilen solventlerden biri ile ekstraksiyona tabi tutulmaktadır (katı sıvı ekstraksiyonu). Bununla birlikte solvent ekstraksiyonu, üretim ortamı ve organik solventin karıştırılması yoluyla bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu şeklinde, saflaştırma işleminde ilk adım olarak da kullanılabilir (Valenzuela Ruiz et al., 2020). Bir solvent seçmeden önce, istenen biyosüpfaktanın solvent içindeki ekstraksiyon verimliliği ve çözünürlüğü göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, saflaştırma için kapsamlı bir optimizasyon gerekmektedir (Venkataraman et al., 2022).

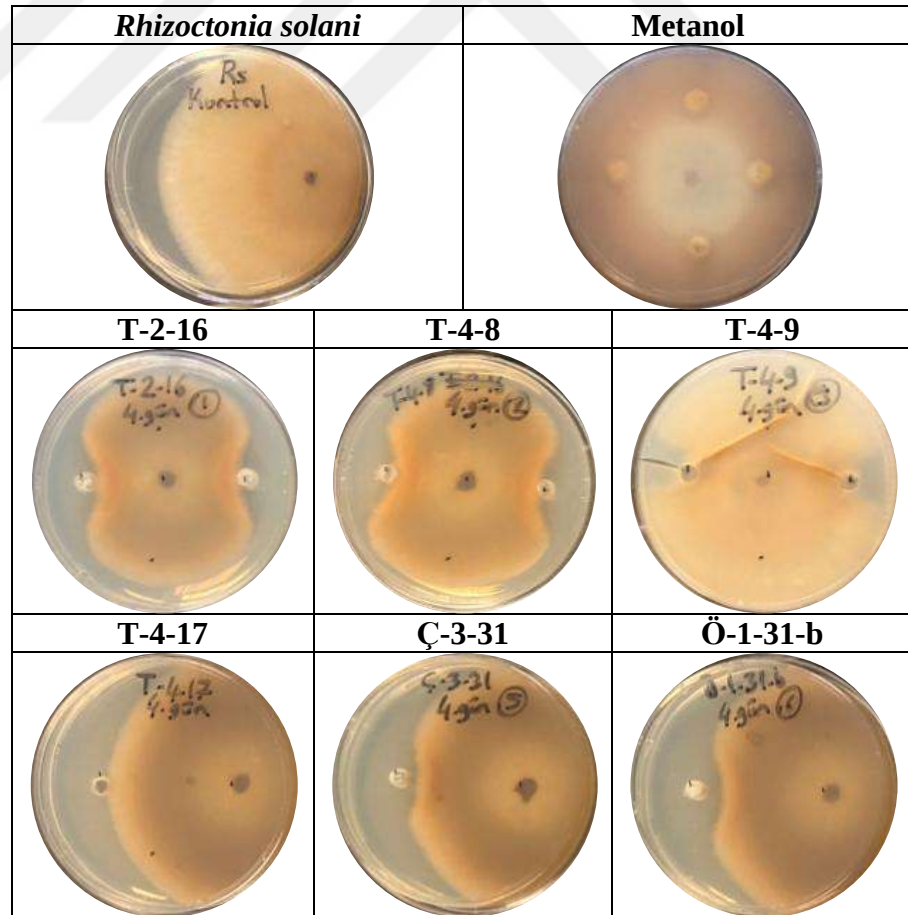
T-1-18, T-2-2, T-2-16, T-4-8 ve T-4-9 kodlu *Bacillus* izolatları kullanılarak Kısım 3.2.4.3'te anlatılan etil asetat yöntemi ile gerçekleştirilen sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ham ekstraktların antifungal etkisi, agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile incelendiğinde hiçbir izolatın kullanılan üç fitopatojene karşı da antifungal etki göstermediği belirlenmiştir.

4.2.4. Antifungal lipopeptidlerin HCl-Metanol kullanılarak ekstraksiyonu

En eski lipopeptit saflaştırma tekniği asit ile çöktürmedir (Coutte et al., 2017; Valenzuela Ruiz et al., 2020; Venkataraman et al., 2022). Bu teknikte, ilk önce santrifüjleme ile hücreler üretim ortamından uzaklaştırılmaktadır ve daha sonra klorik veya sülfürik asit kullanılarak pH 2,0'ye düşürülmektedir. Çöktürme işlemi gece boyunca 4°C'de gerçekleştirilmektedir (Coutte et al., 2017). Bu şekilde, lipopeptitlerin negatif yükleri nötrale edilmekte ve sulu fazdaki çözünürlükleri azalmaktadır (Valenzuela Ruiz et al., 2020). Van der Waals kuvvetleri ile birbirlerine bağlanarak ağırlıkları artmakta ve bu sayede sıvının altında çökelmektedirler (Venkataraman et al., 2022). Santrifüjleme sonrası süpernatant uzaklaştırıldığında elde edilen çökeltideki lipopeptitler organik solventler ile ekstrakte edilmektedir. Bu teknik, süpfaktin ve fengisin gibi negatif yüklü lipopeptitlerin ekstraksiyonu için oldukça uygunken zwitteriyonik lipopeptitlerin geri kazanılması için daha az uygundur. Bu yöntem, aynı zamanda, birçok çalışmada çeşitli solvent ekstraksiyon yöntemleri (metanol, kloroform,

aseton, asetonitril veya bunların karışımları) ve esas olarak da metanol/kloroform 2:1 v/v oranında birleştirilerek uyarlanmıştır (Coutte et al., 2017). Bu teknik kullanılarak yüksek geri kazanım oranı elde edilebilmekte (%97) ancak diğer bileşikler de (örn., peptitler) lipopeptitlerle birlikte çökelebildiğinden %60'ın altında saflık elde edilmektedir ve çok adımlı solvent ekstraksiyonu veya başka bir teknikle birleştirme yoluyla iyileştirilmesi gerekmektedir (Coutte et al., 2017; Valenzuela Ruiz et al., 2020).

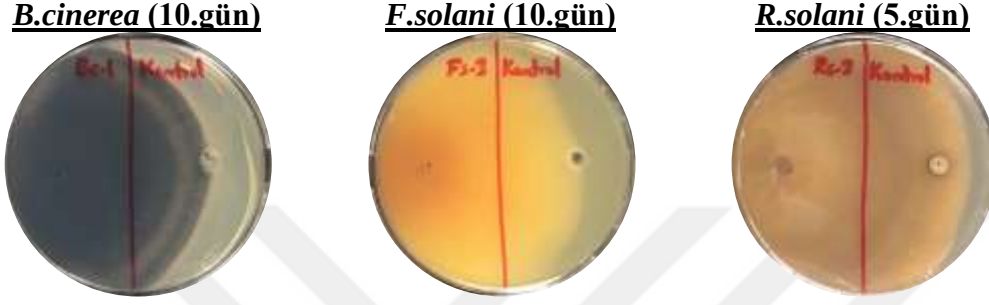
Etil asetat ile ekstraksiyon yöntemi kullanılarak sonuç alınamaması üzerine Kısım 3.2.4.4'te anlatılan HCl-Metanol yöntemi kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan ön denemede kullanılan T-2-16, T-4-8, T-4-9, T-4-17, Ç-3-31 ve Ö-1-31-b kodlu *Bacillus* izolatlarından elde edilen ekstraktların *Rhizoctonia solani*'ye karşı 5. günde gösterdikleri antifungal etki Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Bu çalışma ön deneme olarak gerçekleştirildiği için ölçüm alınmamıştır. Ancak antifungal metabolitlerin varlığını gösteren inhibisyon zonu gözlemlendiği için ekstraksiyon işlemine HCl-Metanol yöntemi kullanılarak devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.8. HCl-Metanol yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktların *R. solani* 'ye karşı antifungal etkisinin belirlendiği ön deneme sonuçları.

4.2.5. Antifungal lipopeptid ekstraktlarının agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile antifungal etkisinin belirlenmesi

Yapılan çalışmada kullanılan fitopatojenik fungusların 5.gün ve 10.günde yarıçap değerleri ölçülmüştür. Ölçülen yarıçap değerleri *B.cinerea*, *F.solani* ve *R.solani* için sırasıyla 4,2 cm, 5,5 cm ve 6,6 cm'dir. Şekil 4.9'da fitopatojenik funguslara ait kontrol petrilerinin fotoğrafları gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Çalışmada kullanılan fitopatojenik fungusların kontrol petrileri.

77 adet *Bacillus* izolatu ile HCl-Metanol yöntemi kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve ekstraktların fitopatojenik fungusların büyüme hızlarına göre *Botrytis cinerea* ve *Fusarium solani*'ye karşı 10.günde, *Rhizoctonia solani*'ye karşı ise 5.günde agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile belirlenen yüzde büyüme inhibisyon değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. HCl-Metanol yöntemi kullanılarak elde edilen *Bacillus* ekstraktlarının fitopatojenik funguslar üzerindeki yüzde büyüme inhibisyon değerleri (PGI) ve bu değerlerin büyüme inhibisyon kategorisine (GIC) göre derecelendirilmesi.

<i>Bacillus</i> İzolatları		Fitopatojenik Funguslar		
		<i>B.cinerea</i> (10.gün)	<i>F.solani</i> (10.gün)	<i>R.solani</i> (5.gün)
1	T-1-18	11,9±6,3 (1)	10,9±0 (1)	27,3±0,0 (2)
2	T-1-18-a	16,7±6,3 (1)	16,4±1,8 (1)	28,3±1,7 (2)
3	T-2-2	15,9±4,9 (1)	26,7±1,0 (2)	28,8±1,5 (2)
4	T-2-16	19,0±6,3 (1)	30,3±1,0 (2)	28,3±3,1 (2)
5	T-3-10	27,0±1,4 (2)	35,7±1,0 (2)	25,7±1,5 (1)
6	T-4-8	18,2±1,4 (1)	33,9±1,0 (2)	29,3±1,7 (2)
7	T-4-9	16,7±2,4 (1)	35,7±1,0 (2)	29,3±2,3 (2)
8	T-4-13-a	15,9±1,4 (1)	29,7±2,1 (2)	26,5±1,1 (2)

Çizelge 4.5. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları		Fitopatojenik Funguslar		
		<i>B.cinerea</i> (10.gün)	<i>F.solani</i> (10.gün)	<i>R.solani</i> (5.gün)
9	T-4-14-a	8,7±1,4 (1)	23,6±1,8 (1)	28,8±0,0 (2)
10	T-4-14-b	24,6±1,4 (1)	33,9±1,0 (2)	32,3±0,9 (2)
11	T-4-15	11,1±1,4 (1)	33,3±1,0 (2)	31,3±0,9 (2)
12	T-4-17	11,9±0 (1)	16,4±1,8 (1)	21,2±2,6 (1)
13	T-4-19	0 (0)	15,1±1,0 (1)	24,2±0,0 (1)
14	T-11-8	0 (0)	32,1±1,0 (2)	27,3±2,6 (2)
15	Ç-2-30-a	11,1±1,4 (1)	17,6±1,0 (1)	29,8±0,9 (2)
16	Ç-2-30-b	11,9±2,4 (1)	32,1±1,0 (2)	29,3±1,7 (2)
17	Ç-2-36	4,0±1,4 (1)	27,9±1,0 (2)	28,8±1,5 (2)
18	Ç-3-10	5,5±1,4 (1)	33,3±1,0 (2)	32,3±1,7 (2)
19	Ç-3-15-a	23,8±0 (1)	36,4±0 (2)	37,9±0,0 (2)
20	Ç-3-19	24,6±1,4 (1)	23,6±0 (1)	33,8±0,9 (2)
21	Ç-3-22-a	35,9±1,7 (2)	32,1±1,3 (2)	30,2±3,9 (2)
22	Ç-3-22-b	37,0±1,0 (2)	29,9±2,9 (2)	32,3±0,9 (2)
23	Ç-3-23	38,2±2,6 (2)	32,4±1,1 (2)	30,5±3,3 (2)
24	Ç-3-31	34,2±1,7 (2)	29,2±0 (2)	26,6±1,6 (2)
25	Ö-1-31-b	34,2±3,4 (2)	25,4±1,9 (1)	25,5±0,9 (1)
26	Ö-1-57-b	32,5±0 (2)	29,2±1,9 (2)	25,0±0 (1)
27	Ö-1-59-b	32,5±3,4 (2)	25,4±1,9 (1)	22,9±3,6 (1)
28	Ö-1-85	34,2±1,7 (2)	29,9±1,1 (2)	27,1±2,4 (2)
29	Ö-2-38	0 (0)	1,5±1,3 (1)	14,1±1,6 (1)
30	Ö-2-44-b	29,7±1,9 (2)	24,8±2,2 (1)	26,6±1,6 (2)
31	Ö-2-61-a	30,9±1,7 (2)	21,6±1,9 (1)	25,0±1,6 (1)
32	Ö-2-61-c	30,3±1,0 (2)	17,8±0 (1)	26,0±0,9 (2)
33	Ö-3-5-b	34,2±0 (2)	25,4±1,9 (1)	31,8±5,0 (2)
34	Ö-3-21	35,3±10,8 (2)	18,4±1,1 (1)	26,6±0 (2)
35	Ö-3-30	29,2±1,7 (2)	31,8±1,1 (2)	28,1±1,6 (2)
36	Ö-4-11-a	39,3±1,7 (2)	27,3±1,9 (2)	25,0±1,6 (1)
37	Ö-4-13-a	38,2±1,0 (2)	29,2±0 (2)	30,2±5,0 (2)
38	Ö-4-57-a	34,2±3,4 (2)	31,2±1,9 (2)	26,0±0,9 (2)
39	Ö-4-68	31,4±1,0 (2)	20,6±1,3 (1)	33,8±5,9 (2)
40	Ö-4-82	34,2±1,7 (2)	23,5±1,9 (1)	25,0±1,6 (1)

Çizelge 4.5. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları		Fitopatojenik Funguslar		
		<i>B.cinerea</i> (10.gün)	<i>F.solani</i> (10.gün)	<i>R.solani</i> (5.gün)
41	Ö-5-1	25,8±1,7 (1)	24,1±1,1 (1)	25,0±1,6 (1)
42	B-2-6-b	10,1±9,7 (1)	1,8±1,1 (1)	14,1±1,6 (1)
43	B-2-24-a-b	2,2±0 (1)	3,8±1,1 (1)	17,2±1,6 (1)
44	K-6-22	31,4±1,9 (2)	22,2±1,1 (1)	26,6±0 (2)
45	K-9-37-a	34,2±1,7 (2)	23,5±0 (1)	29,7±1,6 (2)
46	4-Ka-22	33,1±1,0 (2)	24,1±1,1 (1)	25,0±0 (1)
47	4-Ka-58-1	15,7±3,4 (1)	4,4±0 (1)	18,2±5,0 (1)
48	A-1	32,5±1,7 (2)	20,3±1,1 (1)	26,6±1,6 (2)
49	Ö-2-55-a	33,9±1,5 (2)	12,8±1,1 (1)	24,4±4,8 (1)
50	Ö-4-57-b	48,4±1,7 (2)	25,6±6,7 (1)	29,4±1,9 (2)
51	T-3-12-a	34,9±0,9 (2)	28,8±1,9 (2)	25,5±1,0 (1)
52	T-3-12-b	47,4±1,5 (2)	28,2±1,1 (2)	26,7±1,7 (2)
53	T-4-20-e-a	42,9±1,5 (2)	28,8±1,9 (2)	29,4±2,5 (2)
54	Ç-3-20-a	45,9±1,5 (2)	28,2±4,4 (2)	28,9±2,5 (2)
55	K-7-14-1	41,4±1,5 (2)	30,8±1,9 (2)	29,4±2,5 (2)
56	1-K-49-a	45,9±1,5 (2)	34,6±1,9 (2)	29,4±1,9 (2)
57	2-K-5	38,4±2,6 (2)	30,8±1,9 (2)	20,0±1,7 (1)
58	2-K-13-a	41,4±4,0 (2)	30,8±0 (2)	23,9±1,0 (1)
59	2-K-29	51,0±2,3 (3)	35,2±2,9 (2)	27,8±1,0 (2)
60	2-K-35-a	46,4±1,7 (2)	30,8±1,9 (2)	25,0±0 (1)
61	2-K-37	39,4±5,3 (2)	31,4±2,9 (2)	15,0±0 (1)
62	3-K-10	39,4±0,9 (2)	25,6±1,1 (1)	21,1±1,0 (1)
63	3-K-25	35,9±0,9 (2)	31,4±1,1 (2)	15,0±1,7 (1)
64	4-Ka-59-a-a	45,9±6,0 (2)	30,8±1,9 (2)	23,3±1,7 (1)
65	3-K-S-1-a	39,9±3,0 (2)	32,7±1,9 (2)	27,2±1,0 (2)
66	3-K-S-14	34,4±4,6 (2)	3,8±0 (1)	10,0±1,7 (1)
67	3-K-S-17-a	42,4±0,9 (2)	25,6±2,9 (1)	22,2±1,0 (1)
68	3-K-S-37	45,4±9,0 (2)	33,3±1,1 (2)	12,2±3,5 (1)
69	3-K-S-39-a	36,9±3,0 (2)	29,0±1,1 (2)	26,6±4,3 (2)
70	3-K-S-47-a	39,9±0 (2)	25,8±0 (1)	32,0±8,0 (2)
71	3-K-S-49	49,9±4,3 (2)	35,4±0 (2)	29,3±4,1 (2)

Çizelge 4.5. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları		Fitopatojenik Funguslar		
		<i>B.cinerea</i> (10.gün)	<i>F.solani</i> (10.gün)	<i>R.solani</i> (5.gün)
72	3-K-S-60-a	49,9±9,2 (2)	25,2±4,4 (1)	32,6±1,9 (2)
73	3-K-S-61	49,9±9,2 (2)	25,8±1,9 (1)	28,8±3,4 (2)
74	3-K-S-64	60,0±6,2 (3)	24,6±1,1 (1)	33,1±4,3 (2)
75	K-6-13-b-a	50,4±3,0 (2)	23,3±1,1 (1)	34,2±4,7 (2)
76	Ö-6-50-a	47,4±0 (2)	29,6±1,9 (2)	21,1±1,0 (1)
77	Ç-1-16-a	55,4±5,3 (3)	29,6±1,9 (2)	22,8±1,0 (1)

Hesaplanan yüzde büyüme inhibisyon değerlerinin Kısım 4.1.2’de ikili kültür testi yöntemi ile elde edilenlerle karşılaştırılması sonucu daha düşük inhibisyon değerlerinin elde edildiği görülmüştür. *B.cinerea* için %0 - %60,0±6,2 aralığında, *F.solani* için %1,5±1,3 - %36,4±0 aralığında ve *R.solani* için ise %10,0±1,7 - %37,9±0,0 aralığında büyüme inhibisyon değerleri belirlenmiştir.

Genel olarak izolatların çoğu *B.cinerea*’ya karşı daha yüksek antifungal etki göstermiştir. *B.cinerea*’ya karşı en etkili izolatların sırasıyla 3-K-S-64, Ç-1-16-a, 2-K-29, K-6-13-b-a olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, her üç fitopatojen türe karşı etkileri değerlendirildiğinde, K-7-14-1, 1-K-49-a, 3-K-S-1-a ve 3-K-S-49 kodlu izolatların en yüksek antifungal etkiyi gösterdiği belirlenmiştir.

İkili kültür testinde izolatlar tarafından üretilen diğer metabolitlerin de antibiyotikler ile birlikte etki etmeleri sebebiyle inhibisyon değerinin daha yüksek elde edildiği düşünülmektedir. *Rhizoctonia bataticola* ve *Fusarium oxysporium f.sp. ciceri*’ye karşı in vitro inhibisyon etkileri incelen 30 farklı *Bacillus* izolatı ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada da buna benzer bir sonuç elde edilmiştir. En etkili izolat olarak belirlenen CaB5 için ikili kültür testi yöntemi ile *R.bataticola*’ya karşı %53,3 inhibisyon belirlenirken *F.oxysporim f.sp. ciceri*’ye karşı %58.51 inhibisyon belirlenmiştir. Aynı izolat için, elde edilen ham antibiyotik ekstraktlarının etkisi agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir ve *R.bataticola*’ya karşı %40 oranında inhibisyon belirlenirken *F.oxysporim f.sp. ciceri*’ye karşı %41,6 inhibisyon belirlenmiştir (Smitha et al., 2015). *B.velezensis*’ten asit çökeltme yöntemi ile ekstrakte edilmiş ham lipopeptid, Patates Dekstroza Agar (PDA) besiyeri kullanılan agar kuyucuk difüzyon

denemesinde 30°C’de sırasıyla *Aspergillus niger* ve *Mucor sp.* üzerinde %45.0±1.2 ve %70.6±2.4 büyüme inhibisyonu göstermiştir (Meena et al., 2018).

Literatürde *Bacillus* türleri ile üretilen lipopeptidlerin gösterdikleri antifungal etki çalışmalarına örnekler Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı *Bacillus* türlerinden laboratuvar ölçeğinde üretilen lipopeptidlerin gösterdikleri inhibisyon değerleri (Penha et al., 2020).

Mikroorganizma	Üretim ortamı	Parametreler	İnhibisyon (% ^a ; mm ^b)
<i>Bacillus sp.</i>	Brain heart infusion broth	125 rpm; 42°C; 48 sa	80 mm
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Nutrient broth	150 rpm; 28°C; 72 sa	%62,7
	Landy besiyeri	200 rpm; 30°C; 64 sa	%87,5
<i>Bacillus subtilis</i>	LB besiyeri	130 rpm; 37°C	%35
	Landy besiyeri	180 rpm; 33°C; 50 sa	%96,63
	Nutrient broth	150 rpm; 30°C	%45,8
<i>Bacillus mojavensis</i>	Landy besiyeri	160 rpm; 30°C; pH 7,0; 72 sa	22 mm

a; yüzde büyüme inhibisyonu

b; patojen inhibisyon zonu

İncelenen *Bacillus* izolatları arasından büyüme inhibisyon kategorisine göre en etkili izolatın *B.cinerea*’ya karşı 3.derecede, *F.solani* ve *R.solani*’ye karşı ise 2.derecede etkili olan 2-K-29 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Ç-3-22-a, Ç-3-22-b, Ç-3-23, Ç-3-31, Ö-1-85, Ö-3-30, Ö-4-13-a, Ö-4-57-a, T-3-12-b, T-4-20-e-a, Ç-3-20-a, K-7-14-1, 1-K-49-a, 3-K-S-1-a, 3-K-S-39-a ve 3-K-S-49 kodlu 16 adet *Bacillus* izolatı her üç fitopatogene karşı da 2.derecede etki göstermiştir. Büyüme inhibisyon kategorisine göre her bir inhibisyon derecesini kaç farklı *Bacillus* izolatının gösterdiğine dair elde edilen veriler ise Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Buna göre hiçbir *Bacillus* izolatının hiçbir fitopatogene karşı 4. derecede inhibisyon etkisi göstermediği belirlenmiştir. Sadece *B.cinerea*’ya karşı 3 adet *Bacillus* izolatının 3.derecede etki gösterdiği belirlenmiştir. Genel olarak

bakıldığında kullanılan *Bacillus* izolatları ile *B.cinerea*'ya karşı daha etkili sonuçlar alınmıştır.

Çizelge 4.7. Kullanılan *Bacillus* izolatlarından elde edilen ekstraktların fitopatojenik funguslara karşı gösterdikleri inhibisyon etkilerinin büyüme inhibisyon kategorilerine göre sayıları.

Fitopatojenik Funguslar	Büyüme İnhibisyon Kategorilerine Göre <i>Bacillus</i> İzolatı Sayıları				
	0.derece	1.derece	2.derece	3.derece	4.derece
<i>B.cinerea</i>	3	21	50	3	0
<i>F.solani</i>	0	35	42	0	0
<i>R.solani</i>	0	29	48	0	0

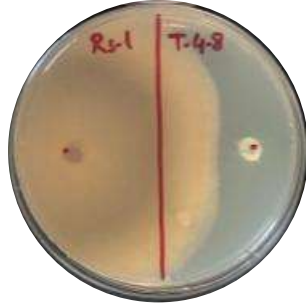
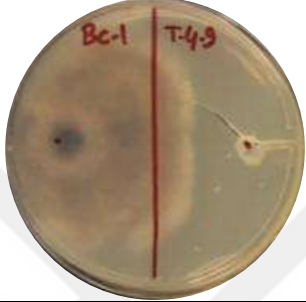
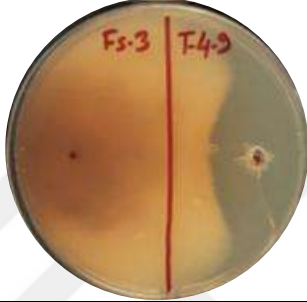
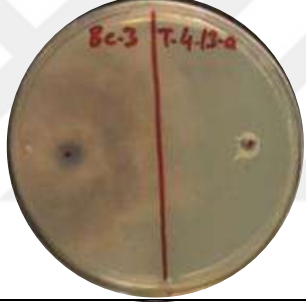
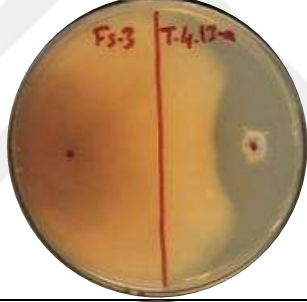
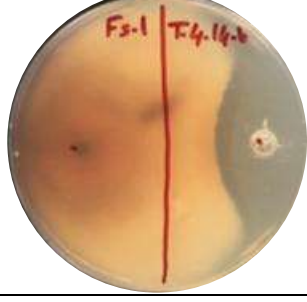
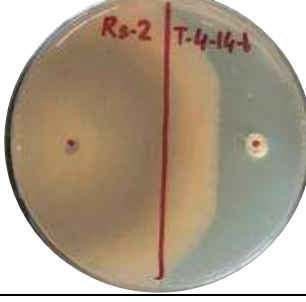
Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile antifungal etkisi incelenen *Bacillus* izolatlarından Ç-3-22-b ve Ö-2-61-c kodlu izolatlar ile benzer yüzde büyüme inhibisyon değeri elde edilmesi sebebiyle bu izolatların Ç-3-22-a ve Ö-2-61-a kodlu izolatlar ile aynı izolatlar olabileceği değerlendirilmiştir.

Ayrıca, Ö-2-38, B-2-6-b, B-2-24-a-b ve 4-Ka-58-1 kodlu izolatlar ile her üç fitopatojenik fungusa karşı da ya hiç ya da çok düşük büyüme inhibisyon değeri elde edilmiştir. Ö-3-30 ve Ö-4-57-a kodlu izolatlar ise tekrar yapılan incelemeler sonucu *R.solani*'ye karşı çıkmaza girdiği değerlendirilmiştir. Bu nedenle toplamda 8 adet *Bacillus* izolatı elenerek sürfaktin ve iturin A'nın Q-TOF ile kantitatif analizinde 69 adet *Bacillus* izolatı kullanılmasına karar verilmiştir.

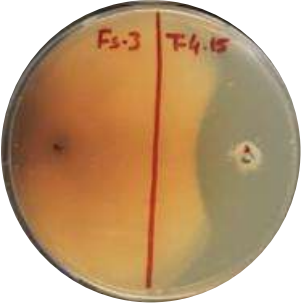
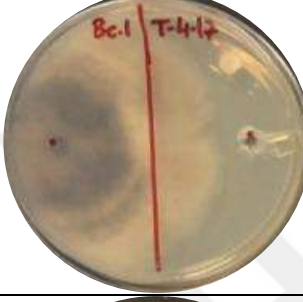
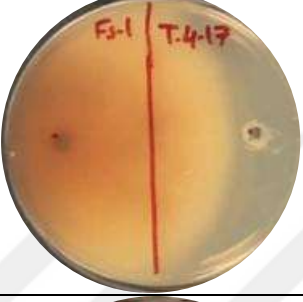
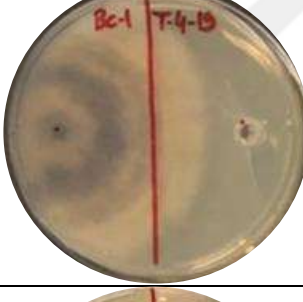
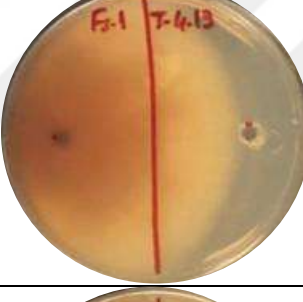
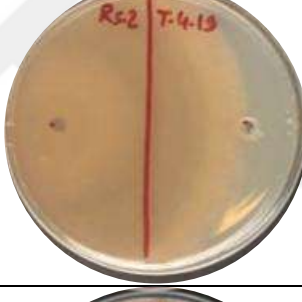
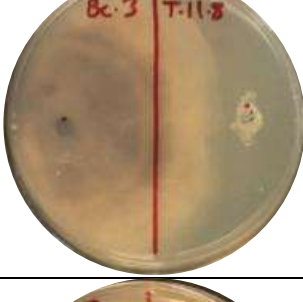
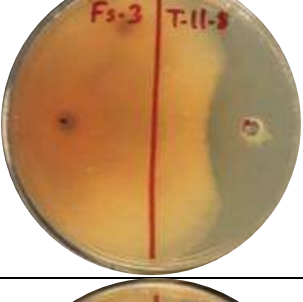
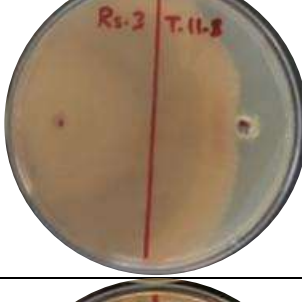
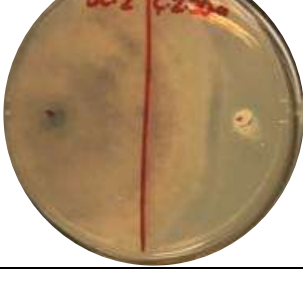
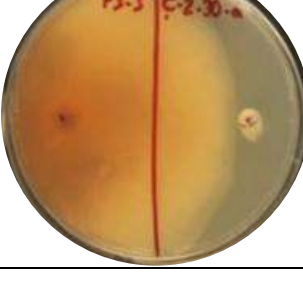
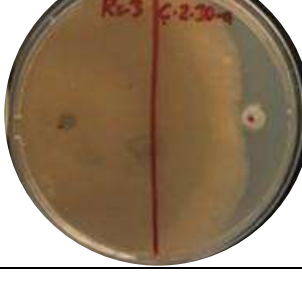
Bacillus izolatları ile *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* ve *Rhizoctonia solani* gibi fitopatojenik funguslara karşı gerçekleştirilen agar kuyucuk difüzyon yöntemi sonucunda elde edilen antifungal etkilere ait görseller Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
T-1-18			
T-1-18-a			
T-2-2			
T-2-16			
T-3-10			

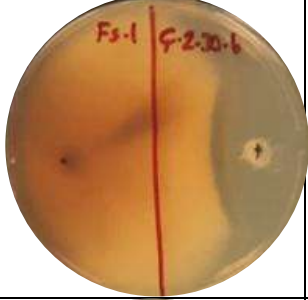
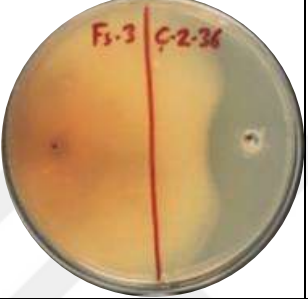
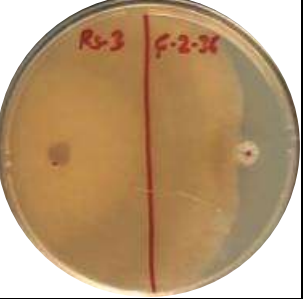
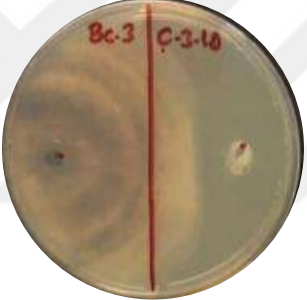
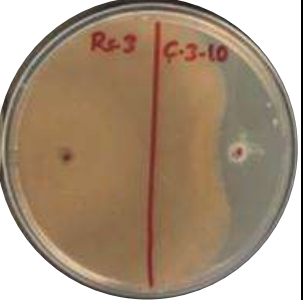
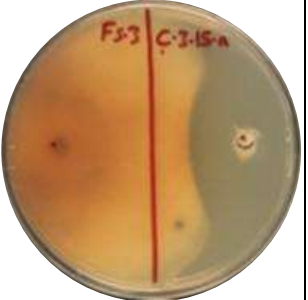
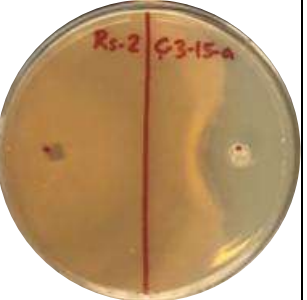
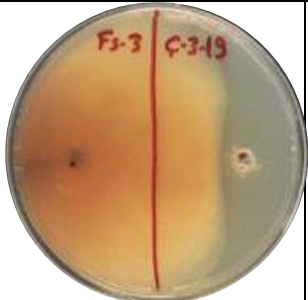
Şekil 4.10. HCl-Metanol yöntemi kullanılarak elde edilen *Bacillus* ekstraktlarının fitopatojenik funguslar üzerindeki antifungal etkileri.

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
T-4-8			
T-4-9			
T-4-13-a			
T-4-14-a			
T-4-14-b			

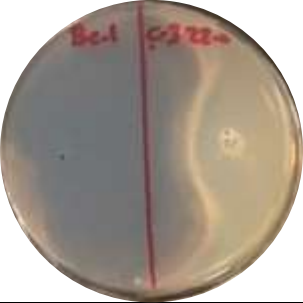
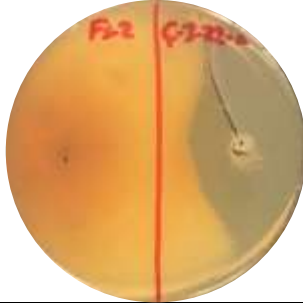
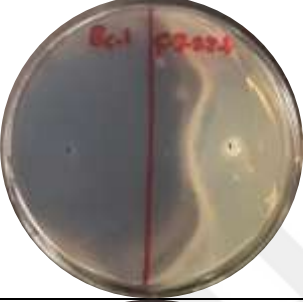
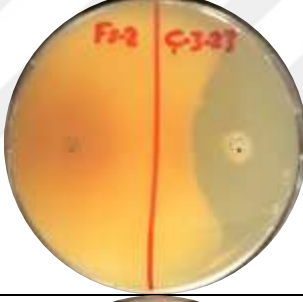
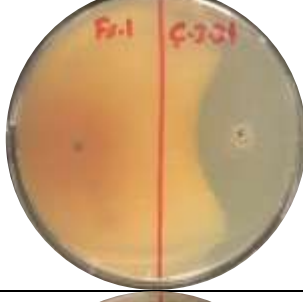
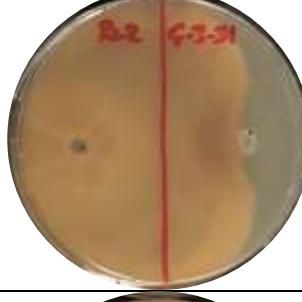
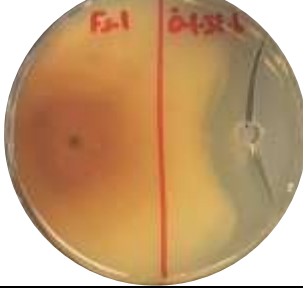
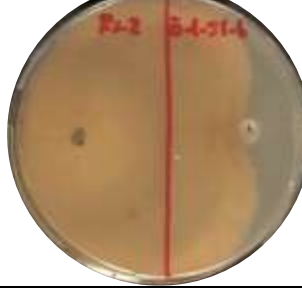
Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
T-4-15			
T-4-17			
T-4-19			
T-11-8			
Ç-2-30-a			

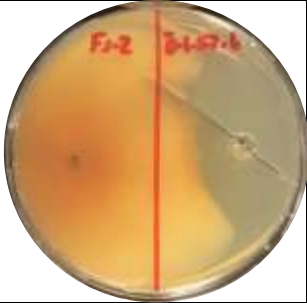
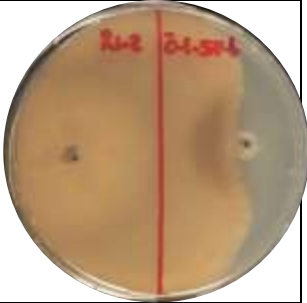
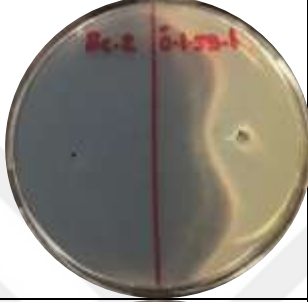
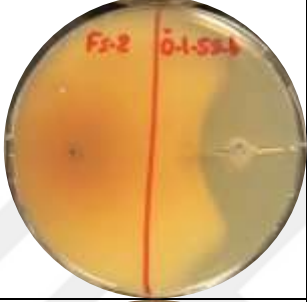
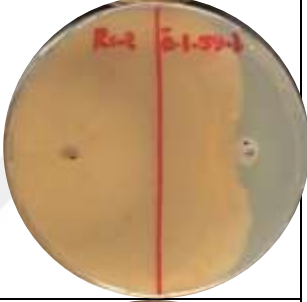
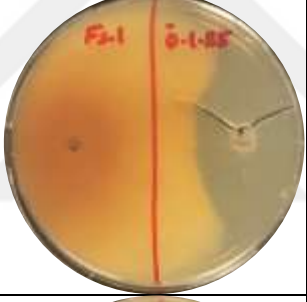
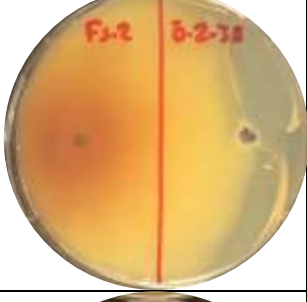
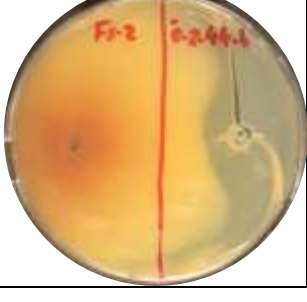
Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
Ç-2-30-b			
Ç-2-36			
Ç-3-10			
Ç-3-15-a			
Ç-3-19			

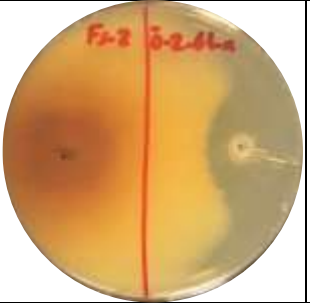
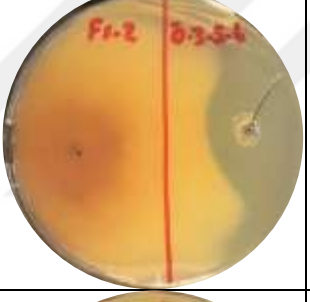
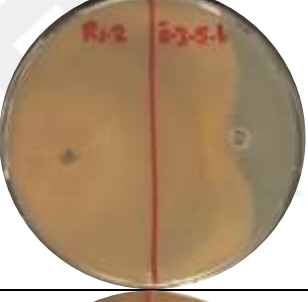
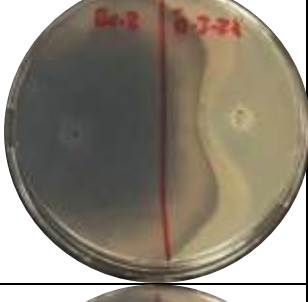
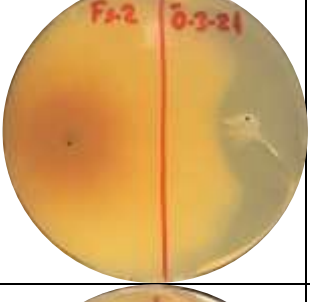
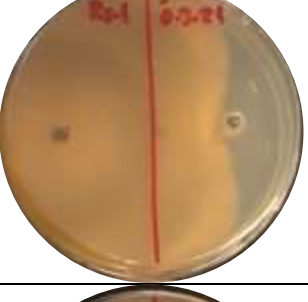
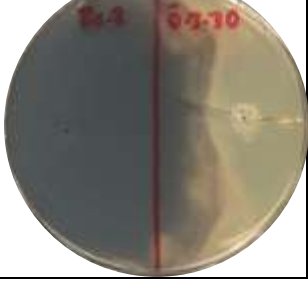
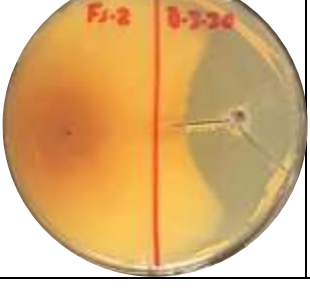
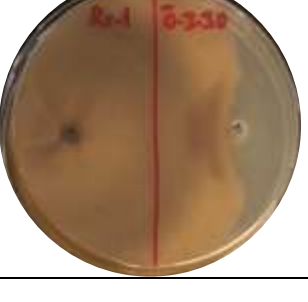
Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
Ç-3-22-a			
Ç-3-22-b			
Ç-3-23			
Ç-3-31			
Ö-1-31-b			

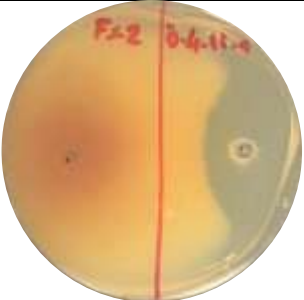
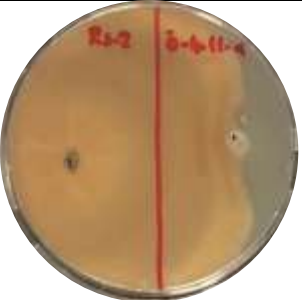
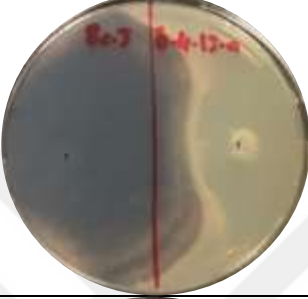
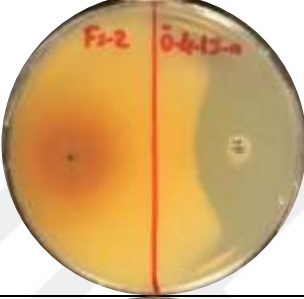
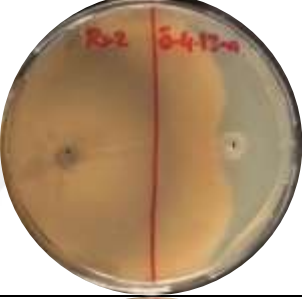
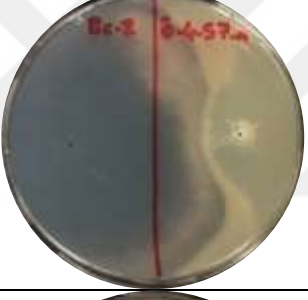
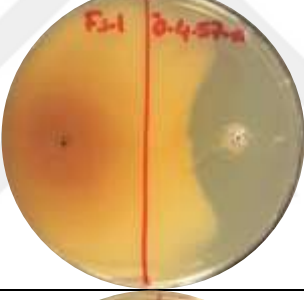
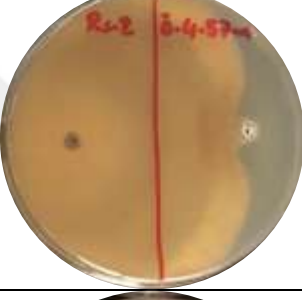
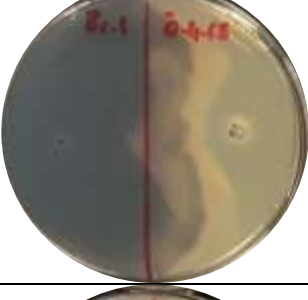
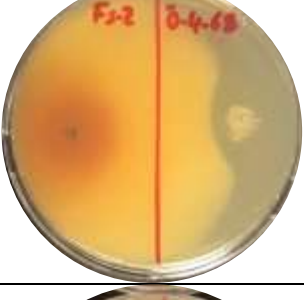
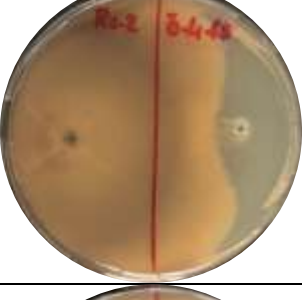
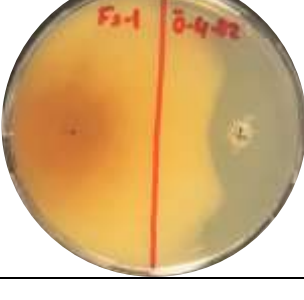
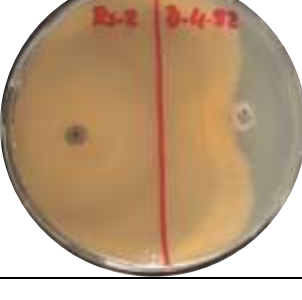
Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
Ö-1-57-b			
Ö-1-59-b			
Ö-1-85			
Ö-2-38			
Ö-2-44-b			

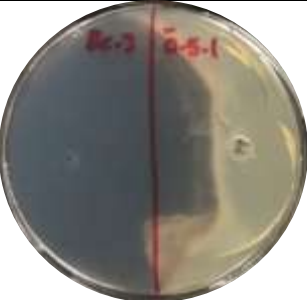
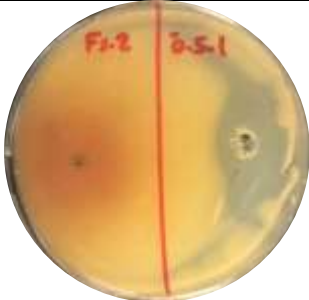
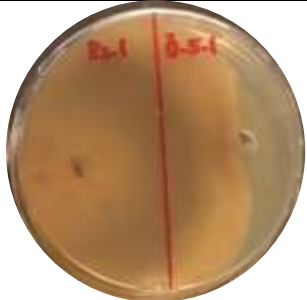
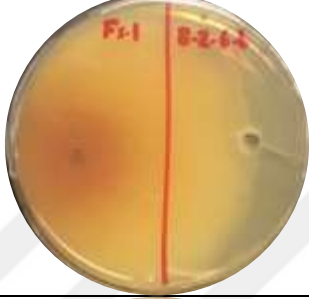
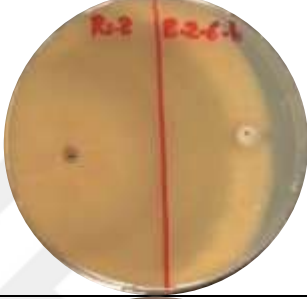
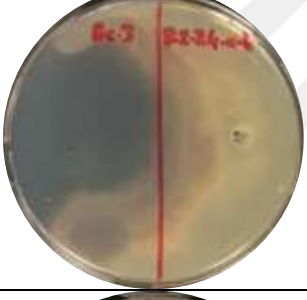
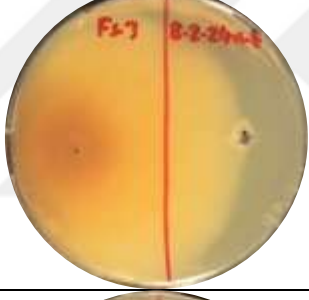
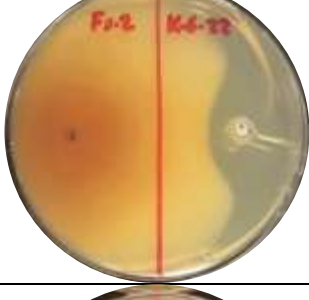
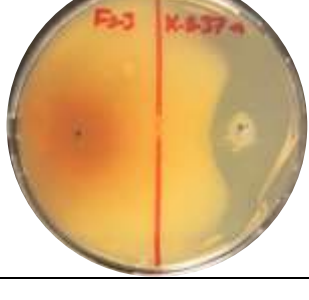
Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
Ö-2-61-a			
Ö-2-61-c			
Ö-3-5-b			
Ö-3-21			
Ö-3-30			

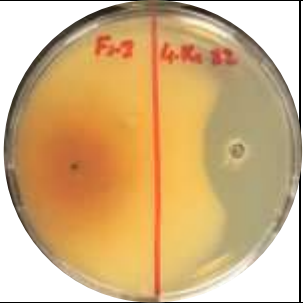
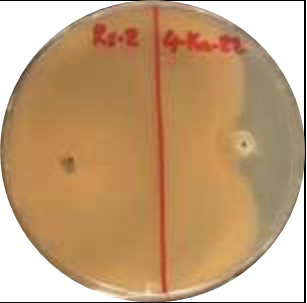
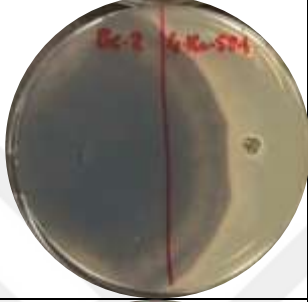
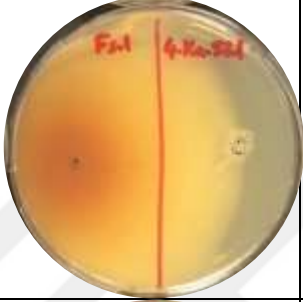
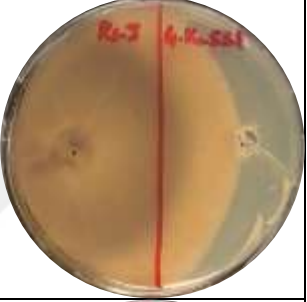
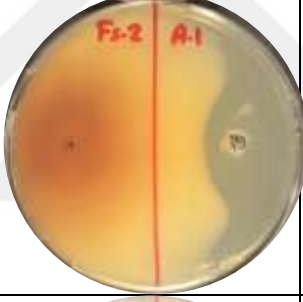
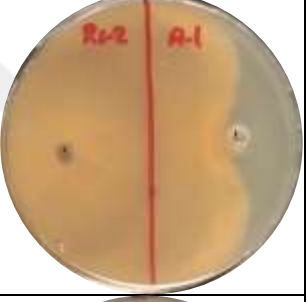
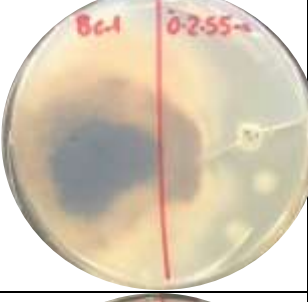
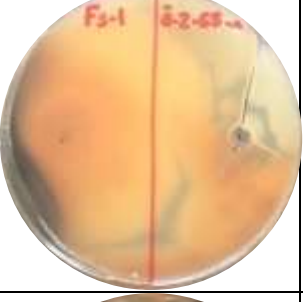
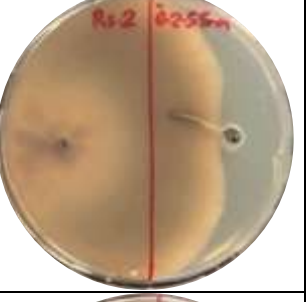
Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
Ö-4-11-a			
Ö-4-13-a			
Ö-4-57-a			
Ö-4-68			
Ö-4-82			

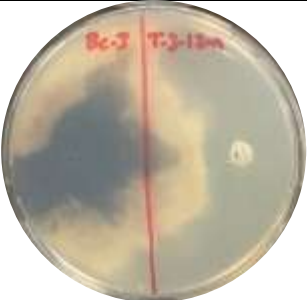
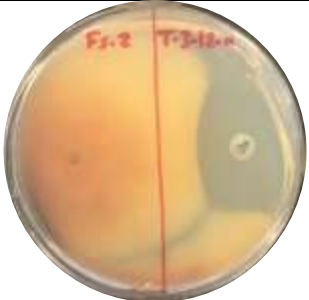
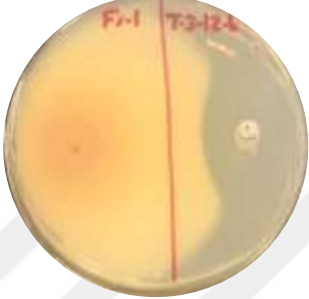
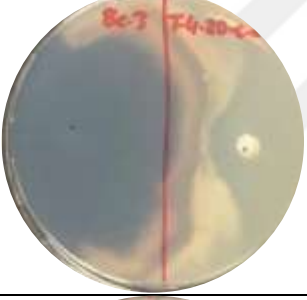
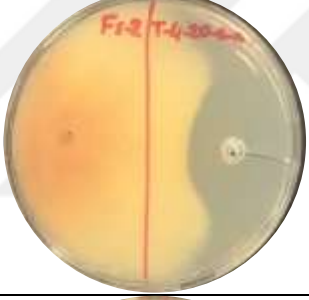
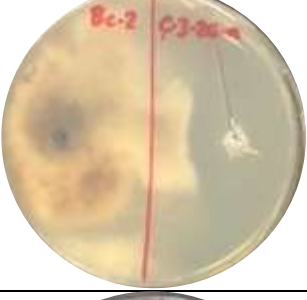
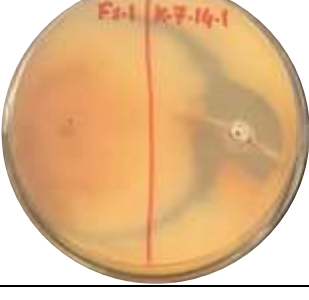
Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
Ö-5-1			
B-2-6-b			
B-2-24-a- b			
K-6-22			
K-9-37-a			

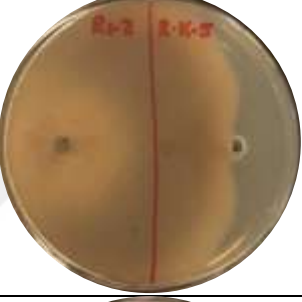
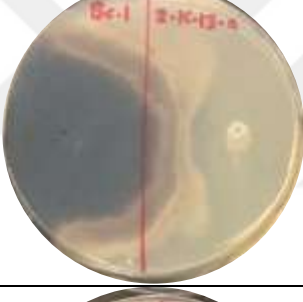
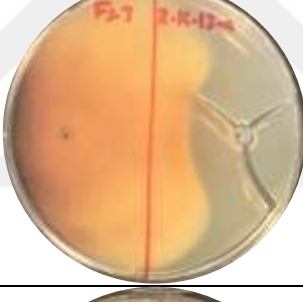
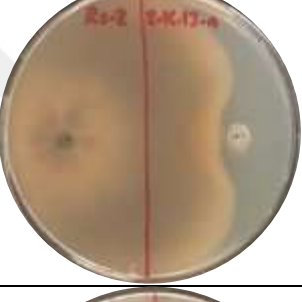
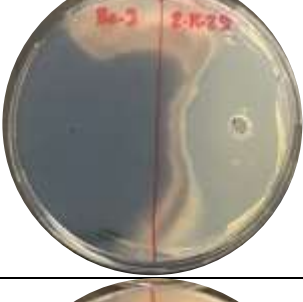
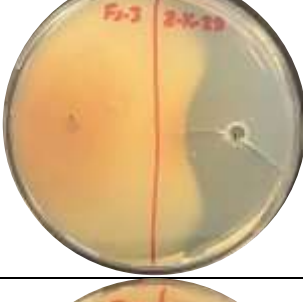
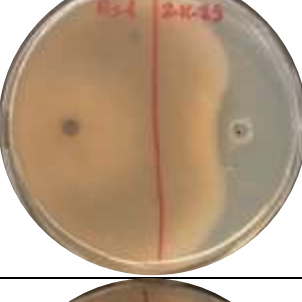
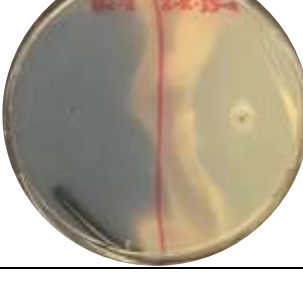
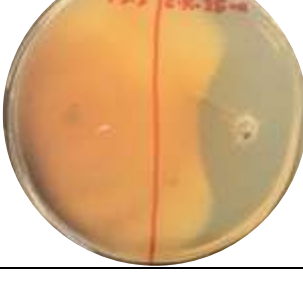
Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
4-Ka-22			
4-Ka-58-1			
A-1			
Ö-2-55-a			
Ö-4-57-b			

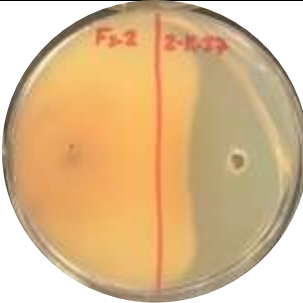
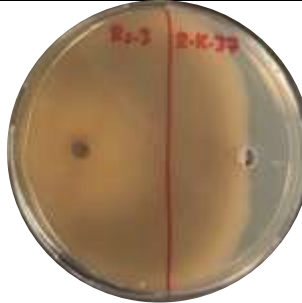
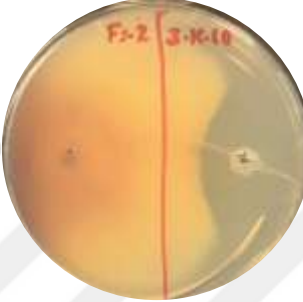
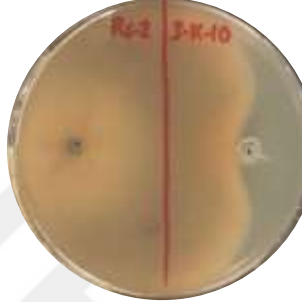
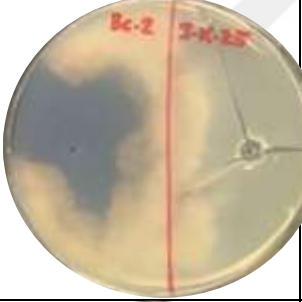
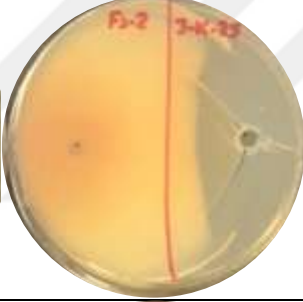
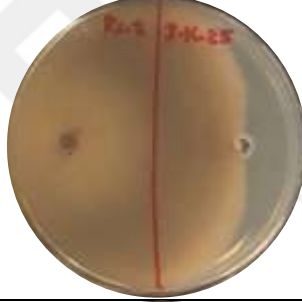
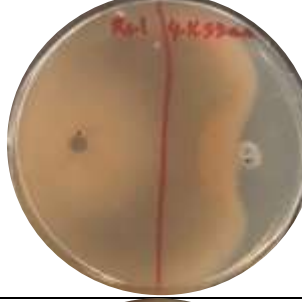
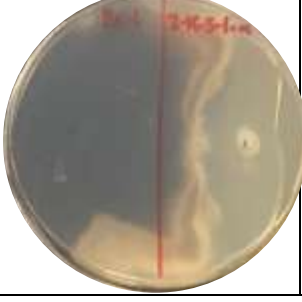
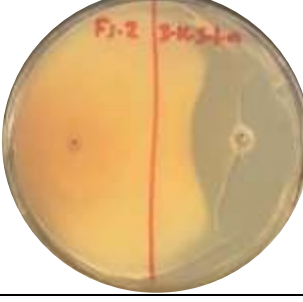
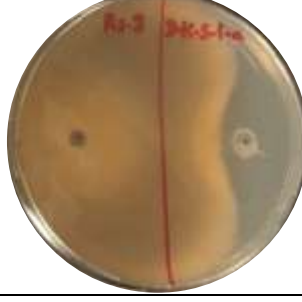
Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
T-3-12-a			
T-3-12-b			
T-4-20-e-a			
Ç-3-20-a			
K-7-14-1			

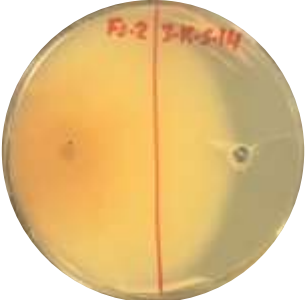
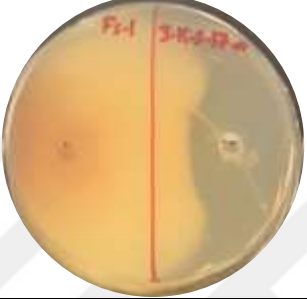
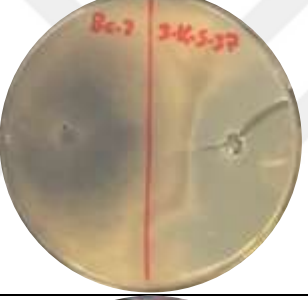
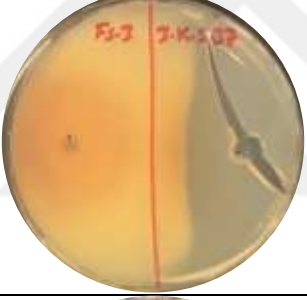
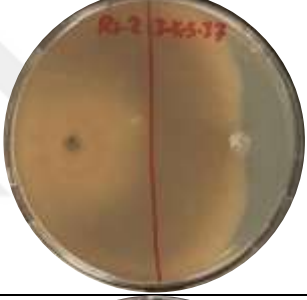
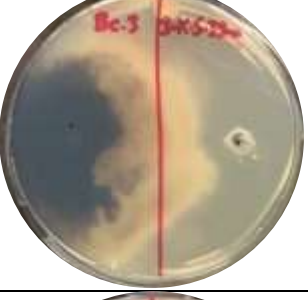
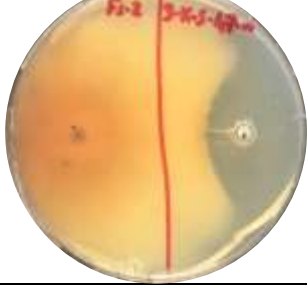
Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
1-K-49-a			
2-K-5			
2-K-13-a			
2-K-29			
2-K-35-a			

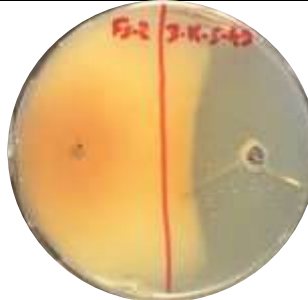
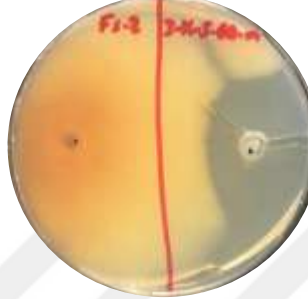
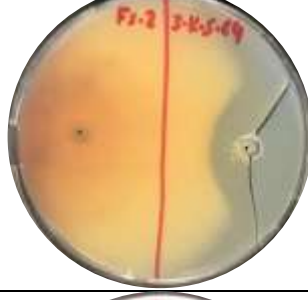
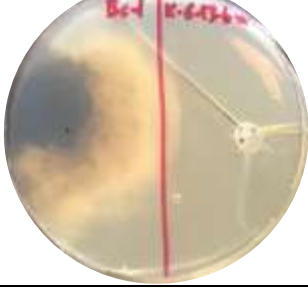
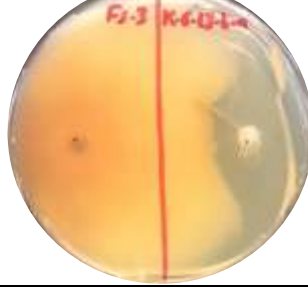
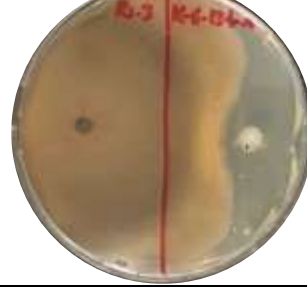
Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatogenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
2-K-37			
3-K-10			
3-K-25			
4-Ka-59-a-a			
3-K-S-1-a			

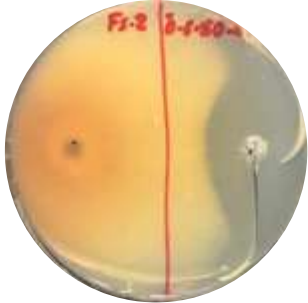
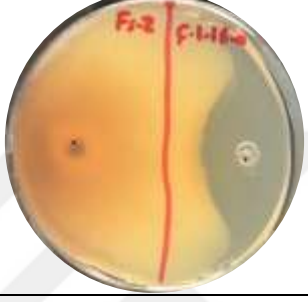
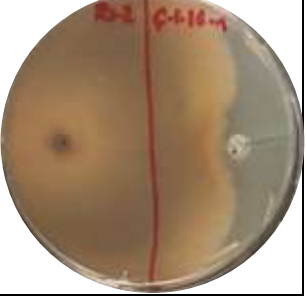
Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatogenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
3-K-S-14			
3-K-S-17-a			
3-K-S-37			
3-K-S-39-a			
3-K-S-47-a			

Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatogenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
3-K-S-49			
3-K-S-60-a			
3-K-S-61			
3-K-S-64			
K-6-13-b-a			

Şekil 4.10. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Fitopatojenik Funguslar		
	<i>Botrytis cinerea</i> (10.gün)	<i>Fusarium solani</i> (10.gün)	<i>Rhizoctonia solani</i> (5.gün)
Ö-6-50-a			
Ç-1-16-a			

Şekil 4.10. (devam)

4.2.6. Sürfaktin ve İturin A için Kuadrupol Uçuş Zamanlı (Q-TOF) Kütle Kromatografisi ile kantitatif analiz

HCl-Metanol yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstraktlardan sürfaktin (m/z 1036) ve iturin A (m/z 1043) için Q-TOF ile kantitatif analiz gerçekleştirilmiştir. İncelenen 69 adet *Bacillus* izolatının 68 tanesinde farklı konsantrasyonlarda sürfaktin ve iturin A üretimi belirlenmiştir. İzolatların 59 tanesinde (%85,5) İturin A, 65 tanesinde (%94,2) ise sürfaktin üretimi olduğu belirlenmiştir. 3-K-S-14 izolatında her iki siklik lipopeptid antibiyotiğin de üretilmediği görülmüştür. Ancak, agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile fitopatojenik funguslara karşı inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu durumun, diğer bir siklik lipopeptid olan fengisini üretmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sürfaktin ve iturin A için Q-TOF LC/MS ile belirlenen madde miktarları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Sürfaktin ve iturin A için Q-TOF LC/MS ile belirlenen madde miktarları.

Bacillus İzolatları	İturin A (mg/l)	Sürfaktin (mg/l)
T-1-18	16,94±0,4	7,89±1,7
T-18-a	17,28±0,8	6,64±0,1
T-2-2	31,09±1,8	12,77±1,1
T-2-16	31,05±2,3	12,55±1,4
T-3-10	0	13,91±0,2
T-4-8	32,27±2,9	12,28±0,5
T-4-9	28,82±0,6	12,41±1,7
T-4-13-a	25,47±1,9	14,05±1,5
T-4-14-a	45,39±13,0	12,94±1,4
T-4-14-b	30,73±2,5	10,93±6,9
T-4-15	27,69±1,9	14,29±2,3
T-4-17	0	10,16±2,0
T-4-19	0	3,06±3,9
T-11-8	23,55±0,4	11,84±6,1
Ç-2-30-a	18,37±0,9	7,12±0,3
Ç-2-30-b	28,99±0,2	10,93±2,9
Ç-2-36	0	12,53±1,4
Ç-3-10	33,46±0,8	12,77±1,4
Ç-3-15-a	38,18±2,8	10,23±0,2
Ç-3-19	0	13,05±0,7
Ç-3-22-a	29,4±4,7	12,8±8,5
Ç-3-23	22,1±0	23,0±13,5
Ç-3-31	5,9±0	35,4±13,1
Ö-1-31-b	27,4±3,9	26,5±16,1
Ö-1-57-b	0,1±0	34,0±4,3
Ö-1-59-b	32,7±0,9	29,0±13,2
Ö-1-85	32,0±0,1	38,2±4,0
Ö-2-44-b	15,5±0	29,4±5,7
Ö-2-61-a	29,6±0	25,4±2,6
Ö-3-5-b	0	28,3±2,9
Ö-3-21	33,3±0	35,0±13,7
Ö-4-11-a	0	41,0±3,1
Ö-4-13-a	0	39,8±3,4
Ö-4-68	28,0±10,4	31,2±10,7
Ö-4-82	0	25,5±10,0

Çizelge 4.8. (devam)

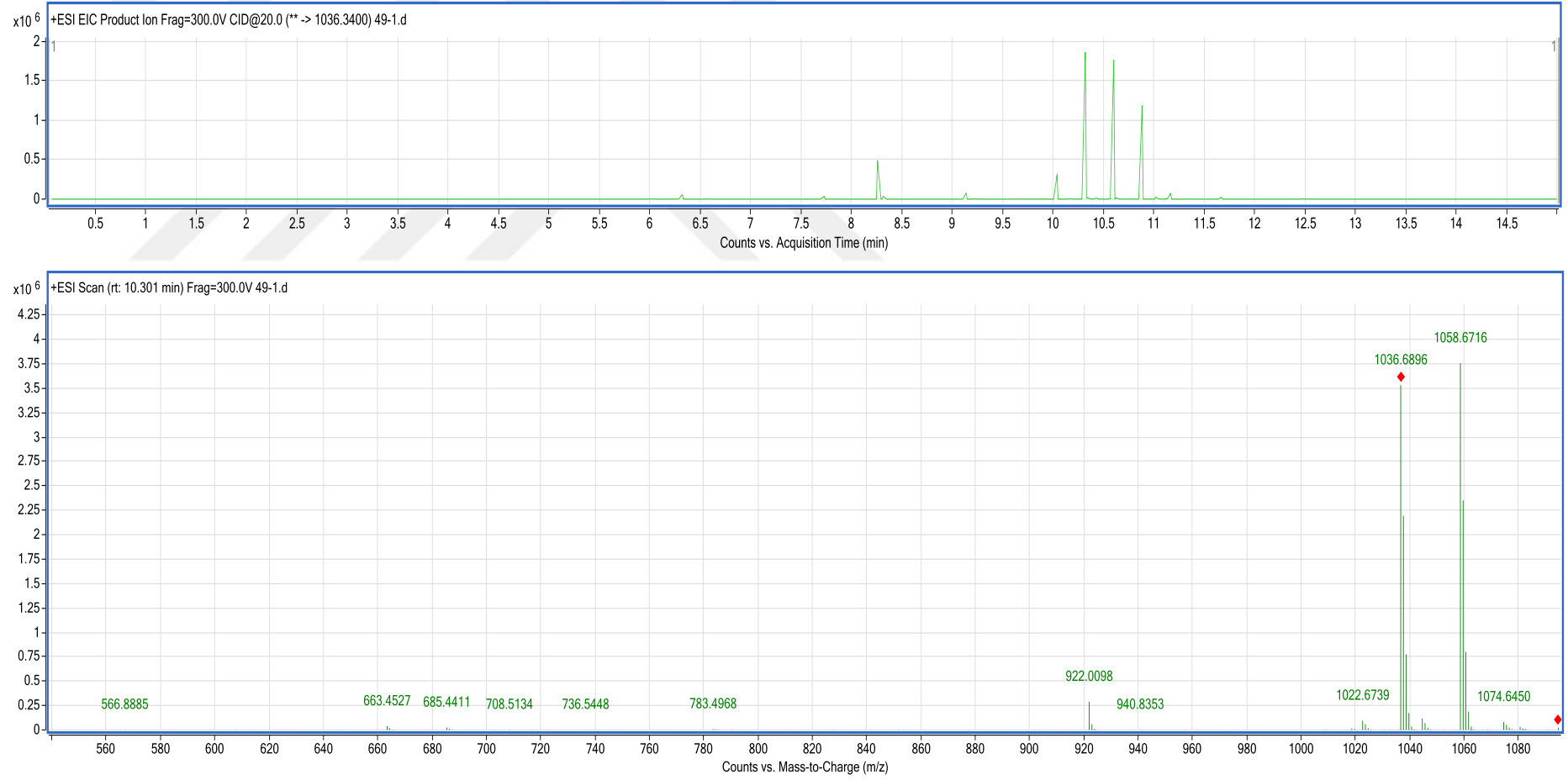
Bacillus İzolatları	İturin A (µg/ml)	Süpfaktin (µg/ml)
Ö-5-1	20,5±2,8	33,0±12,7
K-6-22	13,4±5,4	28,3±9,2
K-9-37-a	32,7±0,7	40,1±2,6
4-Ka-22	31,9±0,4	41,9±3,5
A-1	32,5±0	35,6±8,4
Ö-2-55-a	16,01±2,7	6,97±0,04
Ö-4-57-b	11,51±0,3	10,84±1,7
T-3-12-a	11,34±1,7	6,62±0,1
T-3-12-b	19,57±1,3	10,42±0,2
T-4-20-e-a	13,13±1,9	0
Ç-3-20-a	15,57±0,6	10,97±0,3
K-7-14-1	13,66±0,9	6,56±0,02
1-K-49-a	13,90±0,9	10,60±0,5
2-K-5	10,07±1,0	7,36±0,06
2-K-13-a	14,08±0,4	7,13±0,7
2-K-29	36,23±2,6	9,47±1,4
2-K-35-a	27,25±7,3	8,79±1,3
2-K-37	9,82±0,6	10,17±1,0
3-K-10	20,38±6,2	0
3-K-25	10,08±0,6	7,50±0,04
4-Ka-59-a-a	38,15±6,5	8,60±0,4
3-K-S-1-a	11,70±2,9	8,99±1,2
3-K-S-14	0	0
3-K-S-17-a	16,01±0,04	0
3-K-S-37	12,99±3,4	8,91±0,8
3-K-S-39-a	10,38±0,2	6,88±0,2
3-K-S-47-a	11,51±0,1	7,09±0,8
3-K-S-49	9,10±0,2	10,64±0,2
3-K-S-60-a	15,99±5,7	8,34±1,1
3-K-S-61	12,16±0,6	7,31±0,4
3-K-S-64	15,82±0,5	9,43±2,2
K-6-13-b-a	13,81±0,9	7,95±0,1
Ö-6-50-a	14,77±2,1	11,16±1,4
Ç-1-16-a	14,76±0,5	9,61±1,6

Lipopeptidlerin aktivitesi ile ilgili olarak yapılan farklı çalışmalarda, 0.1 mg/ml konsantrasyonunda *B.amyloliquefaciens* lipopeptitlerinin *B.cinerea*'ya karşı etkisinin olmadığını bildirilmiştir. *B.subtilis* için 0,5 ila 300 mg/ml arasında lipopeptid aktivitesi belirlenirken, *B.amyloliquefaciens* için 30 mg/ml konsantrasyonunda lipopeptitlerin maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, *Bacillus* XT1 CECT 8661 kullanıldığında 0,5-20 mg/ml konsantrasyon aralığında XT1 lipopeptitlerinin antifungal aktivitesi test edilmiştir ve bu bileşiklerin 8 mg/ml (MIC ve MFC) kadar düşük konsantrasyonlarda inhibe edici olduğu ve fungusit etkisi doğrulanmıştır (Toral et al., 2018).

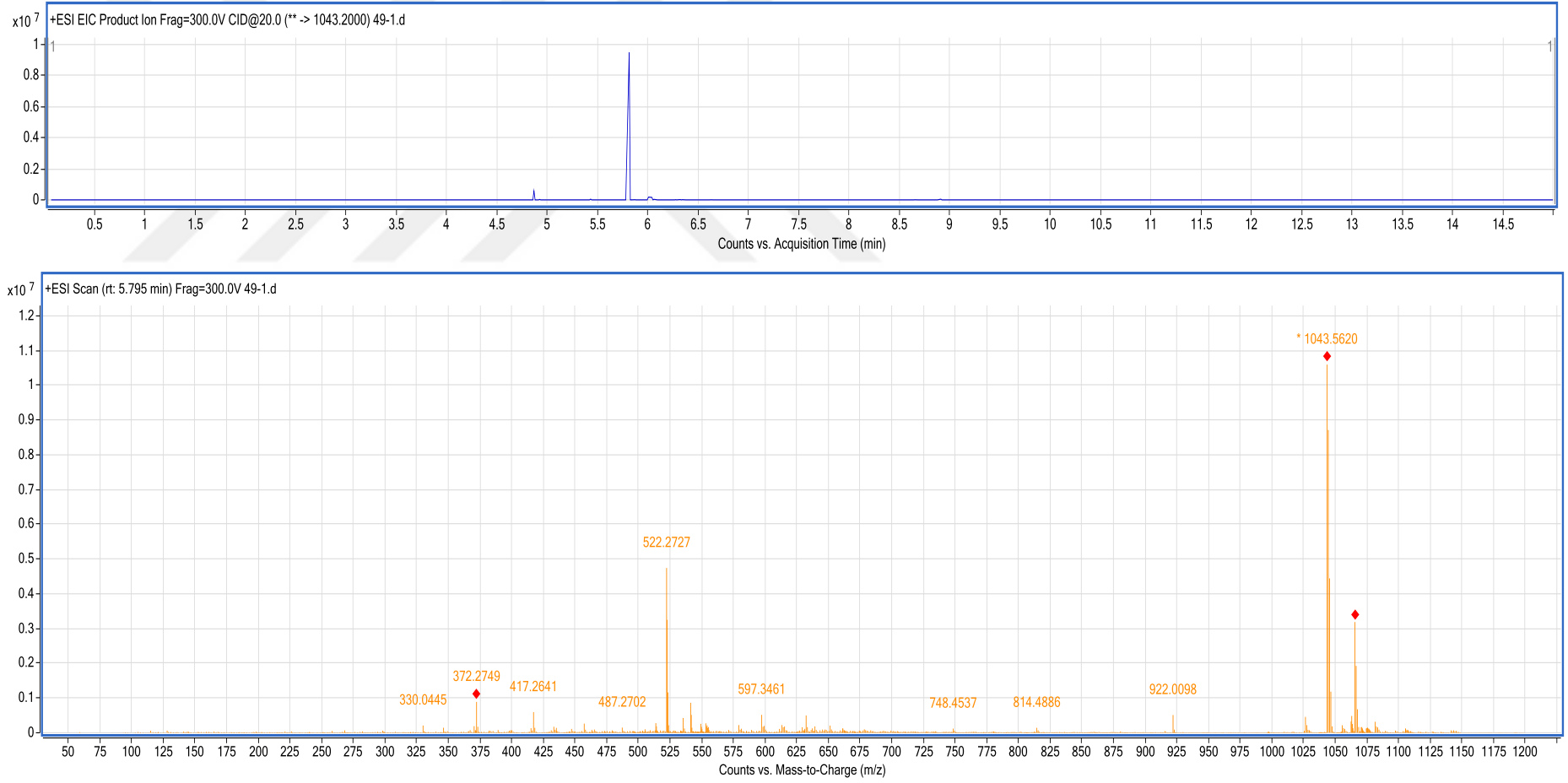
B.velezensis T701 suşu, Çin lahana turşusundan izole edilmiş yabani bir suştur. NB besiyerinde T701 suşundan üretilen lipopeptit, 769 mg/l konsantrasyonuna ulaşmıştır. Ayrıştırılmış ve saflaştırılmış iturin A2 (safılık = %99.5) kontrol olarak kullanılmıştır ve üretim ortamındaki iturin A-2 miktarı 110 mg/l olarak belirlenmiştir. Diğer suşlarla karşılaştırıldığında, T701 suşunun daha yüksek iturin A-2 üretme kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir (Jiang et al., 2021).

Çalışmada incelenen 68 adet *Bacillus* izolatında belirlenen minimum ve maksimum sürfaktin miktarları $3,06 \pm 3,9$ - $41,9 \pm 3,5$ µg/ml aralığında değişirken, iturin A miktarları ise $0,1 \pm 0$ - $45,39 \pm 13,0$ µg/ml aralığında değişmektedir. En yüksek sürfaktin miktarı 4-Ka-22 kodlu izolatta $41,9 \pm 3,5$ µg/ml, en yüksek iturin A miktarı ise T-4-14-a kodlu izolatta $45,39 \pm 13,0$ µg/ml olarak bulunmuştur.

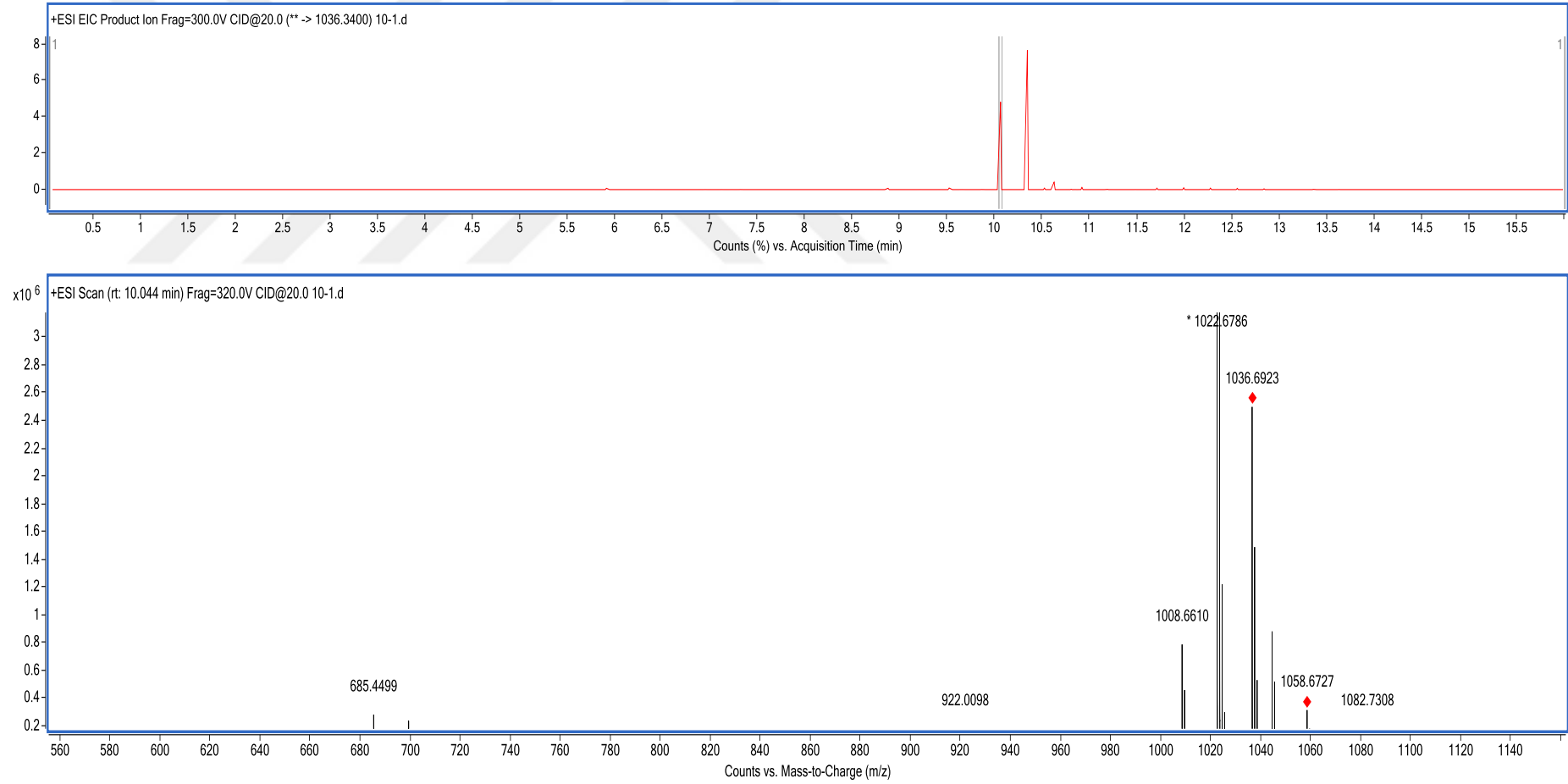
En yüksek sürfaktin ve iturin A miktarlarına sahip olan izolatlara ait kromatogramlar Şekil 4.11-Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.11. *Bacillus* sp. 4-Ka-22 izolatında Sürfaktin için elde edilen kromatogram.

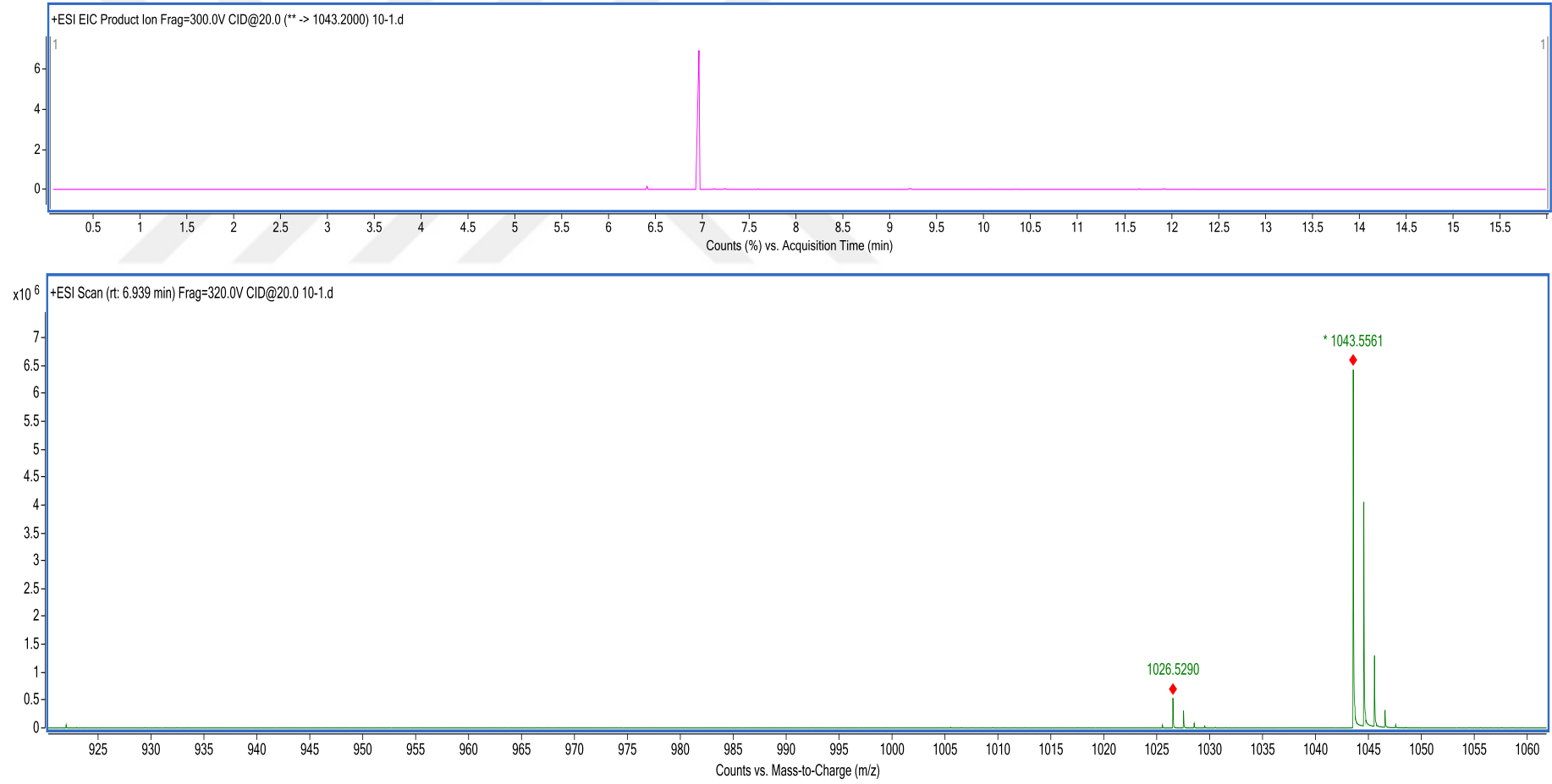


Şekil 4.12. *Bacillus* sp. 4-Ka-22 izolatında İturin A için elde edilen kromatogram.



Şekil 4.13. *Bacillus* sp. T-4-14-a izolatında Sürfaktin için elde edilen kromatogram.

152



Şekil 4.14. *Bacillus* sp. T-4-14-a izolatında İturin A için elde edilen kromatogram.

4.3. *Bacillus* İzolatlarının Litik Enzim Üretimlerinin İncelenmesi

4.3.1. *Bacillus* izolatlarının proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan 77 adet *Bacillus* izolatı da değişik miktarlarda proteaz enzim aktivitesi göstermiştir. Proteaz enzimi için proteaz enzim aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. *Bacillus* izolatlarının proteaz enzim aktivite değerleri, protein miktarları ve spesifik proteaz aktiviteleri.

<i>Bacillus</i> İzolatları	Proteaz Aktivitesi (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
T-1-18	180,0±15,5	0,047±0,006	3829,8±288,8
T-1-18-a	194,4±3,5	0,046±0,002	4226,1±101,6
T-2-2	60,0±3,6	0,046±0,006	1304,3±216,0
T-2-16	125,0±7,7	0,044±0,006	2840,9±227,1
T-3-10	135,3±6,2	0,046±0,005	2941,3±465,8
T-4-8	107,0±13,0	0,046±0,003	2326,1±452,4
T-4-9	129,0±8,7	0,044±0,001	2931,8±159,4
T-4-13-a	70,1±1,7	0,032±0,001	2190,6±145,0
T-4-14-a	90±1,9	0,043±0,0003	2093,0±27,1
T-4-14-b	30,5±5,0	0,032±0,001	953,1±196,0
T-4-15	139,0±21,1	0,056±0,007	2482,1±75,2
T-4-17	0,155±0,04	0,016±0,002	9,7±2,0
T-4-19	9,0±2,7	0,044±0,003	204,5±56,3
T-11-8	30,1±0,4	0,043±0,002	700,0±160,9
Ç-2-30-a	145,0±11,5	0,038±0,009	3815,8±597,5
Ç-2-30-b	148,3±2,7	0,026±0,003	5703,8±735,8
Ç-2-36	52,0±4,7	0,054±0,01	963,0±105,4
Ç-3-10	147,0±17,9	0,051±0,012	2882,3±390,5
Ç-3-15-a	174,5±9,7	0,052±0,009	3355,8±367,5
Ç-3-19	116,3±58,1	0,041±0,004	2836,6±1609,3
Ç-3-22-a	83,2±47,3	0,056±0,019	1485,7±1287,0
Ç-3-22-b	134,4±2,0	0,056±0,001	2400,0±71,7
Ç-3-23	166,3±6,2	0,025±0,002	6652,0±848,1
Ç-3-31	172,5±5,6	0,054±0,0003	3194,4±87,5

Çizelge 4.9. (devam)

Bacillus İzolatları	Proteaz Aktivitesi (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Ö-1-31-b	108,0±17,6	0,025±0,005	4320,0±144,9
Ö-1-57-b	65,0±1,9	0,038±0,002	1710,5±115,7
Ö-1-59-b	135,4±5,5	0,022±0,005	6154,5±1800,1
Ö-1-85	93,3±9,2	0,023±0,002	4056,5±813,6
Ö-2-38	60,5±1,6	0,024±0,004	2520,8±358,5
Ö-2-44-b	127,0±8,7	0,029±0,003	4379,3±317,3
Ö-2-61-a	119,1±4,2	0,028±0,002	4253,6±411,2
Ö-2-61-c	118,1±5,0	0,027±0,001	4374,1±152,0
Ö-3-5-b	149,5±1,7	0,029±0,003	5155,2±430,7
Ö-3-21	78,2±14,9	0,031±0,005	2522,6±143,4
Ö-3-30	13,0±2,8	0,033±0,002	393,9±103,1
Ö-4-11-a	111,1±1,3	0,021±0,0008	5290,5±199,8
Ö-4-13-a	144,1±4,5	0,045±0,0005	3202,2±92,0
Ö-4-57-a	102,0±1,8	0,038±0,0003	2684,2±60,7
Ö-4-68	160,1±1,5	0,042±0,001	3811,9±117,8
Ö-4-82	164,0±1,2	0,050±0,001	3280,0±106,3
Ö-5-1	65,2±23,3	0,022±0,002	2963,6±1134,9
B-2-6-b	1,5±0,6	0,009±0,0001	200,0±60,7
B-2-24-a-b	3,0±1,0	0,014±0,0002	214,3±70,9
K-6-22	130,0±18,7	0,040±0,005	3250,0±69,8
K-9-37-a	142,0±28,8	0,034±0,002	4176,5±1076,5
4-Ka-22	130,4±3,8	0,036±0,0005	3622,2±62,9
4-Ka-58-1	12,0±2,5	0,011±0,0003	1090,9±228,9
A-1	126,0±0,4	0,042±0,0008	3000,0±55,9
Ö-2-55-a	143,1±11,2	0,059±0,0012	2424,4±161,3
Ö-4-57-b	98,3±20,0	0,036±0,0028	2742,5±515,4
T-3-12-a	76,2±12,4	0,026±0,0018	2940,3±291,0
T-3-12-b	104,9±19,1	0,036±0,0075	2879,3±205,5
T-4-20-e-a	106,7±31,0	0,043±0,0118	2511,0±329,7
Ç-3-20-a	67,7±25,8	0,045±0,0041	1477,8±419,1
K-7-14-1	95,7±11,1	0,041±0,0016	2339,9±207,4
1-K-49-a	94,7±9,5	0,029±0,0025	3267,7±45,2
2-K-5	62,2±6,9	0,015±0,0017	4094,9±142,3

Çizelge 4.9. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Proteaz Aktivitesi (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
2-K-13-a	85,1±22,5	0,035±0,0064	2374,9±268,3
2-K-29	118,8±21,7	0,048±0,0152	2610,2±633,8
2-K-35-a	68,1±14,5	0,037±0,0022	1836,8±330,2
2-K-37	78,1±24,1	0,064±0,0179	1222,7±203,0
3-K-10	80,4±9,4	0,037±0,0026	2136,8±107,0
3-K-25	60,5±18,1	0,048±0,0101	1241,8±109,3
4-Ka-59-a-a	116,3±2,3	0,051±0,003	2290,7±107,7
3-K-S-1-a	85,2±5,3	0,044±0,0022	1949,8±103,3
3-K-S-14	113,3±23,6	0,056±0,0094	2030,9±393,4
3-K-S-17-a	103,8±27,8	0,041±0,0077	2485,4±223,8
3-K-S-37	39,3±12,3	0,050±0,0023	778,4±237,1
3-K-S-39-a	72,5±1,9	0,029±0,0028	2499,7±175,3
3-K-S-47-a	67,8±15,6	0,044±0,0071	1574,8±467,8
3-K-S-49	25,1±9,1	0,030±0,0049	878,3±461,5
3-K-S-60-a	92,7±18,5	0,034±0,007	2764,0±473,1
3-K-S-61	73,1±13,5	0,032±0,004	2310,7±426,3
3-K-S-64	74,2±4,3	0,036±0,0016	2039,5±44,7
K-6-13-b-a	93,6±25,5	0,038±0,0064	2461,1±311,8
Ö-6-50-a	116,6±9,8	0,052±0,0096	2297,3±329,6
Ç-1-16-a	101,4±35,8	0,042±0,0059	2383,0±642,3

İncelenen *Bacillus* izolatları arasından en düşük proteaz aktivitesini 0,155±0,04 U/ml ile T-4-17 kodlu izolat gösterirken spesifik aktivitesi de 9,7±2,0 U/mg olarak bulunmuştur. En yüksek proteaz aktivitesini ise 194,4±3,5 U/ml ile T-1-18-a kodlu izolat gösterirken spesifik aktivitesi de 4226,1±101,6 U/mg olarak bulunmuştur. Ayrıca, en düşük spesifik aktiviteyi 9,7±2,0 U/mg ile T-4-17 izolatı gösterirken en yüksek spesifik aktiviteyi ise 6652,0±848,1 U/mg ile Ç-3-23 izolatı göstermiştir.

Çalışmamızdaki pek çok *Bacillus* izolatı ile literatürde elde edilenlerden (Çizelge 4.10) çok daha yüksek spesifik proteaz enzim aktivitesi değeri elde edilmiştir.

Çizelge 4.10. Literatürde incelenen farklı *Bacillus* türlerinin proteaz aktiviteleri.

<i>Bacillus</i> türleri	Proteaz aktivitesi	Referans
<i>Bacillus sp.</i> RGR-14	750 U/ml	Puri et al., 2002
<i>Bacillus mojavensis</i>	558 U/ml	Beg et al., 2003
<i>Bacillus spp.</i>	137 U/ml, 87 U/ml, 94 U/ml	Akbal, 2011
<i>Bacillus sp.</i> CR-179	340,908 U/ml	Akhavan Sepahy and Jabalameli, 2011
<i>Bacillus cereus</i> FT1	152 U/ml	Asha and Palaniswamy, 2018
<i>Bacillus subtilis</i> ALICA	345,7 U/mg	Abdelmoteleb et al., 2017
<i>Bacillus sp.</i> L2	54,02 U/ml; 51,65 U/mg	Pertiwinigrum et al., 2017
<i>Bacillus subtilis</i> FBL-1	35,6 U/mg	Si et al., 2018
<i>Bacillus cereus</i> TSA5	60,41 U/mg	Thomas et al., 2021
<i>Bacillus spp.</i>	0,155-194,4 U/ml; 9,7-6652 U/mg	Bu çalışmada (Çizelge 4.9)

Enzim aktivite değerlerinin birbirinden farklı olmasının, *Bacillus* suşlarının enzim üretme kapasiteleri arasındaki farklılıktan ve aktivite ölçümü için kullanılan yöntemlerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.3.2. *Bacillus* izolatlarının kitinaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan 77 adet *Bacillus* izolatından 66 tanesinin (%85,7) değişik miktarlarda kitinaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, 11 tane izolatta (Ç-3-22-a, Ç-3-22-b, Ç-3-23, Ö-1-31-b, Ö-2-38, Ö-3-5-b, Ö-3-30, Ö-4-11-a, Ç-3-20-a, K-7-14-1, 3-K-S-37) kitinaz enzim aktivitesi belirlenememiştir. Kitinaz enzimi için hesaplanan kitinaz aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

Yapılan çalışmada en düşük kitinaz aktivitesini $0,005 \pm 0,002$ U/ml ile Ö-2-61-c ve $0,005 \pm 0,022$ U/ml ile T-3-12-b kodlu izolatlar göstermiştir. En yüksek kitinaz aktivitesini ise $0,5 \pm 0,06$ U/ml ile T-4-9 ve $0,5 \pm 0,104$ U/ml ile 3-K-S-39-a kodlu izolatlar göstermiştir. En düşük spesifik aktiviteyi $0,22 \pm 0,11$ U/mg ile Ö-2-61-c izolatu gösterirken en yüksek spesifik aktiviteyi ise $46,64 \pm 8,69$ U/mg ile 2-K-5 izolatu göstermiştir.

Çizelge 4.11. *Bacillus* izolatlarının kitinaz enzim aktivite değerleri, protein miktarları ve spesifik kitinaz aktiviteleri.

<i>Bacillus</i> İzolatları	Kitinaz Aktivitesi (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
T-1-18	0,42±0,04	0,030±0,003	14,15±2,4
T-1-18-a	0,39±0,02	0,036±0,002	10,94±1,33
T-2-2	0,43±0,02	0,030±0,005	14,14±1,82
T-2-16	0,44±0,02	0,034±0,008	13,55±4,14
T-3-10	0,44±0,02	0,028±0,002	15,82±1,92
T-4-8	0,43±0,04	0,024±0,005	18,4±5,27
T-4-9	0,50±0,06	0,029±0,004	17,46±1,71
T-4-13-a	0,47±0,01	0,025±0,003	19,05±1,77
T-4-14-a	0,46±0,02	0,029±0,001	15,91±0,65
T-4-14-b	0,45±0,02	0,030±0,005	15,30±2,82
T-4-15	0,44±0,01	0,025±0,003	17,50±2,58
T-4-17	0,44±0,01	0,024±0,001	18,35±1,2
T-4-19	0,28±0,03	0,025±0,006	11,48±1,93
T-11-8	0,30±0,09	0,021±0,004	14,30±1,68
Ç-2-30-a	0,28±0,11	0,023±0,001	11,88±4,26
Ç-2-30-b	0,16±0,05	0,016±0,001	9,95±3,35
Ç-2-36	0,38±0,07	0,025±0,003	15,65±4,54
Ç-3-10	0,34±0,06	0,022±0,001	15,36±3,56
Ç-3-15-a	0,02±0	0,026±0,001	0,73±0,04
Ç-3-19	0,02±0,002	0,020±0,01	0,9±0,5
Ç-3-31	0,03±0,004	0,021±0,002	1,45±0,11
Ö-1-57-b	0,01±0,002	0,024±0,001	0,26±0,09
Ö-1-59-b	0,01±0,006	0,020±0,002	0,45±0,33
Ö-1-85	0,02±0,01	0,028±0,003	0,70±0,44
Ö-2-44-b	0,01±0,006	0,021±0,003	0,40±0,21
Ö-2-61-a	0,006±0,002	0,022±0,001	0,28±0,11
Ö-2-61-c	0,005±0,002	0,023±0,001	0,22±0,11
Ö-3-21	0,007±0,004	0,015±0,003	0,55±0,36
Ö-4-13-a	0,04±0,009	0,022±0,001	1,70±0,4
Ö-4-57-a	0,05±0,009	0,029±0,003	1,62±0,35
Ö-4-68	0,05±0,009	0,023±0,003	2,03±0,68
Ö-4-82	0,04±0,009	0,029±0,004	1,25±0,14
Ö-5-1	0,04±0,007	0,024±0,002	1,58±0,3

Çizelge 4.11. (devam)

Bacillus İzolatları	Kitinaz Aktivitesi (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
B-2-6-b	0,03±0,004	0,019±0,004	1,65±0,56
B-2-24-a-b	0,03±0,011	0,024±0,005	1,24±0,75
K-6-22	0,03±0,006	0,022±0,003	1,52±0,19
K-9-37-a	0,03±0,009	0,026±0,001	1,02±0,29
4-Ka-22	0,02±0,004	0,020±0,001	0,87±0,29
4-Ka-58-1	0,02±0,006	0,022±0,001	1,04±0,33
A-1	0,01±0,002	0,022±0,005	0,39±0,03
Ö-2-55-a	0,13±0,045	0,015±0,0003	8,77±3,06
Ö-4-57-b	0,09±0,006	0,013±0,0006	6,39±0,57
T-3-12-a	0,05±0,04	0,010±0,0001	5,04±3,84
T-3-12-b	0,005±0,022	0,010±0,0014	0,5±0,14
T-4-20-e-a	0,01±0,004	0,010±0,0003	1,10±0,34
1-K-49-a	0,010±0,006	0,009±0,001	0,89±0,54
2-K-5	0,46±0,097	0,010±0,0005	46,64±8,69
2-K-13-a	0,05±0,004	0,009±0,0005	5,13±0,13
2-K-29	0,20±0,094	0,013±0,0005	15,24±6,59
2-K-35-a	0,12±0,023	0,012±0,0007	10,44±1,43
2-K-37	0,24±0,094	0,014±0,0003	17,64±7,11
3-K-10	0,14±0,093	0,013±0,0009	10,74±7,18
3-K-25	0,13±0,086	0,012±0,0009	10,59±7,22
4-Ka-59-a-a	0,04±0,013	0,013±0,0005	3,22±1,19
3-K-S-1-a	0,16±0,004	0,013±0,0001	12,55±0,39
3-K-S-14	0,09±0,007	0,012±0,0008	7,74±0,58
3-K-S-17-a	0,06±0,011	0,013±0,0013	4,48±0,71
3-K-S-39-a	0,5±0,104	0,013±0,0011	38,87±5,97
3-K-S-47-a	0,17±0,061	0,014±0,0006	11,69±4,31
3-K-S-49	0,02±0,008	0,015±0,0013	1,21±0,64
3-K-S-60-a	0,01±0,004	0,014±0,0005	0,78±0,24
3-K-S-61	0,1±0,078	0,014±0,0006	7,28±5,6
3-K-S-64	0,17±0,042	0,014±0,0009	12,31±2,17
K-6-13-b-a	0,15±0,052	0,016±0,0023	10,10±4,43
Ö-6-50-a	0,11±0,011	0,016±0,004	7,18±1,73
Ç-1-16-a	0,22±0,068	0,013±0,0005	14,01±4,68

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında (Çizelge 4.12) kitinaz aktivitelerinin düşük olmasına rağmen spesifik kitinaz enzim aktivitesi için benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

Çizelge 4.12. Literatürde incelenen farklı *Bacillus* türlerinin kitinaz aktiviteleri.

Bacillus türleri	Kitinaz aktivitesi	Aktivite yöntemi	Referans
<i>Bacillus</i> sp. Hu1	11,1 U/mg	DNS yöntemi (60°C)	Dai et al., 2011
<i>B.subtilis</i> SL-13	2,96 U/ml	DNS yöntemi (50°C)	Yan et al., 2011
<i>B.thuringiensis</i>	1,28 U/mg	Modifiye DNS yöntemi (60°C)	Gomaa, 2012
<i>B.licheniformis</i>	1,2 U/mg	Modifiye DNS yöntemi (60°C)	Gomaa, 2012
<i>B.cereus</i> VITSD3	3,2 U/mg	DNS yöntemi (37°C)	Devi et al., 2014
<i>B.licheniformis</i> S213	0,19 U/ml	DNS yöntemi (50°C)	Slimene et al., 2015
<i>Bacillus</i> sp. AJ1	3,93 U/ml	DNS yöntemi (50°C)	Thakkar et al., 2016
<i>B.subtilis</i> B298	6,937 U/ml	DNS yöntemi (37°C)	Lestari et al., 2017
<i>B.licheniformis</i> B307	14 U/ml	DNS yöntemi (50°C)	Akeed et al., 2020
<i>B.velezensis</i> SZAD2	1,69 U/ml	DNS yöntemi (50°C)	Sherzad and Canming, 2020
<i>Bacillus</i> sp. WS4F	0,0949 U/ml; 0,36 U/mg	DNS yöntemi (37°C)	Astuti et al., 2021
<i>Bacillus</i> spp.	0,005-0,5 U/ml; 0,22-46,64 U/mg	DNS yöntemi (55°C)	Bu çalışmada (Çizelge 4.11)

4.3.3. *Bacillus* izolatlarının kitosanaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan 77 adet *Bacillus* izolatından 54 tanesi (%70,1) değişik miktarlarda kitosanaz enzim aktivitesi göstermiştir. Ancak, 23 tane izolatta (T-4-13-a, T-4-14-a, T-11-8, Ç-2-36, Ç-3-22-b, Ç-3-23, Ö-2-61-c, Ö-3-5-b, Ö-3-21, Ö-3-30, Ö-4-11-a, Ö-4-13-a, Ö-4-57-a, Ö-4-68, Ö-4-82, B-2-24-a-b, K-6-22, K-9-37-a, 4-Ka-22, 4-Ka-58-1, 3-K-S-14, 3-K-S-37, K-6-13-b-a) kitosanaz enzim aktivitesi belirlenememiştir. Kitosanaz enzimi için hesaplanan kitosanaz aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri Çizelge 4.13'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. *Bacillus* izolatlarının kitosanaz enzim aktivite değerleri, protein miktarları ve spesifik kitosanaz aktiviteleri.

<i>Bacillus</i> İzolatları	Kitosanaz Aktivitesi (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
T-1-18	0,288±0,02	0,026±0,001	11,26±1,07
T-1-18-a	0,264±0,01	0,025±0,001	10,44±0,54
T-2-2	0,340±0,03	0,029±0,001	11,65±0,7
T-2-16	0,391±0,1	0,033±0,001	11,92±2,65
T-3-10	0,260±0,01	0,030±0,002	8,78±0,45
T-4-8	0,275±0,02	0,030±0,001	9,12±0,81
T-4-9	0,252±0,01	0,030±0,001	8,27±0,42
T-4-14-b	0,282±0,03	0,033±0,004	8,58±1,51
T-4-15	0,258±0,01	0,030±0,001	8,65±0,41
T-4-17	0,257±0,01	0,032±0,001	8,13±0,45
T-4-19	0,255±0,005	0,030±0,003	8,65±0,64
Ç-2-30-a	0,257±0,01	0,026±0,001	9,86±0,68
Ç-2-30-b	0,262±0,02	0,023±0,002	11,28±0,96
Ç-3-10	0,254±0,01	0,026±0,002	9,86±1,07
Ç-3-15-a	0,274±0,02	0,023±0,001	11,89±0,47
Ç-3-19	0,263±0,01	0,023±0,002	11,23±0,5
Ç-3-22-a	0,262±0	0,031±0,001	8,52±0,21
Ç-3-31	0,260±0,01	0,021±0	12,13±0,61
Ö-1-31-b	0,251±0,002	0,024±0,001	10,23±0,4
Ö-1-57-b	0,260±0,002	0,030±0,001	8,70±0,32
Ö-1-59-b	0,277±0,02	0,025±0,001	11,25±0,9
Ö-1-85	0,279±0,01	0,025±0,002	10,97±0,41
Ö-2-38	0,260±0,005	0,021±0	12,05±0,16
Ö-2-44-b	0,260±0,01	0,024±0	10,68±0,33
Ö-2-61-a	0,268±0,01	0,025±0,002	10,93±0,92
Ö-5-1	0,260±0,02	0,020±0,002	12,99±2,16
B-2-6-b	0,254±0,005	0,011±0,002	22,17±2,82
A-1	0,265±0,005	0,026±0,001	10,04±0,25
Ö-2-55-a	0,4±0,036	0,038±0,004	10,64±0,54
Ö-4-57-b	0,425±0,050	0,034±0,003	12,40±2,08
T-3-12-a	0,385±0,003	0,027±0,003	14,33±1,44
T-3-12-b	0,283±0,016	0,025±0,004	11,59±1,34

Çizelge 4.13. (devam)

<i>Bacillus</i> İzolatları	Kitosanaz Aktivitesi (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
T-4-20-e-a	0,269±0,018	0,029±0,004	9,43±1,61
Ç-3-20-a	0,481±0,057	0,025±0,002	18,77±1,14
K-7-14-1	0,36±0,017	0,031±0,003	11,86±2,0
1-K-49-a	0,363±0,022	0,027±0,003	13,51±0,89
2-K-5	0,375±0,022	0,026±0,003	14,38±1,08
2-K-13-a	0,55±0,092	0,026±0,002	21,27±3,28
2-K-29	0,392±0,008	0,023±0,002	16,73±1,34
2-K-35-a	0,38±0,033	0,022±0,002	17,28±0,33
2-K-37	0,277±0,005	0,028±0,003	10,12±1,05
3-K-10	0,293±0,027	0,029±0,002	10,25±1,34
3-K-25	0,294±0,014	0,021±0,001	14,11±0,56
4-Ka-59-a-a	0,285±0,026	0,025±0,003	11,71±2,24
3-K-S-1-a	0,252±0,005	0,030±0,003	8,33±0,71
3-K-S-17-a	0,265±0,03	0,028±0,002	9,58±1,16
3-K-S-39-a	0,283±0,043	0,024±0,001	11,71±1,4
3-K-S-47-a	0,257±0,005	0,032±0,002	8,02±0,55
3-K-S-49	0,304±0,066	0,033±0,003	9,22±1,18
3-K-S-60-a	0,266±0,005	0,032±0,002	8,22±0,38
3-K-S-61	0,269±0,019	0,029±0,004	9,36±1,68
3-K-S-64	0,257±0,005	0,031±0,003	8,28±0,96
Ö-6-50-a	0,269±0,016	0,031±0,003	8,70±1,05
Ç-1-16-a	0,269±0,003	0,032±0,002	8,30±0,6

İncelenen *Bacillus* izolatları arasından en düşük kitosanaz enzim aktivitesini 0,251±0,002 U/ml ile Ö-1-31-b izolatı gösterirken kitosanaz spesifik enzim aktivitesi ise 10,23±0,4 U/mg olarak bulunmuştur. En yüksek kitosanaz enzim aktivitesini 0,55±0,092 U/ml ile 2-K-13-a izolatı gösterirken kitosanaz spesifik enzim aktivitesi ise 21,27±3,28 U/mg olarak bulunmuştur. En düşük spesifik aktiviteyi 8,02±0,55 U/mg ile 3-K-S-47-a izolatı gösterirken en yüksek spesifik aktiviteyi ise 22,17±2,82 U/mg ile B-2-6-b izolatı göstermiştir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında (Çizelge 4.14) kitosanaz enzim aktivite değerleri düşük olmasına rağmen spesifik kitosanaz enzim aktivitesi için benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

Çizelge 4.14. Literatürde incelenen farklı *Bacillus* türlerinin kitosanaz aktiviteleri.

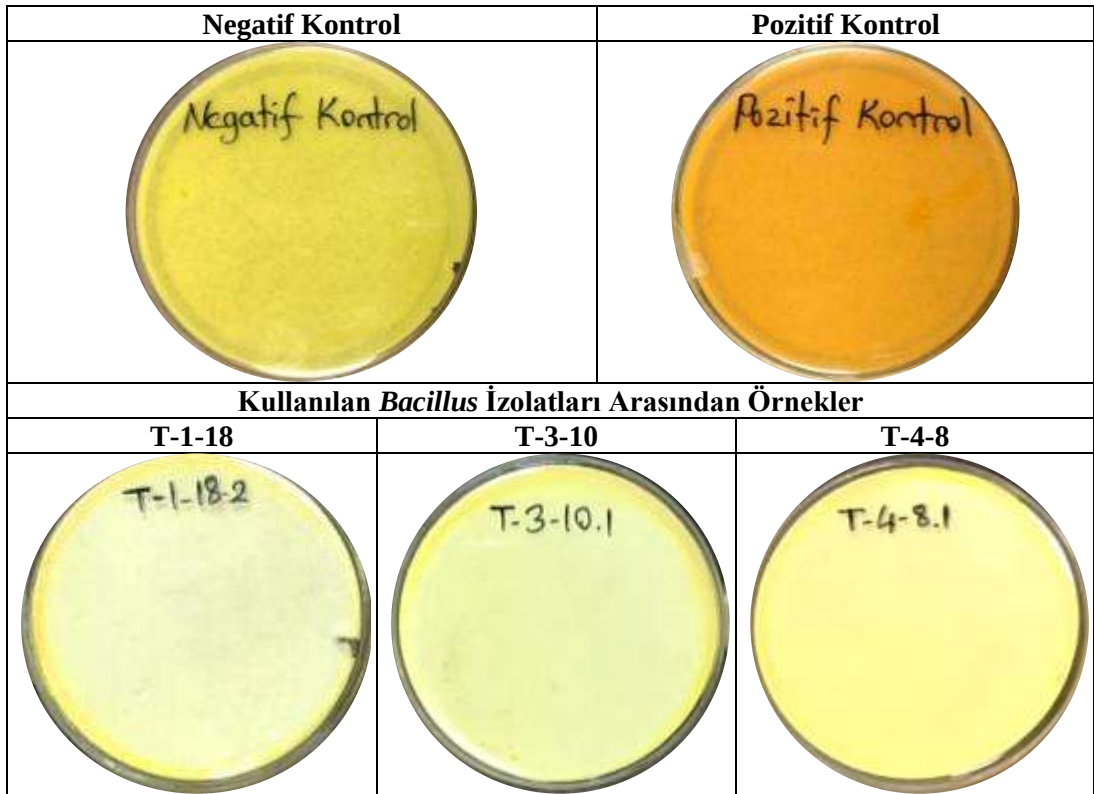
<i>Bacillus</i> türleri	Kitosanaz aktivitesi	Aktivite Yöntemi	Referans
<i>B.cereus</i>	53 U/mg	DNS yöntemi (40°C)	Kurakake et al., 2000
<i>Bacillus</i> sp. S65	8 U/mg	DNS yöntemi (37°C)	Su et al., 2006
<i>B.cereus</i> D-11	4,85 U/ml	DNS yöntemi (37°C)	Gao et al., 2008
<i>B.subtilis</i> RKY3	5,63 U/ml	DNS yöntemi (60°C)	Wee et al., 2009
<i>B.thuringiensis</i> JAM-GG01	17,1 U/mg	DNS yöntemi (50°C)	Kobayashi et al., 2011
<i>Bacillus</i> spp.	2,41-6,36 U/ml; 2,46-8,52 U/mg	DNS yöntemi (50°C)	Liaqat, 2018
<i>B.thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	5,1 U/ml	DNS yöntemi (60°C)	Santos-Moriano et al., 2018
<i>Bacillus</i> sp. Q1098	4,85 U/ml	DNS yöntemi (60°C)	Ma et al., 2020
<i>B.cereus</i> TCCC 10028	3,81 U/ml	DNS yöntemi (50°C)	Zhang et al., 2021
<i>Bacillus</i> spp.	0,251-0,55 U/ml; 8,02-22,17 U/mg	DNS yöntemi (50°C)	Bu çalışmada (Çizelge 4.13)

4.4. *Bacillus* İzolatlarının HCN Üretiminin Belirlenmesi

Hidrojen siyanür (HCN) üretimi, hastalıklarla mücadelede önemli bir rol oynayan PGPR'nin bir diğer özelliğidir. Konakçı bitki genellikle bakteriler tarafından üretilen HCN'den etkilenmez. Fitopatojenik funguslardan korunmak için metabolik bir inhibitör görevi gören siyanür, biyolojik bir kontrol ajanı olarak çalışabilmektedir. HCN üreten PGPR, bitki patojenlerini baskılamakta ve hastalığın şiddetini azaltmaktadır. Ayrıca sekestrasyon ve metal şelasyonu yoluyla dolaylı olarak fosfor kullanılabilirliğini arttırmaktadır (Kalam et al., 2020; Agha et al., 2022). Agha et al., (2022) tarafından incelenen tüm izolatlar (*B.velezensis* BA, *B.amyloliquefaciens* GL-1, *B.subtilis* 5a) HCN üretimi bakımından pozitif olarak belirlenmiştir (Agha et al., 2022). *Bacillus* izolatları ile yapılan bir diğer çalışmada kullanılan 8 adet *Bacillus* izolatından bir tanesinde HCN üretimi gözlenmemiştir. 3 izolat 1.derece, 1 izolat 2.derece ve 3 izolat da 3.derecede HCN üreticisi olarak belirlenmiştir (Ghodsavali et al., 2013). Bir başka çalışmada ise kullanılan *Bacillus* izolatlarının %50'sinin HCN üreticisi oldukları belirlenmiştir (Ahmad et al., 2008). Kalam et al., (2020) tarafından yapılan çalışmada incelenen yedi *Bacillus* izolatının tamamının HCN ürettiği belirlenmiştir. İçlerinden TRS-

2 ve TRS-7 ise daha fazla HCN üretmiştir. Antil et al. (2020), tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise *Bacillus cereus* KMT-5, filtre kağıdı şeritlerini dört günlük inkübasyondan sonra sarıdan kahverengiye döndürerek orta düzeyde HCN üretimi gösterirken, *B. megaterium* KMT-8, tüpün içine sabitlenmiş filtre kağıdı şeritlerini sarıdan açık kahverengiye döndürerek düşük siyanojenik potansiyel göstermiştir. HCN, tüm aerobik organizmaların sitokrom oksidaz yolunu bloke etmektedir ve bu da KMT-5 ve KMT-8 tarafından gösterilen antagonistik davranışın bir nedeni olarak gösterilmiştir.

Çalışmamızda HCN üretiminin belirlenmesi amacıyla Kısım 3.1.2.1’de içeriği belirtilen besiyerine her bir izolatın çizgi ekim yapılmıştır. Çalışmada kullanılan *Bacillus* izolatları arasında T-1-18, T-3-10, T-4-8, T-4-15, Ç-3-22-b, Ö-2-44-b, Ö-2-61-c, T-3-12-b, 3-K-25, 3-K-S-17-a ve 3-K-S-47-a kodlu izolatlar filtre rengini sarıdan kreme çevirmişlerdir ve belirlenen skalaya göre sadece bu 11 adet (%14,28) *Bacillus* izolatının 1.derecede HCN ürettikleri belirlenmiştir. Yapılan deneme sonrasında elde edilen renk değişimlerini gösteren *Bacillus* izolatlarına ait örnek bazı petri fotoğrafları ile hiçbir bakteri içermeyen negatif kontrol ve HCN üreticisi olduğu bilinen *Pseudomonas spp.* inoküle edilmiş olan besiyerinde kahverengi renk oluşumu gözlemlenen pozitif kontrol fotoğrafları Şekil 4.15’te gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Bazı *Bacillus* izolatları tarafından HCN üretimine ait örnek görseller.

4.5. *Bacillus* İzolatlarının Siderofor Üretiminin Belirlenmesi

Gerçekleştirilen çalışmada siderofor üretiminin belirlenmesi amacıyla Kısım 3.1.2.1’de içeriği belirtilen CAS Agar besiyerine gerçekleştirilen nokta ekimler sonrası siderofor pozitif olan *Bacillus* izolatlarının oluşturdukları zon çapı ve koloni çapı ölçülerek *Bacillus* izolatları arasında karşılaştırma yapılması amacıyla hesaplanan siderofor indeks değerleri Çizelge 4.15’te gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan 77 adet *Bacillus* izolatı arasından 70 adet (%90,9) izolatta siderofor üretimi olduğu belirlenmiştir. Ancak, 7 tane izolatta (T-1-18, T-1-18-a, T-3-10, T-4-17, Ç-2-30-a, Ç-2-30-b, B-2-24-a-b) siderofor üretimi belirlenememiştir.

Çizelge 4.15. *Bacillus* izolatlarının siderofor indeks değerleri.

<i>Bacillus</i> izolatları	Siderofor zon çapı (cm)	Koloni çapı (cm)	Siderofor indeks değeri
T-2-2	0,87±0,15	0,57±0,15	1,56±0,17
T-2-16	0,77±0,25	0,43±0,15	1,78±0,19
T-4-8	1,0±0,1	0,6±0,1	1,68±0,11
T-4-9	0,77±0,15	0,53±0,15	1,46±0,16
T-4-13-a	0,73±0,15	0,5±0,1	1,48±0,27
T-4-14-a	0,7±0	0,4±0	1,75±0
T-4-14-b	0,9±0,1	0,57±0,06	1,59±0,08
T-4-15	0,43±0,06	0,33±0,06	1,30±0,05
T-4-19	0,83±0,06	0,43±0,06	1,93±0,11
T-11-8	0,57±0,06	0,33±0,06	1,72±0,25
Ç-2-36	0,73±0,25	0,47±0,15	1,58±0,15
Ç-3-10	0,73±0,15	0,5±0,1	1,47±0,06
Ç-3-15-a	0,5±0	0,33±0,06	1,53±0,24
Ç-3-19	0,5±0	0,37±0,06	1,39±0,24
Ç-3-22-a	0,73±0,4	0,5±0,17	1,40±0,27
Ç-3-22-b	0,5±0	0,33±0,06	1,53±0,24
Ç-3-23	0,47±0,06	0,33±0,06	1,42±0,22
Ç-3-31	0,53±0,06	0,4±0	1,33±0,14
Ö-1-31-b	0,93±0,3	0,57±0,15	1,63±0,11
Ö-1-57-b	0,73±0,06	0,6±0,1	1,24±0,14
Ö-1-59-b	1,27±0,06	0,57±0,06	2,25±0,31
Ö-1-85	0,93±0,3	0,7±0,17	1,32±0,1

Çizelge 4.15. (devam)

<i>Bacillus</i> izolatları	Siderofor zon çapı (cm)	Koloni çapı (cm)	Siderofor indeks değeri
Ö-2-38	0,7±0,1	0,37±0,06	1,92±0,14
Ö-2-44-b	0,63±0,15	0,47±0,11	1,36±0,13
Ö-2-61-a	1,13±0,11	0,77±0,15	1,5±0,17
Ö-2-61-c	0,63±0,32	0,47±0,2	1,34±0,09
Ö-3-5-b	1,07±0,11	0,43±0,06	2,5±0,5
Ö-3-21	0,8±0,1	0,5±0,1	1,62±0,12
Ö-3-30	1,37±0,06	0,67±0,06	2,05±0,1
Ö-4-11-a	0,5±0	0,27±0,06	1,94±0,48
Ö-4-13-a	0,57±0,06	0,47±0,06	1,22±0,03
Ö-4-57-a	0,9±0,45	0,53±0,2	1,62±0,26
Ö-4-68	1,0±0,3	0,65±0,21	1,55±0,07
Ö-4-82	0,5±0	0,33±0,06	1,53±0,24
Ö-5-1	0,9±0,35	0,47±0,06	1,88±0,55
B-2-6-b	0,6±0,1	0,4±0	1,5±0,25
K-6-22	1,0±0,1	0,6±0,1	1,68±0,11
K-9-37-a	0,67±0,11	0,43±0,06	1,53±0,06
4-Ka-22	1,0±0,1	0,6±0,1	1,68±0,11
4-Ka-58-1	0,53±0,06	0,4±0	1,33±0,14
A-1	0,93±0,15	0,57±0,11	1,66±0,12
Ö-2-55-a	1,0±0	0,77±0,06	1,31±0,1
Ö-4-57-b	0,57±0,06	0,37±0,06	1,55±0,1
T-3-12-a	0,83±0,06	0,63±0,06	1,32±0,03
T-3-12-b	0,87±0,11	0,63±0,11	1,39±0,23
T-4-20-e-a	1,1±0,1	0,57±0,06	1,94±0,1
Ç-3-20-a	1,3±0	0,6±0	2,17±0
K-7-14-1	1,1±0,1	0,73±0,06	1,5±0,07
1-K-49-a	0,5±0	0,33±0,06	1,53±0,24
2-K-5	1,3±0	0,6±0	2,17±0
2-K-13-a	1,0±0	0,63±0,06	1,59±0,14
2-K-29	0,53±0,06	0,4±0	1,33±0,14
2-K-35-a	1,53±0,15	0,5±0,1	3,11±0,35
2-K-37	1,37±0,06	0,57±0,06	2,42±0,15
3-K-10	0,87±0,23	0,6±0,17	1,45±0,04

Çizelge 4.15. (devam)

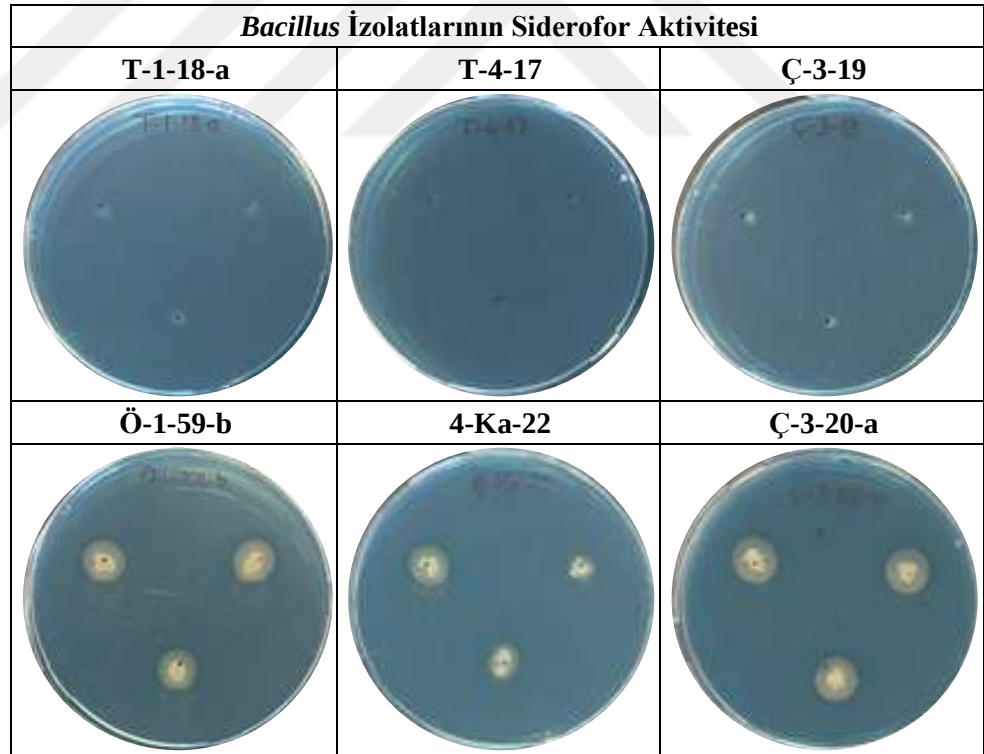
Bacillus izolatları	Siderofor zon çapı (cm)	Koloni çapı (cm)	Siderofor indeks değeri
3-K-25	1,4±0,1	0,67±0,06	2,10±0,09
4-Ka-59-a-a	0,6±0,17	0,43±0,06	1,37±0,2
3-K-S-1-a	0,93±0,06	0,5±0,1	1,90±0,3
3-K-S-14	1,03±0,06	0,63±0,06	1,64±0,2
3-K-S-17-a	1,07±0,06	0,6±0,1	1,80±0,21
3-K-S-37	0,87±0,2	0,53±0,15	1,64±0,09
3-K-S-39-a	0,47±0,06	0,27±0,06	1,83±0,6
3-K-S-47-a	1,0±0	0,73±0,06	1,37±0,1
3-K-S-49	1,23±0,2	0,63±0,11	1,95±0,08
3-K-S-60-a	1,23±0,06	0,6±0	2,05±0,09
3-K-S-61	1,13±0,06	0,63±0,06	1,79±0,07
3-K-S-64	1,2±0	0,57±0,06	2,13±0,23
K-6-13-b-a	1,1±0	0,6±0	1,83±0
Ö-6-50-a	1,47±0,06	0,57±0,06	2,61±0,35
Ç-1-16-a	1,53±0,06	0,63±0,06	2,43±0,12

Marquez et al. (2020), beş farklı *Bacillus* suşunu kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada *B.megaterium*, *B.pumilus*, *B.clausii* ve *B.licheniformis* suşlarının siderofor ürettiğini, *B.megaterium* suşunun ise siderofor üretmediğini belirlemişlerdir. Siderofor üreticisi bakterilerin seçilmesi için yapılan bir başka çalışmada ise izole edilen 33 bakteri izolatından 17 tanesinin siderofor üreticisi olduğu belirlenmiştir. Bunlar arasından ise, en yüksek siderofor üreticisi olarak *B.licheniformis* SID 13, *B.subtilis* SID 25 ve *B.licheniformis* SID 30 suşları belirlenmiştir (VS et al., 2022). Antil et al. (2021), *Bacillus aryabhatai* KMT-4 suşunun siderofor aktivitesini incelemişlerdir ve bu suşun koloni etrafında 3 mm'lik bir zon oluşturduğunu belirlemişlerdir. Çöplük toprağının incelendiği bir başka çalışmada ise bu topraktan alınan örnekten izole edilen 55 adet bakteriden dört tanesi siderofor üreticisi olarak bulunmuştur. Bunlardan üç tanesinin *Pseudomonas* türüne ait olduğu belirlenirken bir tanesinin ise *Bacillus* türüne ait olduğu belirlenmiştir. Bu dört tür arasında maksimum zon oluşturduğu belirlenen *Bacillus sp.* DY izolatı ile 1,5 cm zon çapı elde edilmiştir (Krishna et al., 2020). Çalışmamızda incelenen *Bacillus* izolatları ile elde edilen siderofor zon çapları 0,43-1,53 cm arasında değişmektedir. Literatürde farklı çalışmalarda belirlenen siderofor indeks değerleri Çizelge 4.16'da verilmiştir.

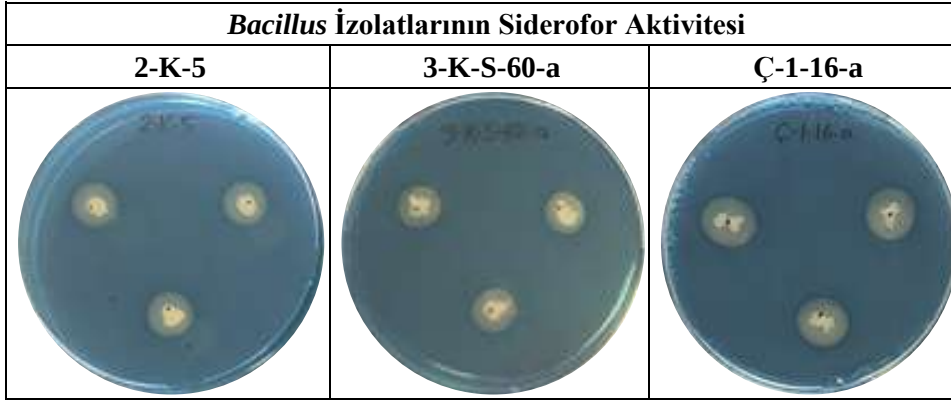
Çizelge 4.16. *Bacillus* türleri ile literatürde elde edilen siderofor üretim indeks değerleri.

<i>Bacillus</i> türleri	Siderofor üretim indeks değeri	Referans
<i>Bacillus spp.</i>	1,1-3,85	Kumari et al., 2019
<i>B.pumilus</i>	2,2	
<i>B.megaterium</i>	2,0	Chandra et al., 2021
<i>B.simplex</i>	3,0	
<i>Bacillus sp.</i> 13B41	1,88	
<i>Bacillus sp.</i> P41B2	1,37	Amezquita-Aviles et al., 2022
<i>B.paramycoides</i> DT-85	2,68	
<i>B.paranthracis</i> DT-97	2,93	Yadav et al., 2022
<i>Bacillus spp.</i>	1,22-3,11	Bu çalışmada (Çizelge 4.15)

Bacillus izolatları ile elde edilen bazı negatif ve pozitif siderofor aktivitesi sonuçlarına ait örnekler Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



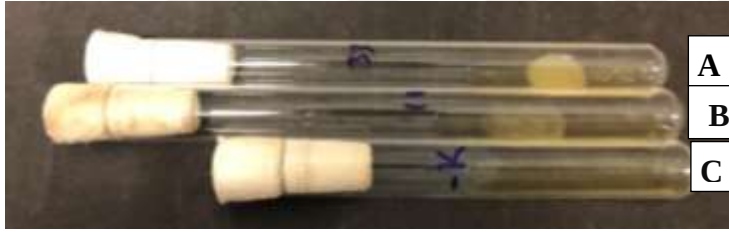
Şekil 4.16. Bazı *Bacillus* izolatları tarafından siderofor üretimi.



Şekil 4.16. (devam)

4.6. *Bacillus* İzolatlarının Patojenitesinin İncelenmesi

Tez çalışmasında koagülaz aktivitesi incelenen 77 adet *Bacillus* izolatı arasından 2 adet (%2,6) izolatta tüplerde pıhtı oluşumu sonucu koagülaz aktivitesi belirlenmiştir. T-4-14-b izolatında 1.derecede, Ö-2-61-a izolatında ise 2.derecede pıhtılaşma görülmüştür. Oluşan pıhtı görüntüleri Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Koagülaz pozitif izolatlarda oluşan pıhtı görüntüleri (A: Ö-2-61-a, B: T-4-14-b, C: Negatif Kontrol).

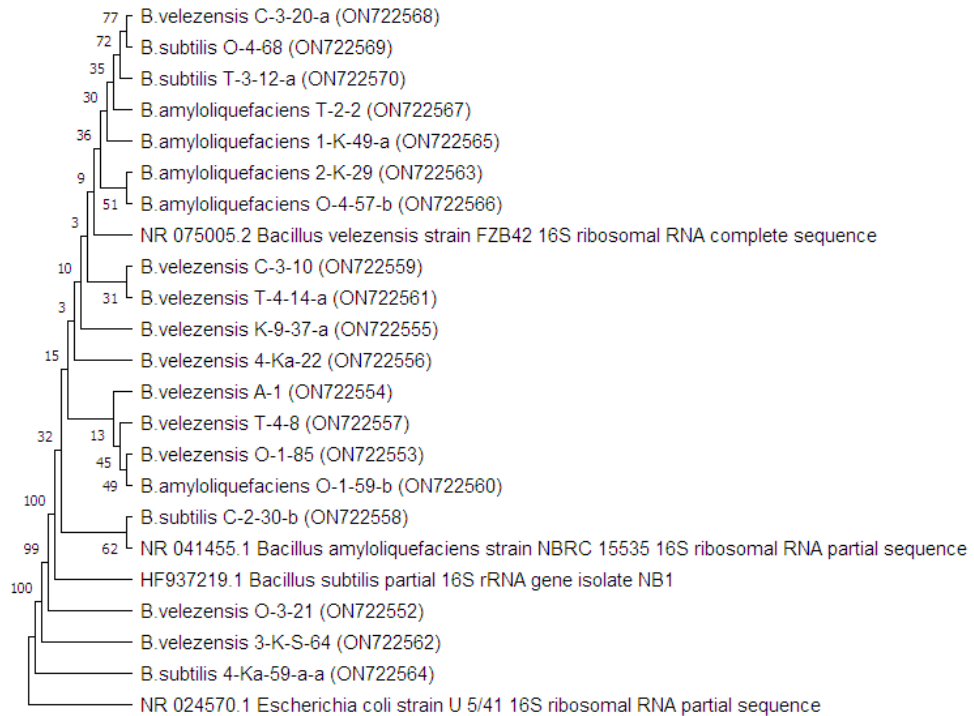
Öztopuz et al. (2018) tarafından gerçekleştirilen çalışmada incelenen 92 adet *Bacillus* izolatı arasından fitopatojenik funguslara karşı antagonistik etki gösterdiği belirlenen 6 adet izolat seçilmiştir. Bu izolatların patojenitesini belirlemek amacıyla koagülaz üretimleri incelenmiştir ve tüm izolatların koagülaz negatif olduğu belirlenmiştir. Bir başka çalışmada ise incelenen 53 adet *Bacillus megaterium* suşunun %74’ünde pıhtı oluşumu sonucu koagülaz aktivitesi gözlenmiştir (Lopez and Alippi, 2009).

4.7. *Bacillus* İzolatlarının Moleküler Tanımlaması

NCBI’deki eşleşmeler göz önüne alındığında dizi eşleşme oranı ve benzerlik oranı aynı olan bazı izolatlar için *B.velezensis*, *B.amyloliquefaciens*, *B.subtilis*, *B.siamensis* ve *B.methylotrophicus* gibi farklı türlerin kayıtlı olduğu görülmüştür. Çoğaltılan gen bölgesinin bu türler için ayırt edici bir bölge olmamasından kaynaklanan bu durumda polifazik tanımlama yöntemleri kullanılmıştır. Literatür

incelendiğinde yukarıda belirtilen bu türler arasında Tween 20 ve Tween 80'i hidrolize etme ve sitratı kullanma yetenekleri bakımından farklar olduğu görülmüştür. Bu nedenle moleküler tür tayini yapılan izolatlar için Tween 20 ve Tween 80'i hidrolize etme ve sitratı kullanma yetenekleri petri denemeleri ile incelenmiştir. Ancak, Tween 20 ve Tween 80 denemesi ile tutarlı sonuçlar alınamadığı için bu sonuçlar değerlendirmeye alınmamıştır. Sitrat testinde renk değişimi sonucu mavi olan petriler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir ve bu türlerin *B.velezensis*, *B.subtilis*, *B.methylophilus*, *B.amyloliquefaciens*, *B.vallismortis* ve *B.nakamurai* türlerinden biri olabileceği bilinmektedir. Ayrıca, negatif sonuç alınan izolatların ise *B.velezensis*, *B.subtilis*, *B.methylophilus* ve *B.siamensis* türlerinden biri olabileceği saptanmıştır. Sonuç olarak suştan suşa sitrat kullanımlarının da değiştiği görülmüştür (Wu and Ahn, 2011; Seenivasan et al., 2012; Kumar et al., 2015; Ge et al., 2016; Rajashekhar et al., 2017; Yuan et al., 2019; Akarapisan et al., 2020; Ngalimat et al., 2021).

Moleküler tanımlaması yapılan izolatlar için belirlenen tür isimleri ve GenBank aksesyon numaraları Çizelge 4.17'de gösterilmiştir. *Bacillus* izolatları için 16S rRNA sekansları kullanılarak Komşu Birleştirme (Neighbor Joining) Metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç ise Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Filogenetik ağaç oluşturulurken dış grup olarak *Escherichia coli* U 5/41 (NR 024570.1) kullanılmıştır.



Şekil 4.18. Moleküler tanımlaması yapılan *Bacillus* suşları için filogenetik ağaç.

Çizelge 4.17. Moleküler tanılaması yapılan *Bacillus* izolatlarının tür isimleri ve GenBank aksesyon numaraları.

<i>Bacillus</i> İzolatlarının Kodları	Toplam Baz Sayısı	Dizi Eşleşme Oranı	Benzerlik Oranı	Sitrat Testi	Tür İsmi	Aksesyon Numaraları
Ö-3-21	1131	100	99,91	-	<i>B.velezensis</i>	ON722552
Ö-1-85	1397	100	100	-	<i>B.velezensis</i>	ON722553
A-1	1381	100	99,93	-	<i>B.velezensis</i>	ON722554
K-9-37-a	1406	100	99,86	-	<i>B.velezensis</i>	ON722555
4-Ka-22	1398	100	100	-	<i>B.velezensis</i>	ON722556
T-4-8	1399	100	100	-	<i>B.velezensis</i>	ON722557
Ç-2-30-b	1410	100	99,93	-	<i>B.subtilis</i>	ON722558
Ç-3-10	1408	100	99,93	-	<i>B.velezensis</i>	ON722559
Ö-1-59-b	1399	100	100	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>	ON722560
T-4-14-a	1415	100	99,51	-	<i>B.velezensis</i>	ON722561
3-K-S-64	926	100	98,70	+	<i>B.velezensis</i>	ON722562
2-K-29	1384	100	99,71	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>	ON722563
4-Ka-59-a-a	736	100	98,23	-	<i>B.subtilis</i>	ON722564
1-K-49-a	1375	100	99,85	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>	ON722565
Ö-4-57-b	1357	100	99,85	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>	ON722566
T-2-2	1358	100	99,78	+	<i>B.amyloliquefaciens</i>	ON722567
Ç-3-20-a	1395	100	99,71	+	<i>B.velezensis</i>	ON722568
Ö-4-68	1395	100	99,64	+	<i>B.subtilis</i>	ON722569
T-3-12-a	1395	100	99,71	-	<i>B.subtilis</i>	ON722570

4.8. Seçilen *Bacillus* İzolatlarının Biyokütle Üretiminin İncelenmesi

Yüksek antifungal etki gösteren ve lipopeptid üretim miktarı fazla olan beş farklı *Bacillus* türü kullanılarak LB ortamında gerçekleştirilen inkübasyon sonucu dökme plaka yöntemi ile canlı hücre sayımı yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar kob/ml cinsinden Çizelge 4.18’de gösterilmiştir. İncelenen *Bacillus* türlerinin logaritmik olarak aynı miktarda canlı hücre sayısına ulaştığı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0,05$) olmadığı belirlenmiştir. Biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılacak izolatların güçlü antifungal etki göstermelerine sebep olan en önemli mekanizmalarından biri antifungal lipopeptidlerin üretimidir. Bu nedenle üretim optimizasyonu yapılacak türün seçiminde, öncelikli olarak lipopeptid antibiyotik miktarının yüksek olmasına öncelik verilmiştir.

Çizelge 4.18. *Bacillus* türleri ile LB besiyerinde, 30°C ve 150 rpm koşullarında 5 gün süreyle gerçekleştirilen inkübasyon sonucu elde edilen canlı hücre sayım sonuçları.

<i>Bacillus</i> İzolatlarının Kodları	Tür İsmi	Canlı Hücre Sayısı $\pm$ SS* ($\times 10^8$ kob/ml)
K-9-37-a	<i>B.velezensis</i>	3,71 $\pm$ 1,45 ^a
3-K-S-64	<i>B.velezensis</i>	3,37 $\pm$ 2,23 ^a
4-Ka-22	<i>B.velezensis</i>	2,44$\pm$0,62^a
4-Ka-59-a-a	<i>B.subtilis</i>	4,04 $\pm$ 0,88 ^a
Ç-2-30-b	<i>B.subtilis</i>	1,66 $\pm$ 0,56 ^a

Aynı harfle gösterilen sütun içindeki ortalamalar, Tukey Testine göre önemli ölçüde farklı değildir ($p<0,05$).

*SS: Standart sapma

Tez çalışması kapsamında antifungal etki mekanizmalarına göre incelenen 69 adet *Bacillus* izolatı arasından Çizelge 4.19’da verilen özelliklere göre Q-TOF ile kantitatif olarak belirlenen sürfaktin ve iturin A üretimi en yüksek olan ***B.velezensis* 4-Ka-22** suşu ile üretim optimizasyonu yapılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.19. Çalışmada antifungal etki mekanizmaları incelenen *Bacillus* izolatlarının belirlenen özellikleri.

Bacillus İzolatları		Yüzde Büyüme İnhibisyon Değerleri						Hemolitik Aktivite (cm)	Lipopeptid Miktarları (mg/lt)		Spesifik Enzim Aktiviteleri (U/mg)			HCN Üretimi	Siderofor İndeks Değeri
		İkili Kültür Testi			Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi				İturin A	Sürfaktin	Proteaz	Kitosanaz	Kitinaz		
		Bc*	Fs	Rs	Bc	Fs	Rs								
1	T-1-18	38,7	24,3	45,4	28,7	4,9	27,3	1,6	16,9	7,9	3829,8	11,07	14,0	+	0
2	T-1-18-a	41,7	36,0	50,5	28,7	4,6	28,3	1,6	17,3	6,6	4226,1	10,56	10,83	-	0
3	T-2-2	43,7	33,5	49,7	28,7	2,5	28,8	1,9	31,1	12,8	1304,3	11,72	14,33	-	0
4	T-2-16	44,2	34,0	49,8	32,2	3,7	28,3	2,0	31,0	12,5	2840,9	11,84	12,94	-	0
5	T-3-10	46,4	31,3	44,5	36,8	13,0	25,7	1,4	0	13,9	2941,3	8,66	15,71	+	1,5
6	T-4-8	45,6	32,2	50,5	39,1	16,0	29,3	1,8	32,3	12,3	2326,1	9,16	17,91	+	0
7	T-4-9	45,6	35,0	48,5	32,7	13,0	29,3	2,0	28,8	12,4	2931,8	8,4	17,24	-	0
8	T-4-13-a	45,4	38,0	53,1	37,9	12,3	26,5	1,9	25,5	14,0	2190,6	0	18,8	-	1,57
9	T-4-14-a	40	34,5	53,8	41,4	8,6	28,8	1,7	45,4	12,9	2093,0	0	15,86	-	0

* Bc: *Botrytis cinerea*, Fs: *Fusarium solani*, Rs: *Rhizoctonia solani*, ** +: HCN üretimi var; -: HCN üretimi yok.

Çizelge 4.19. (devam)

Bacillus İzolatları		Yüzde Büyüme İnhibisyon Değerleri						Hemolitik Aktivite (cm)	Antifungal Lipopeptid Miktarları (mg/lt)		Spesifik Enzim Aktiviteleri (U/mg)			HCN Üretimi	Siderofor İndeks Değerleri
		İkili Kültür Testi			Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi				İturin A	Sürfaktin	Proteaz	Kitosanaz	Kitinaz		
		Bc*	Fs	Rs	Bc	Fs	Rs								
10	T-4-14-b	44,6	41,2	55,7	41,4	12,3	32,3	2,0	30,7	10,9	953,1	8,54	15,0	-**	1,3
11	T-4-15	48,5	38,0	51,4	26,4	12,3	31,3	2,1	27,7	14,3	2482,1	8,6	17,6	+	0
12	T-4-17	35,2	24,3	39,5	24,1	11,1	21,2	1,2	0	10,2	9,7	8,03	18,33	-	1,46
13	T-4-19	40,0	21,3	40,3	28,7	11,1	24,2	1,3	0	3,1	204,5	8,5	11,2	-	0
14	T-11-8	46,9	31,5	49,8	20,7	12,3	27,3	1,5	23,5	11,8	700,0	0	14,28	-	0
15	Ç-2-30-a	41,0	42,2	53,1	20,7	11,1	29,8	0,9	18,4	7,1	3815,8	9,88	12,17	-	0
16	Ç-2-30-b	45,2	30,3	49,1	24,1	13,6	29,3	1,3	29,0	10,9	5703,8	11,39	10,0	-	0
17	Ç-2-36	36,4	22,8	42,3	20,7	12,3	28,8	1,3	0	12,5	963,0	0	15,2	-	0
18	Ç-3-10	45,4	33,5	48,1	25,3	8,6	32,3	1,8	33,5	12,8	2882,3	9,76	15,45	-	0
19	Ç-3-15-a	43,3	36,7	48,1	21,8	11,1	37,9	1,2	38,2	10,2	3355,8	11,91	0,77	-	0

* Bc: *Botrytis cinerea*, Fs: *Fusarium solani*, Rs: *Rhizoctonia solani*, ** +: HCN üretimi var; -: HCN üretimi yok.

Çizelge 4.19. (devam)

Bacillus İzolatları		Yüzde Büyüme İnhibisyon Değerleri						Hemolitik Aktivite (cm)	Antifungal Lipopeptid Miktarları (mg/lt)		Spesifik Enzim Aktiviteleri (U/mg)			HCN Üretimi	Siderofor İndeks Değerleri
		İkili Kültür Testi			Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi				İturin A	Sürfaktin	Proteaz	Kitosanaz	Kitinaz		
		Bc*	Fs	Rs	Bc	Fs	Rs								
20	Ç-3-19	50,4	35,2	53,8	24,1	7,4	33,8	1,3	0	13,0	2836,6	11,43	1,0	- **	0
21	Ç-3-22-a	45,4	41,2	49,7	35,9	32,1	30,2	1,3	29,4	12,8	1485,7	8,45	0	-	1,71
22	Ç-3-23	49,2	36,7	50,0	38,2	32,4	30,5	1,3	22,1	23	6652,0	0	0	-	0
23	Ç-3-31	42,1	28,5	47,7	34,2	29,2	26,6	1,6	5,9	35,4	3194,4	12,38	1,43	-	0
24	Ö-1-31-b	46,9	23,1	46,1	34,2	25,4	25,5	1,6	27,4	26,5	4320,0	10,45	0	-	0
25	Ö-1-57-b	45,8	25,5	33,8	32,5	29,2	25,0	1,4	0,1	34,0	1710,5	8,66	0,41	-	0
26	Ö-1-59-b	50,0	31,8	51,5	32,5	25,4	22,9	1,6	32,7	29,0	6154,5	11,08	1,0	-	0
27	Ö-1-85	44,8	29,3	48,3	34,2	29,9	27,1	1,2	32,0	38,2	4056,5	11,16	0,71	-	0
28	Ö-2-44-b	43,7	35,5	48,3	29,7	24,8	26,6	1,9	15,5	29,4	4379,3	10,83	0,48	+	1,41
29	Ö-2-61-a	45,8	25,5	48,5	30,9	21,6	25,0	1,7	29,6	25,4	4253,6	10,72	0,27	-	0

* Bc: *Botrytis cinerea*, Fs: *Fusarium solani*, Rs: *Rhizoctonia solani*, ** +: HCN üretimi var; -: HCN üretimi yok.

Çizelge 4.19. (devam)

Bacillus İzolatları		Yüzde Büyüme İnhibisyon Değerleri						Hemolitik Aktivite (cm)	Antifungal Lipopeptid Miktarları (mg/lt)		Spesifik Enzim Aktiviteleri (U/mg)			HCN Üretimi	Siderofor İndeks Değerleri
		İkili Kültür Testi			Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi				İturin A	Sürfaktin	Proteaz	Kitosanaz	Kitinaz		
		Bc*	Fs	Rs	Bc	Fs	Rs								
30	Ö-3-5-b	45,8	23,1	47,7	34,2	25,4	31,8	1,2	0	28,3	5155,2	0	0	-**	0
31	Ö-3-21	41,7	35,5	51,5	35,3	18,4	26,6	1,6	33,3	35,0	2522,6	0	0,5	-	0
32	Ö-4-11-a	46,9	28,0	52,3	39,3	27,3	25,0	1,4	0	41,0	5290,5	0	0	-	1,58
33	Ö-4-13-a	45,8	25,5	48,5	38,2	29,2	30,2	1,4	0	39,8	3202,2	0	1,81	-	1,83
34	Ö-4-68	46,9	31,8	48,3	31,4	20,6	33,8	1,5	28,0	31,2	3811,9	0	2,17	-	0
35	Ö-4-82	43,7	21,8	50	34,2	23,5	25,0	1,8	0	25,5	3280,0	0	1,38	-	2,0
36	Ö-5-1	41,7	35,5	53,1	25,8	24,1	25,0	1,5	20,5	33,0	2963,6	13,0	1,67	-	1,72
37	K-6-22	45,6	31,8	49,8	31,4	22,2	26,6	1,7	13,4	28,3	3250,0	0	1,36	-	1,3
38	K-9-37-a	42,3	35,2	48,8	34,2	23,5	29,7	2,1	32,7	40,1	4176,5	0	1,15	-	1,35
39	4-Ka-22	50,4	32,5	48,8	33,1	24,1	25,0	1,8	31,9	41,9	3622,2	0	1,0	-	1,43

* Bc: *Botrytis cinerea*, Fs: *Fusarium solani*, Rs: *Rhizoctonia solani*, ** +: HCN üretimi var; -: HCN üretimi yok.

Çizelge 4.19. (devam)

Bacillus İzolatları		Yüzde Büyüme İnhibisyon Değerleri						Hemolitik Aktivite (cm)	Antifungal Lipopeptid Miktarları (mg/lt)		Spesifik Enzim Aktiviteleri (U/mg)			HCN Üretimi	Siderofor İndeks Değerleri
		İkili Kültür Testi			Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi				İturin A	Sürfaktin	Proteaz	Kitosanaz	Kitinaz		
		Bc*	Fs	Rs	Bc	Fs	Rs								
40	A-1	46,4	28,5	49,1	32,5	20,3	26,6	2,0	32,5	35,6	3000,0	10,19	0,45	-**	1,41
41	Ö-2-55-a	39,6	29,8	48,1	33,9	12,8	24,4	1,3	16,0	7,0	2424,4	10,64	8,77	-	1,75
42	Ö-4-57-b	40,6	35,1	48,1	48,4	25,6	29,4	1,4	11,5	10,8	2742,5	12,40	6,39	-	1,77
43	T-3-12-a	62,5	35,1	48,6	34,9	28,8	25,5	1,4	11,3	6,6	2940,3	14,33	4,99	-	1,24
44	T-3-12-b	43,7	32,4	48,1	47,4	28,2	26,7	1,6	19,6	10,4	2879,3	11,59	1,82	-	1,27
45	T-4-20-e-a	48,9	24,6	47,2	42,9	28,8	29,4	1,4	13,1	0	2511,0	9,43	1,10	-	2,30
46	Ç-3-20-a	63,5	31,6	48,6	45,9	28,2	28,9	1,3	15,6	11,0	1477,8	18,77	0	-	0
47	K-7-14-1	37,5	23,7	47,2	41,4	30,8	29,4	1,3	13,7	6,6	2339,9	11,86	0	-	1,49
48	1-K-49-a	43,7	31,6	50,6	45,9	34,6	29,4	1,4	13,9	10,6	3267,7	13,51	0,86	-	0
49	2-K-5	56,2	28,9	50,6	38,4	30,8	20,0	1,3	10,1	7,4	4094,9	14,38	37,30	-	1,46

* Bc: *Botrytis cinerea*, Fs: *Fusarium solani*, Rs: *Rhizoctonia solani*, ** +: HCN üretimi var; -: HCN üretimi yok.

Çizelge 4.19. (devam)

Bacillus İzolatları		Yüzde Büyüme İnhibisyon Değerleri						Hemolitik Aktivite (cm)	Antifungal Lipopeptid Miktarları (mg/lt)		Spesifik Enzim Aktiviteleri (U/mg)			HCN Üretimi	Siderofor İndeks Değerleri
		İkili Kültür Testi			Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi				İturin A	Sürfaktin	Proteaz	Kitosanaz	Kitinaz		
		Bc*	Fs	Rs	Bc	Fs	Rs								
50	2-K-13-a	53,1	24,6	46,2	41,4	30,8	23,9	1,2	14,1	7,1	2374,9	21,27	5,13	-**	1,83
51	2-K-29	43,7	28,9	48,1	51,0	35,2	27,8	1,3	36,2	9,5	2610,2	16,73	15,24	-	2,26
52	2-K-35-a	46,9	34,2	51,1	46,4	30,8	25,0	1,1	27,2	8,8	1836,8	17,28	10,44	+	2,19
53	2-K-37	30,2	26,3	45,7	39,4	31,4	15,0	2,1	9,8	10,2	1222,7	10,12	16,72	-	2,17
54	3-K-10	56,2	22,8	47,1	39,4	25,6	21,1	1,3	20,4	0	2136,8	10,25	10,74	-	1,43
55	3-K-25	42,7	28,9	46,2	35,9	31,4	15,0	2,0	10,1	7,5	1241,8	14,11	10,59	+	1,62
56	4-Ka-59-a-a	37,5	28,1	45,7	45,9	30,8	23,3	1,7	38,1	8,6	2290,7	11,71	3,22	-	0
57	3-K-S-1-a	52,6	29,3	48,1	39,9	32,7	27,2	1,3	11,7	9,0	1949,8	8,33	12,55	-	2,08
58	3-K-S-14	60,0	34,9	49,6	34,4	3,8	10,0	1,3	0	0	2030,9	0	7,74	-	2,0
59	3-K-S-17-a	61,5	31,7	48,1	42,4	25,6	22,2	1,5	16,0	0	2485,4	9,58	4,48	+	1,45

* Bc: *Botrytis cinerea*, Fs: *Fusarium solani*, Rs: *Rhizoctonia solani*, ** +: HCN üretimi var; -: HCN üretimi yok.

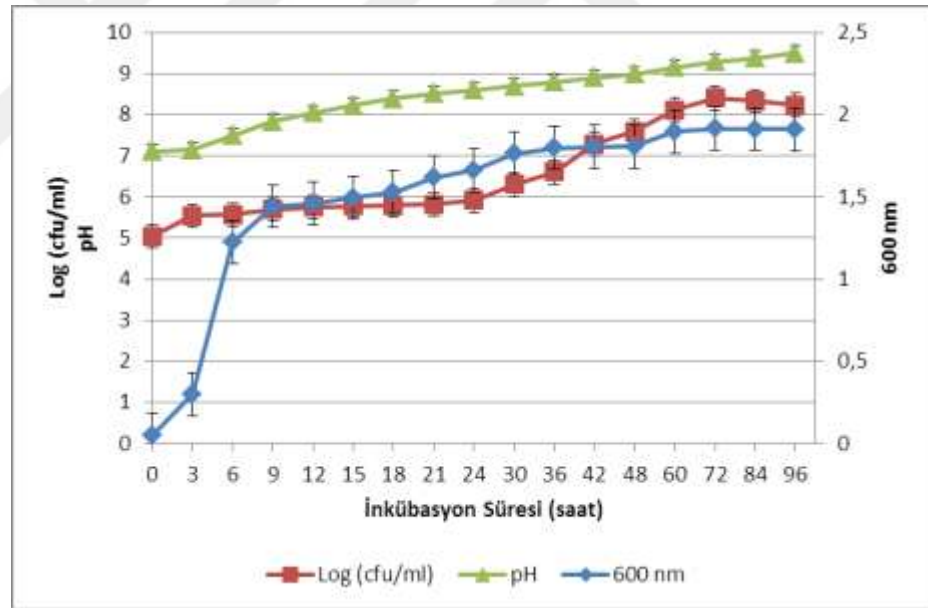
Çizelge 4.19. (devam)

Bacillus İzolatları		Yüzde Büyüme İnhibisyon Değerleri						Hemolitik Aktivite (cm)	Antifungal Lipopeptid Miktarları (mg/lt)		Spesifik Enzim Aktiviteleri (U/mg)			HCN Üretimi	Siderofor İndeks Değerleri
		İkili Kültür Testi			Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi				İturin A	Sürfaktin	Proteaz	Kitosanaz	Kitinaz		
		Bc*	Fs	Rs	Bc	Fs	Rs								
60	3-K-S-37	54,1	34,1	43,2	45,4	33,3	12,2	2,0	13,0	8,9	778,4	0	0	-**	2,43
61	3-K-S-39-a	55,1	33,3	47,6	36,9	29,0	26,6	1,2	10,4	6,9	2499,7	11,71	28,21	-	2,19
62	3-K-S-47-a	61,0	34,1	48,1	39,9	25,8	32,0	1,3	11,5	7,1	1574,8	8,02	11,69	-	1,60
63	3-K-S-49	51,6	30,9	42,2	49,9	35,4	29,3	2,0	9,1	10,6	878,3	9,22	2,32	-	2,08
64	3-K-S-60-a	60,0	35,8	49,1	49,9	25,2	32,6	1,5	16,0	8,3	2764,0	8,22	2,53	-	1,60
65	3-K-S-61	57,5	34,9	47,6	49,9	25,8	28,8	1,3	12,2	7,3	2310,7	9,36	7,28	-	1,91
66	3-K-S-64	58,0	33,3	49,6	60,0	24,6	33,1	1,3	15,8	9,4	2039,5	8,28	12,31	-	1,83
67	K-6-13-b-a	55,5	28,4	47,6	50,4	23,3	34,2	1,3	13,8	7,9	2461,1	0	10,10	-	1,67
68	Ö-6-50-a	58,0	30,9	46,7	47,4	29,6	21,1	1,4	14,8	11,2	2297,3	8,70	7,18	-	2,11
69	Ç-1-16-a	54,1	32,5	46,7	55,4	29,6	22,8	1,3	14,8	9,6	2383,0	8,30	14,01	+	0

* Bc: *Botrytis cinerea*, Fs: *Fusarium solani*, Rs: *Rhizoctonia solani*, ** +: HCN üretimi var; -: HCN üretimi yok.

4.9. *Bacillus velezensis* 4-Ka-22 Suşu için Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

Elde edilen büyüme eğrisi ve antifungal etki (yüzde büyüme inhibisyon değerleri) sonuçları Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de gösterilmiştir. Üretimin başlangıcında pH değeri 7,1 olarak ölçülürken üretim boyunca bu değer artarak pH 9,5’e ulaşmıştır. LB sıvı besiyeri kullanılarak geliştirilen aşı kültüründen üretim için yine LB sıvı besiyerine inokülasyon yapılması sonucu hızlı bir lag fazın ardından 9. saate kadar logaritmik faz görülmüştür ve sonrasında ikinci bir lag faz başlamıştır. Daha sonra ise, 18. saatten sonra canlı hücre sayısında ve OD_{600 nm} değerlerinde 72. saate kadar tekrar bir artış görülmüştür. Bu andan itibaren canlı hücre sayısı düşüşe geçmiştir. Dioksik büyüme görülmesinin sebebi olarak, LB besiyerinde bulunan tripton ve maya ekstraktının sırayla kullanılmasından kaynaklanabileceği gibi suş tarafından üretilen bir metabolitin suşun kendisi tarafından kullanılmasından da kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



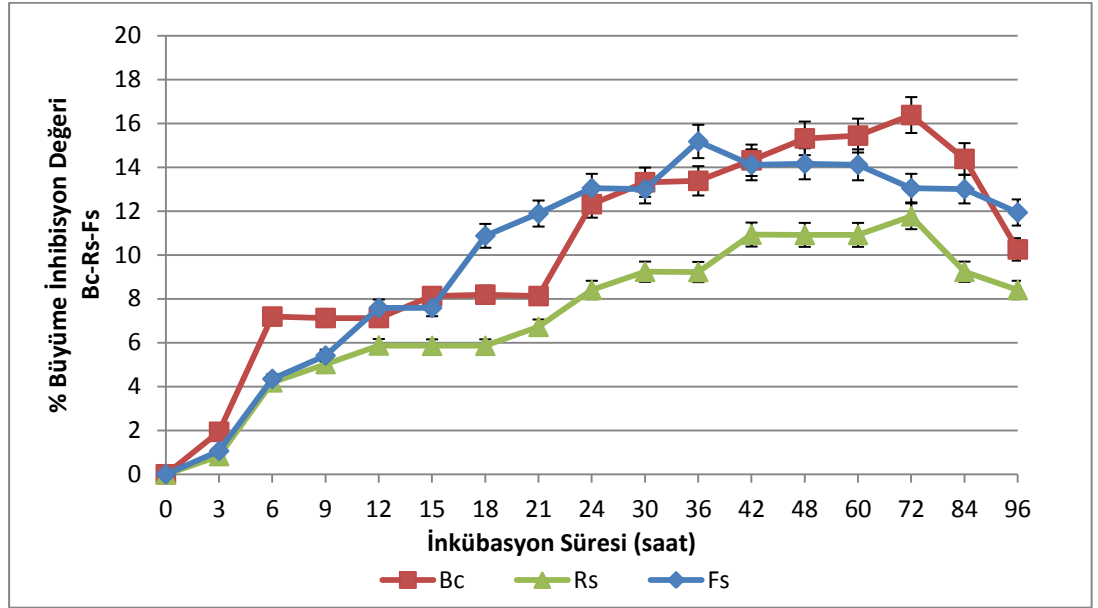
Şekil 4.19. *B.velezensis* 4-Ka-22 suşu için pH değeri, absorbans ve canlı sayım sonuçları.

Biyosüpfaktanların mikroorganizmalar tarafından büyüme döngülerinin farklı aşamalarında üretilmesini açıklayan farklı beslenme ve ekolojik roller öne sürülmüştür. Büyümeyle ilişkili üretim türünde, bu moleküller daha çok birincil metabolit gibi davranmakta ve normal büyüme ve besin alımı sürecine doğrudan dahil olmaktadır. Diğer durumda ise, ikincil metabolit olarak davranmaktadırlar

ve büyümeden ziyade antibiyotikler ve pigmentler gibi ekolojik bir role sahip olmaktadır (Mukherjee et al., 2009).

Çoğu biyosümfaktan mikrobiyal kültür durağan faza ulaştığında üretilmektedir. Ancak, bazı suşlar tarafından logaritmik fazda da üretilmektedirler. *B.subtilis* LAMI009 ile sümfaktin üretimi logaritmik fazda başlayarak büyüme ile paralel şekilde devam etmektedir ve biyosümfaktan üretiminin büyüme ile ilişkili olduğunu gösterecek şekilde logaritmik fazın sonunda yüksek sümfaktin konsantrasyonu belirlenmiştir. Bununla birlikte, *B.subtilis* LAMI005 suşu ile sümfaktin üretimi ise logaritmik fazın sonunda başlamıştır. Yüksek biyosümfaktan konsantrasyonunun durağan fazda tespit edilmesi sonucu biyosümfaktan üretiminin büyüme ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir (Sousa et al., 2012). *Bacillus* türleri tarafından üretilen antifungal sıklık lipopeptidler büyümeyle ilgili olarak üretilmektedir. Sümfaktin üretimi logaritmik fazda başlayıp durağan faza kadar sürmektedir (Haddad et al., 2009; Coutte et al., 2010; Ayed et al., 2019). Fengisin üretimi ise 10-12 saat sonra başlarken İturin A üretimi logaritmik fazın sonunda başlamaktadır ve üretimleri inkübasyon süresi boyunca devam etmektedir (Ambrico and Trupo, 2017; Coutte et al., 2017; Ayed et al., 2019).

Pajcin et al., (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *B.velezensis* türünün gliserol içeren besiyerinde üretimi sonucu biyokütle ve metabolitleri içeren kültür sıvısı elde edilmiştir ve *Xanthomonas* suşuna karşı antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre antimikrobiyal etkinin *B.velezensis* büyümesi ile uyum gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda da, Şekil 4.20’de görüleceği gibi ekstrakte edilen antifungal lipopeptidlerin neden olduğu yüzde büyüme inhibisyon değerleri büyüme eğrisiyle paralel olacak şekilde belirlenmiştir. Logaritmik fazda antifungal etki görülmeye başlanmıştır ve bu etkinin logaritmik faz süresince birikimli olarak arttığı görülmektedir. Ancak, 72. saatten sonra antifungal etkide de düşüş görülmüştür. Bu nedenle bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalarda inkübasyon süresinin 72 saat olmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.20. *B.velezensis* 4-Ka-22 suşundan ekstrakte edilen lipopeptid antibiyotiklerin *Botrytis cinerea* (Bc), *Rhizoctonia solani* (Rs) ve *Fusarium solani*'ye karşı zamanla değişen etkisi.

Zhao et al. (2014) tarafından *Bacillus* sp. BH072 izolatı kullanılarak LB sıvı besiyerinde büyüme eğrisinin incelendiği çalışmada 12-18 saat arasında logaritmik faz görülmüştür ve en yüksek antifungal aktiviteye 60. saatte ulaşılmıştır. Bir başka çalışmada ise, hızlı bir adaptasyon süreci sonrası 14. saatte ulaşıldığında *Bacillus subtilis* üretiminde durağan faza girildiği gösterilmiştir ve 60. saatin sonunda hücre büyüme eğrisinde düşüş profili görülmüştür. Antifungal etki sonuçları incelendiğinde ise, logaritmik fazın sonunda artış göstermeye başladığı ve bu artışın durağan faz boyunca da devam ettiği ve 30. saatte maksimum değere ulaştığı görülmektedir. Bu artışın sebebi olarak üretilen antifungal lipopeptidlerin birikimi gösterilmektedir (Mosquera et al., 2014).

Bacillus subtilis SR/B-16 suşu ile yapılan bir çalışmada ise nutrient broth besiyerindeki dioksik büyüme besiyeri içeriğinde bulunan basit bir karbon kaynağı olan peptonun öncelikli hidrolizine bağlanmaktadır. Daha sonra, SR/B-16 suşu besiyeri içeriğinde bulunan ve daha kompleks bir karbon kaynağı olan et ekstraktını hidrolize edebilmek için ikinci bir lag faza girmektedir (Raton et al., 2012). Bir başka çalışmada, *W.anormalus* MUE24 ile 5 litrelik biyoreaktör kullanılarak biyosüpfektan üretimi gerçekleştirilmiştir. Hücreler öncelikli olarak tercih ettikleri glikoz ve soya fasülyesi yağını kullanarak ilk büyüme fazında 12-24. saatler arasında dioksik büyüme göstermişlerdir ve 48-72. saat aralığında biyosüpfektan üretimi gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra ise, hücrelerin 84-108.

saat aralığında dioksik büyümenin ikinci büyüme fazında biyosüpfektanı kullandıkları gösterilmiştir (Punrata et al., 2020). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, LB sıvı besiyeri içeriğindeki tripton ve maya ekstraktının sırayla kullanılması ya da üretilen lipopeptidlerin kullanılmaya başlanması kaynaklı dioksik büyümenin gerçekleştiği düşünülmektedir.

Luo et al. (2013) tarafından *B.subtilis* N7 suşu ile gerçekleştirilen çalışmada hücre büyümesinin lipopeptid üretiminden önce gerçekleştiği gösterilmiştir. Lipopeptid birikiminin özellikle 36-60. saatler arasında hücre büyümesi durağan fazdayken gerçekleştiği belirlenmiştir. Maksimum lipopeptid veriminin üretimin 60. saatinde elde edildiği ve 72-84. saat aralığında hücrelerin parçalanmasıyla lipopeptid üretiminin de %30 azaldığı belirtilmiştir. Benzer şekilde kullandığımız *B.velezensis* 4-Ka-22 suşu ile de maksimum lipopeptid verimine üretimin 72. saatinde ulaşıldığı ve bu saatten sonra hücre sayısında ve antifungal etkide azalma görülmüştür.

Ayrıca, üretim ortamının pH değerinin 9,0'un üzerine çıkmasıyla birlikte üretilen lipopeptidlerin antifungal etkisinin azalmaya başladığı *Bacillus* türleri ile gerçekleştirilen farklı çalışmalarda da gösterilmiştir (Ayed et al., 2014; Toral et al., 2018; Magdalena and Yogiara, 2020; Wang et al., 2020). Bizim çalışmamızda da 60. saatte pH değeri 9,0'u aşmasına rağmen (Şekil 4.19) antifungal aktivitenin 72. saatten itibaren (Şekil 4.20) düşmeye başladığı belirlenmiştir.

4.10. *Bacillus velezensis* 4-Ka-22 Suşu için Üretim Ortamı Optimizasyonu

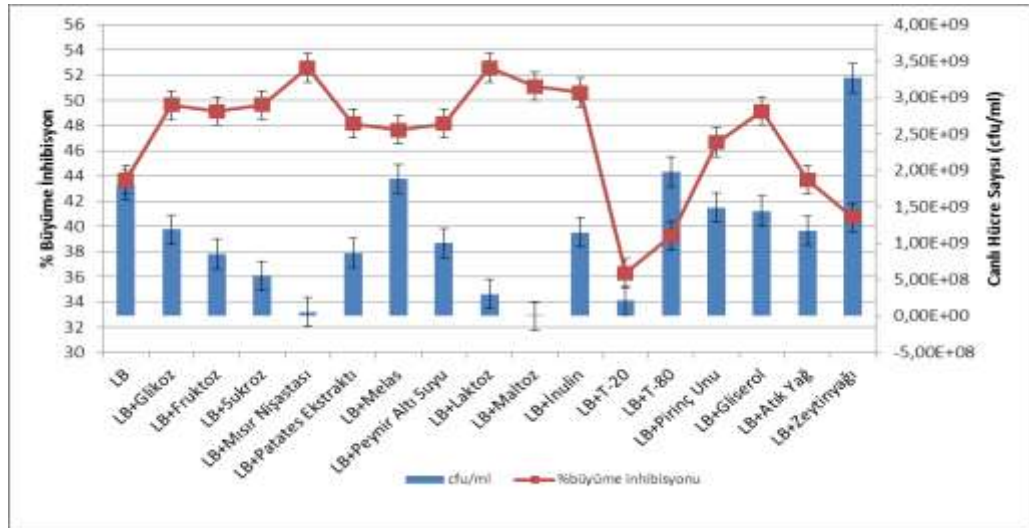
4.10.1. Çeşitli karbon ve azot kaynakları ile diğer besiyeri bileşenlerinin hücre büyümesi ve antifungal etki üzerindeki etkilerinin incelenmesi

Karbon kaynaklarının karışım halinde bulunduğu besiyerinde mikroorganizmalar daha kolay ve etkili şekilde metabolize edebildiklerini öncelikli olarak seçip kullanmaktadır. Aynı zamanda, büyüme ve sekonder metabolit üretimi bakımından en iyi karbon kaynağı farklılık gösterebilmektedir. Glikoz büyüme için çok iyi bir kaynakken sekonder metabolit üretimini baskılayabilmektedir. Maltoz, gliserol, mannoz, ksiloz ve sakkaroz gibi diğer karbonhidratlar sekonder metabolit üretimini negatif etkilerken nişasta, buğday unu ve melas gibi kompleks karbon kaynaklarının pozitif etkilediği gösterilmiştir. Aynı durum azot kaynakları için de gösterilmiştir ve sekonder metabolit üretim regülasyonu için azot asimilasyonunun önemi de pek çok çalışmada incelenmiştir.

Sekonder metabolizma üzerinde azot kaynaklarının etkisi metabolik yollarına, üretici mikroorganizmaya, azot kaynağının çeşidine ve konsantrasyonuna bağlıdır (Pournajati and Karbalaeei-Heidari, 2020). Bu nedenle, çalışmamızda çok sayıda azot ve karbon kaynağının ve diğer besiyeri bileşenlerinin canlı hücre sayısına ve antifungal aktiviteye olan etkileri incelenmiştir.

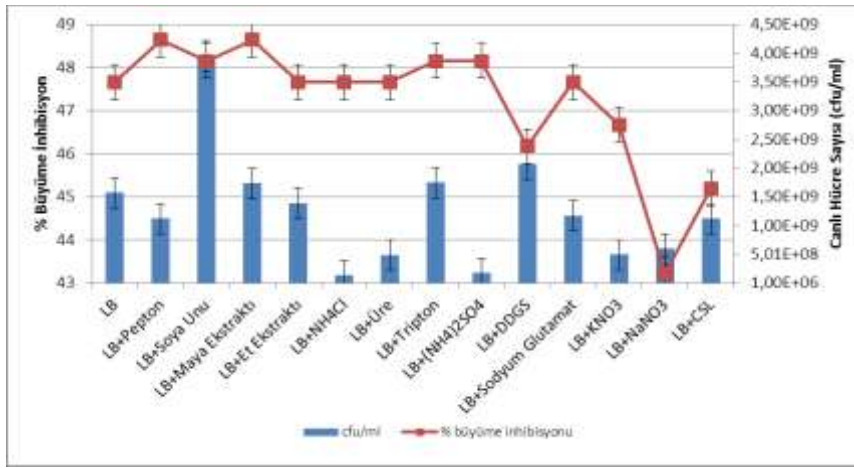
Biyolojik mücadele etmeni olarak *Bacillus* suşlarının ticari biyopreparat olarak kullanımları için düşük maliyetli besiyeri bileşenleri kullanılarak yüksek canlı hücre sayısı içeren üretimlerin gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir. Bu nedenle, bakteriyel büyümenin optimizasyonu düşük maliyetli üretim ortamı geliştirilmesine ve aynı zamanda biyokontrol etkisinin de sürdürülmesine bağlıdır.

Çalışmamızda incelenen karbon kaynakları arasında canlı hücre sayısı üzerinde pozitif etkisi olduğu belirlenenler sırasıyla zeytinyağı, Tween 80 ve melastır. Diğer tüm karbon kaynakları ile kontrol değerinden daha düşük sayıda canlı hücre sayısı belirlenmiştir (Şekil 4.21). Farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı kültür sıvısından ekstrakte edilen siklik lipopeptidlerin etkisiyle gerçekleşen yüzde büyüme inhibisyon değeri incelendiğinde ise en yüksek inhibisyonun mısır nişastası ve laktoz ile elde edildiği görülmüştür. Sonuç olarak iki faktör birlikte incelendiğinde, ticari boyut da göz önünde bulundurularak gerçekleştirilecek optimizasyon çalışması için en etkili ve ucuz besiyeri bileşeni olarak görülen melas seçilmiştir.



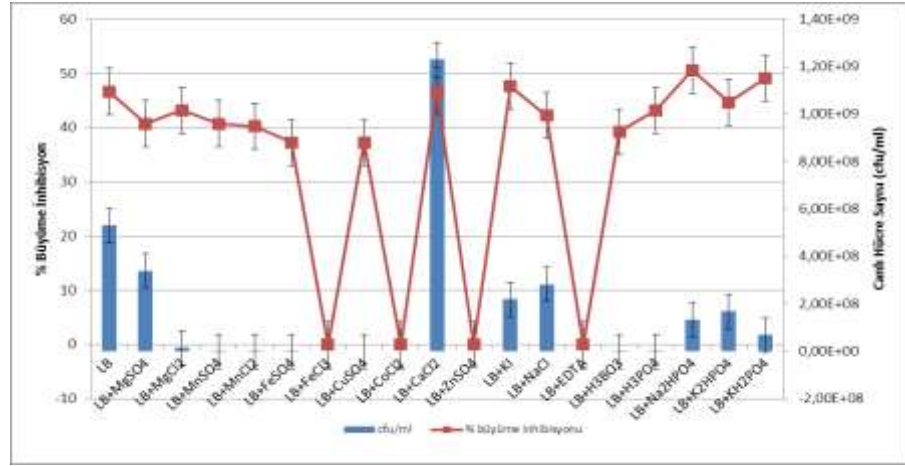
Şekil 4.21. Farklı karbon kaynaklarının canlı hücre sayısına ve siklik lipopeptid üretimi sonucu yüzde büyüme inhibisyon değerine etkisi.

Çalışmamızda incelenen azot kaynakları arasında canlı hücre sayısı üzerinde pozitif etkisi olduğu belirlenenler sırasıyla soya unu, DDGS, tripton ve maya ekstraktıdır. Diğer tüm azot kaynakları ile kontrol değerinden daha düşük sayıda canlı hücre üretimi gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.22). Farklı azot kaynaklarının kullanıldığı kültür sıvısından ekstrakte edilen siklik lipopeptidlerin etkisiyle gerçekleşen yüzde büyüme inhibisyon değeri incelendiğinde ise en yüksek inhibisyonun pepton ve maya ekstraktı ile elde edildiği görülmüştür. Ancak soya unu ile aralarındaki farkın çok az olması sebebiyle iki faktör birlikte incelendiğinde sonraki optimizasyon çalışmaları için en etkili ve ucuz besiyeri bileşeni olarak görülen soya unu seçilmiştir.



Şekil 4.22. Farklı azot kaynaklarının canlı hücre sayısına ve siklik lipopeptid üretimi sonucu yüzde büyüme inhibisyon değerine etkisi.

Çalışmamızda incelenen diğer besiyeri bileşenleri arasında canlı hücre sayısı üzerinde pozitif etkisi olduğu belirlenen tek bileşen CaCl_2 'dir. Diğer tüm besiyeri bileşenleri ile kontrol değerinden daha düşük sayıda canlı hücre sayısı elde edilmiştir (Şekil 4.23). Farklı besiyeri bileşenlerinin kullanıldığı kültür sıvısından ekstrakte edilen siklik lipopeptidlerin etkisiyle gerçekleşen yüzde büyüme inhibisyon değeri incelendiğinde ise en yüksek inhibisyonun Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KI ve CaCl_2 ile elde edildiği görülmüştür. Ancak bu bileşenlerin antifungal aktiviteye olan etkileri arasındaki farkın çok az olması sebebiyle iki faktör birlikte incelendiğinde sonraki optimizasyon çalışmaları için en etkili besiyeri bileşeni olarak görülen CaCl_2 seçilmiştir.



Şekil 4.23. Farklı besiyeri bileşenlerinin canlı hücre sayısına ve siklik lipopeptid üretimi sonucu yüzde büyüme inhibisyonu değerine etkisi.

Sonuç olarak, geliştirilecek olan üretim ortamının melas, soya unu ve CaCl_2 içermesine karar verilmiş ve RSM ile bu üç bileşen için üretim ortamı optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Zhao et al. (2014), yaptıkları çalışmada, *Bacillus* sp. BH072 ile iturin A üretimi için en etkili besiyeri bileşenlerinin sakkaroz, soya unu ve MgCl_2 olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, Mg^{+2} 'nin iturin A üretimini desteklediğini, Fe^{+3} ve Zn^{+2} 'nin ise iturin A üretimi üzerinde negatif etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte, inorganik azot kaynaklarının iturin A üretimini olumsuz etkilediği organik azot kaynaklarının ise iturin A üretimini desteklediği yapılan çalışma ile ortaya konmuştur. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada da organik azot kaynakları ile inorganik azot kaynaklarına göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Benzer şekilde FeCl_3 , ZnSO_4 , CoCl_2 ve EDTA kullanıldığında üretim inhibisyonu gözlemlenmiştir.

Diğer bir çalışmada elde edilen sonuçlara göre soya unu, sakkaroz ve melas gibi ticari ve yan ürünlerin birlikte kullanılmasının *B.subtilis* CPA-8 suşunun büyümesini arttırdığı ve biyokontrol etkinliğini sürdürdüğü gösterilmiştir. Soya ürünleri *B.subtilis* türlerinin endüstriyel üretimleri için protein, karbonhidratlar, vitaminler ve mineraller içermesi bakımından önemli substratlar olarak değerlendirilmektedir. Melas ise yüksek şeker içeriği (%50 sakkaroz, glikoz, fruktoz), koloidal süspansiyon olması, ağır metaller, vitaminler ve azot bileşenleri içermesine bağlı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda melasın üretim ortamındaki kullanım konsantrasyonlarının *Bacillus* türleri için toksik olabileceği belirtilmiştir. Mikroorganizmaların büyümesi ile üretim ortamında biriken asidik son ürünler büyüme inhibisyonuna sebep olmaktadır. Yüksek melas konsantrasyonu ile birlikte maya ekstraktı ya da pepton

kullanıldığında *B.subtilis* CPA-8 suşunun büyümesi sonucu pH düşmüş (5,5'ten az) ve bakteri büyümesinde kısmi inhibisyon görülmüştür. Ucuz karbon ve azot kaynakları içerecek şekilde (40 g/lt %44 yağsız soya unu, 5 g/lt melas ve mineral solüsyonu) *B.subtilis* CPA-8 üretimi için düşük maliyetli bir üretim ortamı optimizasyonu gerçekleştirilmiştir (Yanez-Mendizabal et al., 2012). Çalışmamızda %1 oranında melas kullanılmasının canlı hücre sayısı ve antifungal etki üzerinde olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir.

Rane et al. (2017) yaptıkları çalışmada peynir altı suyu, melas, patates kabuğu, muz kabuğu, portakal kabuğu gibi atıkların ekstraktları ve şeker kamışı küspesi gibi tarımsal sanayi atıklarını kullanarak biyosüpfektan üretim optimizasyonu gerçekleştirmişlerdir. *B.subtilis* ANR 88 suşu, kullanılan tüm karbon kaynaklarında büyüme göstermiştir. Melas kullanılan üretim ortamındaki biyosüpfektan üretimi ile kontrol olarak kullanılan glikozlu üretim ortamındaki biyosüpfektan üretimi benzer şekilde sonuçlanmıştır. Melas konsantrasyonları incelenen çalışmada, biyomasın %10 melas konsantrasyonuna kadar arttığı ancak biyosüpfektan veriminin %4 melas konsantrasyonundan sonra önemli ölçüde artmadığı gösterilmiştir. Azot kaynaklarının optimizasyonu gerçekleştirilirken %4 melas konsantrasyonu kullanılmıştır ve biyosüpfektan üretiminin azot kaynaklarının organik ya da inorganik olmasına bağlı olarak bir farklılık göstermediği belirtilmiştir. Ancak, suşun büyümesinin üre, maya ekstraktı ve pepton gibi organik azot kaynaklarında daha iyi olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda %1 oranında soya unu kullanılmasının canlı hücre sayısı ve antifungal etki üzerinde olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir.

Mn^{+2} , Fe^{+3} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Zn^{+2} gibi metal iyonlarının spor üretiminin arttırılmasında önemli faktörler olduğu bilinmektedir. Metal iyonları sporulasyon için gerekli enzim sistemlerinin aktivasyonunda rol oynamaktadır. Mangan ve demir sporulasyon için zorunludur ve antibiyotikler ve peptidler gibi *Bacillus* türleri tarafından üretilen sekonder metabolitlerin sentezine katılmaktadırlar. Kalsiyum, dipikolinik asit ile şelat oluşturarak sporun önemli bir bileşeni olarak yer almaktadır ve ısı direncinin artmasını sağlamaktadır. Mn^{+2} , Fe^{+2} ve Ca^{+2} 'nin spor üretimi üzerinde pozitif etkisi olduğu gösterilmiştir. Çinkonun ise sporulasyon üzerinde negatif etkisi olduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, farklı suşların besiyerindeki metal iyonlarına karşı farklı tepkiler gösterebileceğini de ortaya koymuştur (Ren et al., 2018). Çalışmamızda kullanılan suş için Mn^{+2} ve Fe^{+2} 'nin olumlu bir etkisi olmazken Ca^{+2} 'nin canlı hücre sayısı ve antifungal etki üzerinde olumlu etkisi görülmüştür.

4.10.2. Seçilen besiyeri bileşenlerinin *Bacillus velezensis* 4-Ka-22 suşunun hücre büyümesi ve antifungal aktivitesi üzerindeki birlikte etkisinin incelenmesi

Canlı hücre sayısını ve antifungal etkiyi arttırdığı Kısım 4.10.1’de belirlenen melas, soya unu ve CaCl_2 ’nin Çizelge 3.3’te gösterildiği şekilde farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerleri (Besiyeri 1-7) ile herbirinin LB sıvı besiyerine %1 oranında eklendiği besiyeri (Besiyeri 8) ve kontrol olarak LB sıvı besiyerinde büyütülen *Bacillus velezensis* 4-Ka-22 suşu için elde edilen canlı hücre sayısı (kob/ml) ve yüzde büyüme inhibisyon değerleri Çizelge 4.20’de verilmiştir. Böylece melas, soya unu ve CaCl_2 ’nin farklı miktarları kullanılarak hazırlanan üretim ortamında gerçekleştirecekleri etki incelenmiştir. Sonuç olarak, en yüksek canlı hücre sayısı Besiyeri-1 (%1 melas, %1 soya unu ve %1 CaCl_2) ve Besiyeri-8 (LB besiyerine %1 melas, %1 soya unu ve %1 CaCl_2 eklenmiştir.) kullanıldığında elde edilmiştir. Bu iki besiyeri antifungal etki bakımından karşılaştırıldığında ise, Besiyeri 1’de Besiyeri 8’e göre yaklaşık iki kat yüksek yüzde büyüme inhibisyon değeri elde edildiği görülmektedir. Bu da optimum besiyeri tasarlamak üzere seçilen besiyeri bileşenlerinin LB sıvı besiyeri olmadan da kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.20. Melas, soya unu ve CaCl_2 ’nin farklı konsantrasyonları kullanılarak elde edilen canlı hücre sayısı (kob/ml) ve yüzde büyüme inhibisyon değerleri.

	Canlı Hücre Sayısı $\pm$ SS* ($\times 10^7$ kob/ml)	Büyüme İnhibisyon Değeri $\pm$ SS (%)
Besiyeri 1	171 $\pm$ 32 ^a	15,0 $\pm$ 1,11 ^b
Besiyeri 2	2,06 $\pm$ 0,29 ^b	9,44 $\pm$ 2,12 ^e
Besiyeri 3	3,45 $\pm$ 0,35 ^b	10,0 $\pm$ 1,28 ^{de}
Besiyeri 4	2,62 $\pm$ 0,42 ^b	13,33 $\pm$ 0 ^{bc}
Besiyeri 5	5,56 $\pm$ 0,54 ^b	13,33 $\pm$ 1,81 ^{cd}
Besiyeri 6	8,02 $\pm$ 0,24 ^b	12,22 $\pm$ 1,28 ^{bc}
Besiyeri 7	11,13 $\pm$ 0,65 ^b	13,33 $\pm$ 1,81 ^{bc}
Besiyeri 8	163,33 $\pm$ 34,5 ^a	7,78 $\pm$ 1,28 ^e
Kontrol	42,3 $\pm$ 0,35 ^b	23,33 $\pm$ 1,28 ^a

Aynı harfle gösterilen sütun içindeki ortalamalar, Tukey Testi’ne göre önemli ölçüde farklı değildir ($p < 0,05$).

*SS: Standart sapma

Karbon kaynağı olarak kullanılan **melasın** miktarının artması canlı hücre sayısı üzerinde logaritmik olarak önemli kabul edilebilecek bir etki göstermezken en yüksek canlı hücre sayısı düşük melas miktarı kullanıldığında elde edilmiştir. Bu nedenle, RSM denemesinde minimum ve maksimum değerler olarak %0,1 ve %1 oranında melas denenmesine karar verilmiştir. **Soya unu** düşük miktarda kullanıldığında canlı hücre sayısında artış görülürken yüksek miktarlarda kullanıldığında yüzde büyüme inhibisyon değerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle, RSM denemesinde minimum ve maksimum değerler olarak %1 ve %10 oranında soya unu kullanılmasına karar verilmiştir. **CaCl₂** miktarının değişmesi canlı hücre sayısı ve yüzde büyüme inhibisyon değeri üzerinde ciddi bir değişime sebep olmamıştır. Bunun sonucunda RSM denemesinde minimum ve maksimum değerler olarak %0,5 ve %1 oranında CaCl₂ kullanılmasına karar verilmiştir.

4.10.3. Seçilen besiyeri bileşenlerinin RSM ile optimizasyonu

Bacillus velezensis 4-Ka-22 suşunun yüksek biyokütle (canlı hücre sayısı) ve siklik lipopeptid miktarı (yüzde büyüme inhibisyon değeri) elde edilecek şekilde sıvı kültür fermentasyon yöntemi ile üretiminde, RSM ile optimize edilecek bağımsız değişkenler olarak melas, soya unu ve CaCl₂ miktarı seçilmiştir. Yanıt olarak ise, canlı hücre sayısı (kob/ml) ve yüzde büyüme inhibisyon değeri belirlenmiştir.

RSM analizi için Box-Behnken deney tasarımının kullanılması uygun bulunmuştur. Deney tasarımı sonucunda 17 farklı üretim ortamında *B.velezensis* 4-Ka-22 suşunun üretimi sonrasında elde edilen canlı hücre sayısı ve yüzde büyüme inhibisyon değeri ile ilgili deneysel ve tahmini yanıtlar Çizelge 4.21’de verilmiştir. İki farklı yanıt sonuçlarının da incelenmesinden sonra, elde edilen veriler doğrultusunda canlı hücre sayısını, yüzde büyüme inhibisyon değerini ve her iki yanıtı da aynı anda arttırmaya yönelik olarak üç farklı üretim ortamı tasarımı yapılmıştır.

Çizelge 4.21. Box-Behnken deney seti ve incelenen yanıtlar için elde edilen deneysel ve tahmini sonuçlar.

No	Melas (%)	Soya Unu (%)	CaCl ₂ (%)	Canlı Hücre Sayısı (log(kob/ml))		Büyüme İnhibisyon Değeri (%)	
				Deneysel	Tahmini	Deneysel	Tahmini
1	0,1	1	0,75	9,40	9,73	4,49	3,23
2	1	1	0,75	9,26	8,89	7,87	7,72
3	0,1	10	0,75	8,79	8,79	8,99	9,13
4	1	10	0,75	8,08	7,96	7,87	9,13
5	0,1	5,5	0,5	9,51	9,30	8,99	9,97
6	1	5,5	0,5	8,27	8,46	10,11	9,97
7	0,1	5,5	1	9,38	9,23	2,25	2,39
8	1	5,5	1	8,12	8,39	7,87	6,88
9	0,55	1	0,5	9,24	9,35	7,87	8,15
10	0,55	10	0,5	8,16	8,41	19,10	17,98
11	0,55	1	1	9,13	9,28	7,87	8,99
12	0,55	10	1	8,25	8,34	6,74	6,46
13	0,55	5,5	0,75	9,06	8,84	5,62	4,22
14	0,55	5,5	0,75	9,15	8,84	4,49	4,22
15	0,55	5,5	0,75	8,88	8,84	3,25	4,22
16	0,55	5,5	0,75	8,94	8,84	4,49	4,22
17	0,55	5,5	0,75	8,73	8,84	3,25	4,22

Yanıtlardan ilki olan canlı hücre sayısı için elde edilen modelin uygunluğu varyans analizi (ANOVA) kullanılarak incelenmiştir ve sonuçlar Şekil 4.24'te gösterilmiştir. F değerinin 19,51 olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Regresyon için f değerinin yüksek olması modelin uygunluğunu ve tasarlanan değişken miktarları ile canlı hücre sayısında gözlemlenen değişimi yeterince açıklayabildiğini göstermektedir. Olasılık değeri ($p < 0,05$) parametrelerin istatistiksel olarak anlamlılığını kontrol etmek için kullanılmaktadır. Şekil 4.24'te gösterilen sonuçlara göre melas (A) ve soya unu (B) canlı hücre sayısını arttırmak için anlamlı olarak bulunmuştur. Ayrıca 2,52 olan uyumsuzluk F değeri ("*Lack of Fit F-value*"), bu uyumsuzluğun, tekrarlanan deneylerde görülen hata payı olan saf hataya ("*pure error*") göre çok küçük olduğunu diğer bir deyişle bu uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir. R^2 değeri 0,8182 olarak elde edilmiştir ve bu değer modelin canlı hücre sayısını arttırmak için %81,82 uygun olduğunu ifade etmektedir. Bu sonuçlar, seçilen modelin canlı hücre sayısını arttırmak için seçilen değişkenlerin linear etkilerini tatmin edici bir şekilde açıklayabildiğini göstermektedir.

Varyans Analizi (ANOVA):

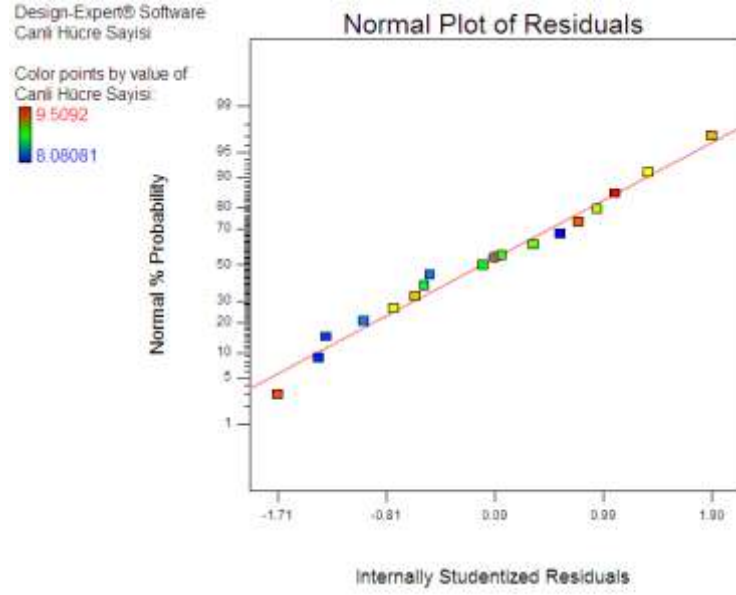
Response	1	Canlı Hücre Sayısı				
ANOVA for Response Surface Linear Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	3.16	3	1.05	19.51	< 0.0001	significant
A-Melas	1.40	1	1.40	25.92	0.0002	
B-Soya unu	1.75	1	1.75	32.41	< 0.0001	
C-Cac12	0.011	1	0.011	0.19	0.6662	
Residual	0.70	13	0.054			
Lack of Fit	0.60	9	0.066	2.52	0.1932	not significant
Pure Error	0.11	4	0.026			
Cor Total	3.86	16				

Şekil 4.24. Canlı hücre sayısına ait linear model için Design Expert programı ANOVA çıktısı.

Regresyon analizi sonucunda, canlı hücre sayısını arttıran (Y) bağımsız değişkenler olan melas miktarı (A), soya unu miktarı (B) ve CaCl₂ miktarı (C) cinsinden belirlenen denklem aşağıda verilmiştir:

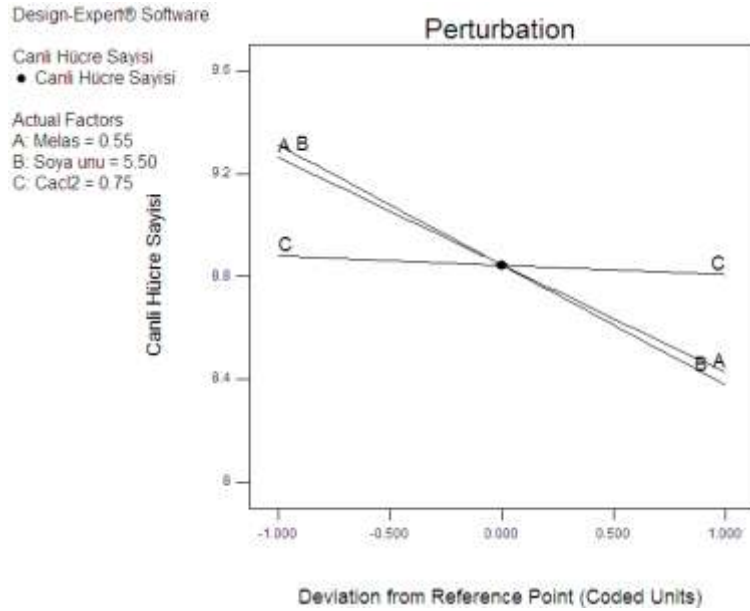
$$\text{Canlı Hücre Sayısı (Y)} = 8,84 - 0,42xA - 0,47xB - 0,036xC$$

Modelin uygunluğu, model ile veriler arasındaki korelasyonun derecesine bağlı olmakla birlikte hata dağılımının niteliğine de bağlıdır. Hataların linear dağılımı, bu hataların belirli olasılık bölgelerinde yoğunlaşmadığını gösterir. Yani hata dağılımının linear olması modelin uygun olduğunu belirtmektedir. Şekil 4.25 bu sete ilişkin hata dağılım grafiğini göstermektedir. Hata dağılım grafiğindeki ufak sapmalar göz ardı edilebilecek boyuttadır ve hata dağılım grafiği modelin uygunluğunu desteklemektedir.



Şekil 4.25. Canlı hücre sayısı için hata dağılım grafiği.

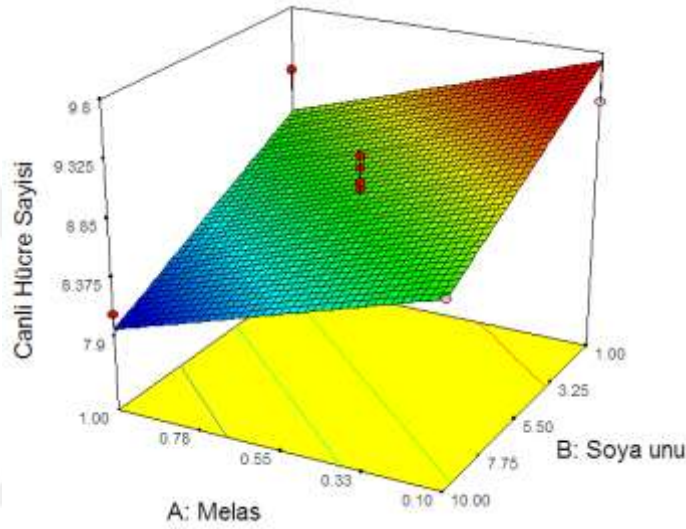
Farklı değişkenlerin, belirli bir yanıt üzerindeki etkilerinin açıkça görülebildiği grafiği ile yanıtla ilişkin olan çeşitli değişkenlerin önem sıralaması yapılabilir. Melas, soya unu ve CaCl_2 değişkenlerinin canlı hücre sayısı üzerindeki etkilerini gösteren pertürbasyon grafiği Şekil 4.26’da verilmiştir.



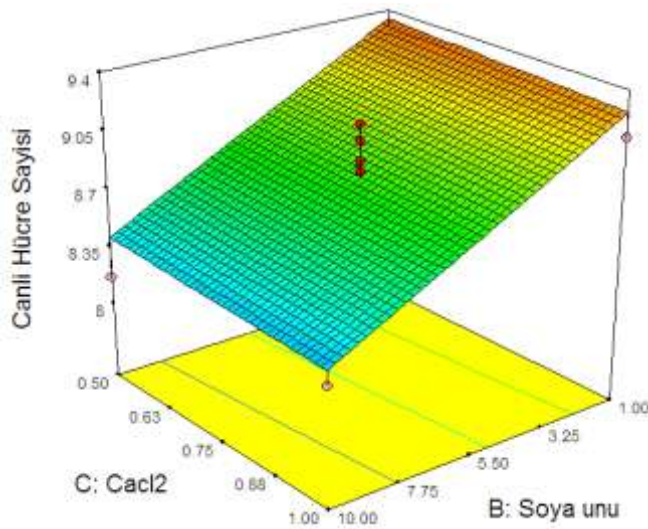
Şekil 4.26. Canlı hücre sayısı için pertürbasyon grafiği (A: Melas, B: Soya unu, C: CaCl_2).

Pertürbasyon grafiğinden açıkça görülebildiği üzere, incelenen üç besiyeri bileşeni için de kullanılan miktar arttıkça canlı hücre sayısında farklı oranlarda azalma gerçekleşmiştir. CaCl_2 değişkeninin ilgili yanıt üzerindeki etkisinin diğer değişkenlere oranla oldukça az olduğu görülmektedir. Eğrilerin kesiştiği nokta referans noktasıdır ve bu grafik için merkez noktaları ifade etmektedir.

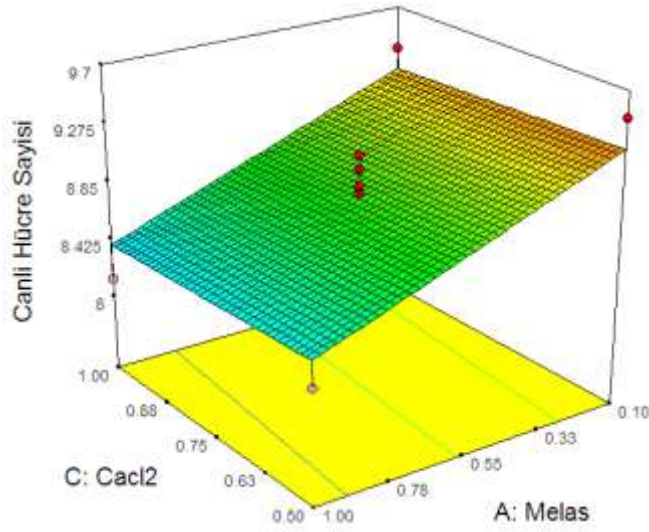
RSM ile elde edilen regresyon eşitliğine ait 3D yanıt yüzeyi grafikleri Şekil 4.27-4.29'da gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Canlı hücre sayısı ile melas miktarı ve soya unu miktarı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.28. Canlı hücre sayısı ile CaCl_2 miktarı ve soya unu miktarı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.29. Canlı hücre sayısı ile CaCl_2 miktarı ve melas miktarı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar doğrultusunda üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri ve pertürbasyon grafiği incelendiğinde her üç bağımsız değişken için de deney tasarımı sırasında optimum değer aralıklarının kullanıldığı görülmektedir. Sonuç olarak *B.velezensis* 4-Ka-22 suşu ile gerçekleştirilecek üretim sonucu elde edilecek canlı hücre sayısı üzerinde melas ve soya unu miktarının etkisinin daha fazla olduğu açıkça görülmektedir.

Bir diğer yanıt olan yüzde büyüme inhibisyon değeri için elde edilen modelin uygunluğu da varyans analizi (ANOVA) kullanılarak incelenmiştir ve sonuçlar Şekil 4.30'da gösterilmiştir. F değerinin 14,86 olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Şekil 4.30'da gösterilen sonuçlara göre melas (A), soya unu (B), CaCl_2 (C), BC, B^2 ve C^2 yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmak için anlamlı olarak bulunmuştur. Ayrıca 2,63 olan uyumsuzluk F değeri ("*Lack of Fit F-value*"), bu uyumsuzluğun, anlamlı olmadığını göstermektedir. R^2 değeri 0,9503 olarak elde edilmiştir ve bu değer modelin yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmak için %95,03 uygun olduğunu ifade etmektedir. Bu sonuçlar, seçilen modelin yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmak için seçilen değişkenlerin ikinci dereceden etkilerini tatmin edici bir şekilde açıklayabildiğini göstermektedir.

Varyans Analizi (ANOVA):

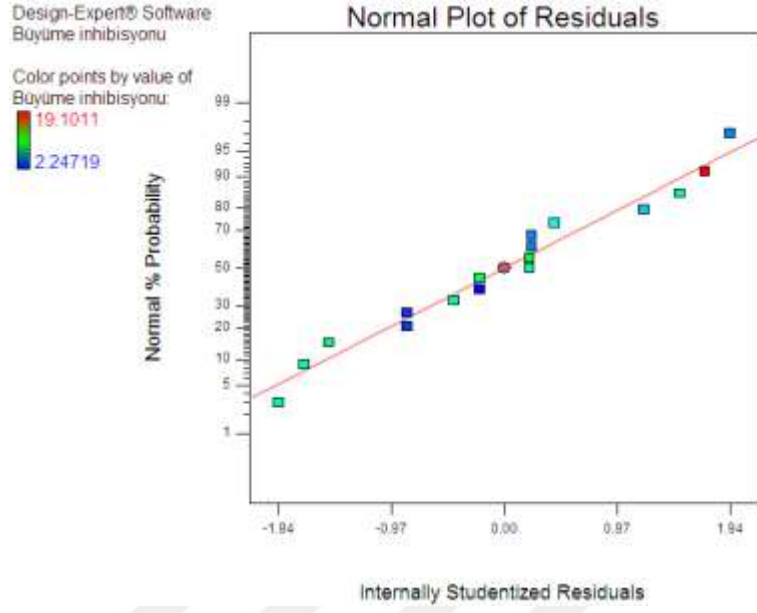
Response	2	Büyüme inhibisyonu				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	227.20	9	25.24	14.86	0.0009	significant
A-Melas	10.10	1	10.10	5.95	0.0448	
B-Soya unu	26.67	1	26.67	15.70	0.0054	
C-CaCl2	56.97	1	56.97	33.54	0.0007	
AB	5.05	1	5.05	2.97	0.1283	
AC	5.05	1	5.05	2.97	0.1283	
BC	38.19	1	38.19	22.49	0.0021	
A ²	4.783E-005	1	4.783E-005	2.817E-005	0.9959	
B ²	40.11	1	40.11	23.62	0.0018	
C ²	40.11	1	40.11	23.62	0.0018	
Residual	11.89	7	1.70			
Lack of Fit	7.89	3	2.63	2.63	0.1865	not significant
Pure Error	4.00	4	1.00			
Cor Total	239.08	16				

Şekil 4.30. Yüzde büyüme inhibisyon değerine ait ikinci dereceden model için Design Expert programı ANOVA çıktısı.

Regresyon analizi sonucunda, yüzde büyüme inhibisyon değerini (Y) arttıran bağımsız değişkenler olan melas miktarı (A), soya unu miktarı (B) ve CaCl₂ miktarı (C) cinsinden belirlenen denklem aşağıda verilmiştir:

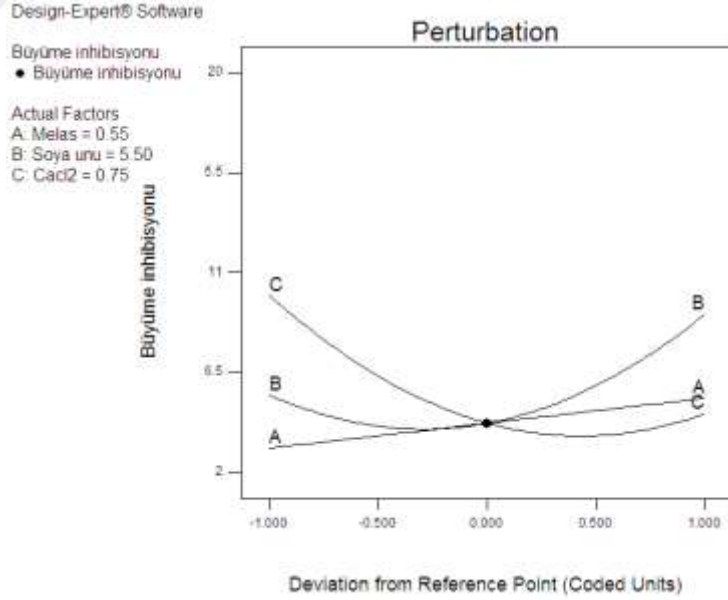
$$\text{Yüzde Büyüme İnhibisyon Değeri (Y)} = 4,22 + 1,12xA + 1,83xB - 2,67xC - 1,12xAxB + 1,12xAxC - 3,09xBxC - 3,371E-003xA^2 + 3,09xB^2 + 3,09xC^2$$

Şekil 4.31 bu sete ilişkin hata dağılım grafiğini göstermektedir. Hata dağılım grafiğindeki ufak sapmalar göz ardı edilebilecek boyuttadır ve hata dağılım grafiği modelin uygunluğunu desteklemektedir.



Şekil 4.31. Yüzde büyüme inhibisyon değeri için hata dağılım grafiği.

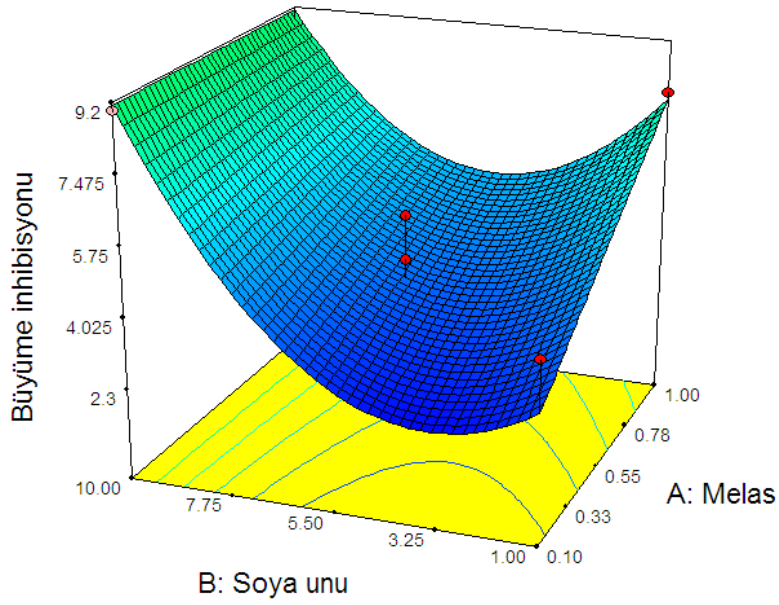
Melas, soya unu ve CaCl_2 değişkenlerinin yüzde büyüme inhibisyon değeri üzerindeki etkilerini gösteren pertürbasyon grafiği Şekil 4.32’de verilmiştir.



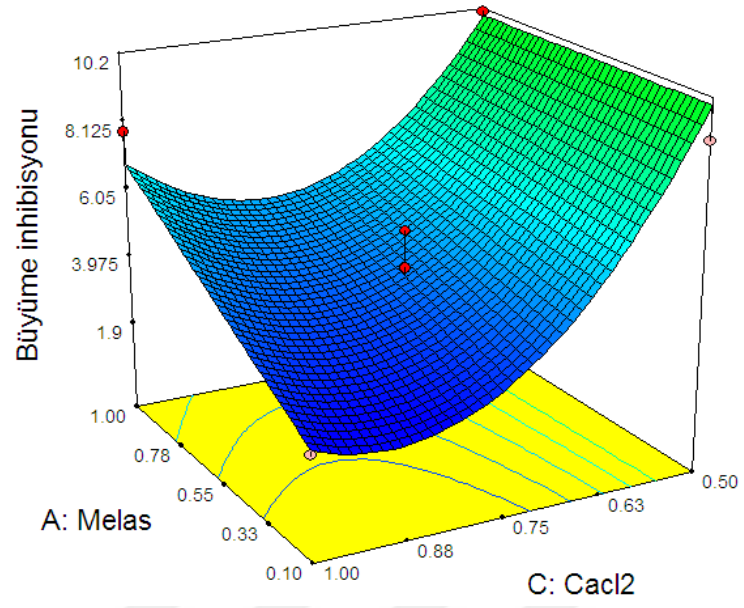
Şekil 4.32. Yüzde büyüme inhibisyon değeri için pertürbasyon grafiği (A: Melas, B: Soya unu, C: CaCl_2).

Pertürbasyon grafiğinden açıkça görülebildiği üzere, incelenen besiyeri bileşenlerinden melas ve soya unu miktarı arttıkça yüzde büyüme inhibisyon değeri artarken CaCl_2 miktarının azalmasıyla yüzde büyüme inhibisyon değeri artmaktadır. Eğrilerin kesiştiği nokta referans noktasıdır ve bu grafik için merkez noktaları ifade etmektedir.

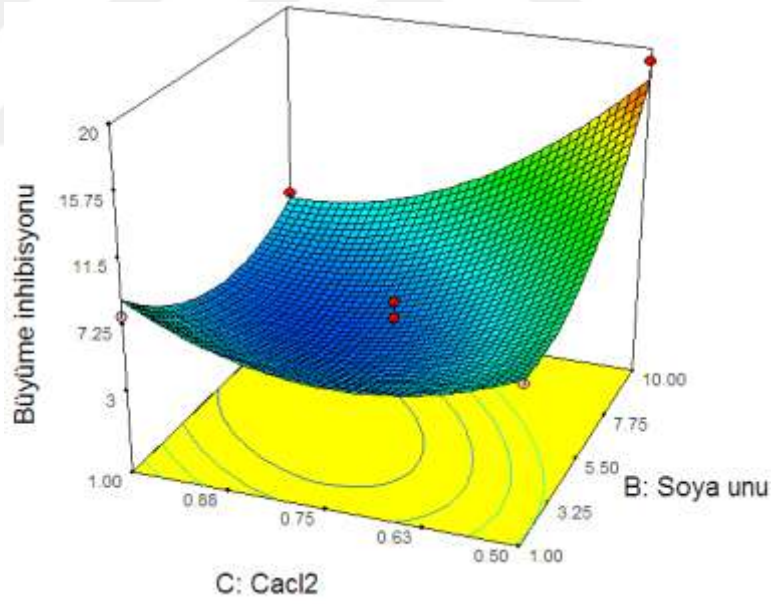
RSM ile elde edilen regresyon eşitliğine ait 3D yanıt yüzeyi grafikleri Şekil 4.33-4.35'te verilmiştir.



Şekil 4.33. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ile soya unu miktarı ve melas miktarı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.34. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ile melas miktarı ve CaCl₂ miktarı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.35. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ile CaCl₂ miktarı ve soya unu miktarı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri ve pertürbasyon grafiği incelendiğinde her üç bağımsız değişken için de deney tasarımı sırasında optimum değer aralıklarının kullanıldığı görülmektedir. Sonuç olarak *B.velezensis* 4-Ka-22 suşu ile gerçekleştirilecek üretim sonucu elde edilecek yüzde büyüme inhibisyon değeri üzerinde her üç besiyeri bileşeninin de etkisinin olduğu açıkça görülmektedir.

Çalışmada incelenen yanıtların maksimuma yaklaştırılabilmesi için kullanılması gereken besiyeri bileşenlerinden melas ve soya unu miktarlarının ters orantılı olduğu görülmüştür. Canlı hücre sayısının artması için düşük miktarda olmaları gerekirken yüzde büyüme inhibisyon değerinin artması için ise yüksek miktarda olmaları gerekmektedir. Bu nedenle, programdan elde edilen çözümler doğrultusunda yüksek canlı hücre sayısı ve yüksek yüzde büyüme inhibisyon değeri elde edilmesini sağlayacak iki farklı besiyeri ve her iki yanıtın da yüksek olmasını sağlayacak bir besiyeri olmak üzere üç farklı besiyeri tasarımı incelenmiştir.

Canlı hücre sayısını arttırmaya yönelik besiyeri tasarımı

Canlı hücre sayısını arttırmaya yönelik olarak optimize edilmek için belirlenen kriterler ve optimize edilmek istenen yanıtlar Çizelge 4.22’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.22. Canlı hücre sayısını arttırmak için optimizasyon kriterleri.

Faktör	Amaç
Melas miktarı (%)	Minimize
Soya unu miktarı (%)	Minimize
CaCl ₂ miktarı (%)	Minimize
Yanıt	Amaç
Canlı hücre sayısı	Maximize
Yüzde büyüme inhibisyon değeri	In range

Bu optimizasyon kriterlerine göre canlı hücre sayısını maksimize edecek şekilde melas, soya unu ve CaCl₂ miktarları minimize edildiğinde elde edilen sayısal optimizasyon sonuçları Şekil 4.36’daki gibi elde edilmiştir.

Constraints

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
Melas	minimize	0.1	1	1	1	3
Soya unu	minimize	1	10	1	1	3
Cacl2	minimize	0.5	1	1	1	3
Canlı Hücre Sayı	maximize	8.08081	9.5092	1	1	3
Büyüme inhibisyonu	is in range	2.24719	19.1011	1	1	3

Solutions

Number	Melas	Soya unu	Cacl2	Canlı Hücre Sayı	Büyüme inhibisyonu	Desirability	
1	0.10	1.00	0.50	9.76633	7.01886	1.000	<u>Selected</u>
2	0.10	1.06	0.50	9.75989	7.01794	0.998	
3	0.10	1.00	0.50	9.76258	6.95942	0.998	
4	0.10	1.00	0.50	9.76568	6.89529	0.998	
5	0.11	1.00	0.50	9.75766	7.04249	0.997	
6	0.10	1.25	0.50	9.74004	7.02108	0.993	
7	0.10	1.39	0.50	9.72627	7.03027	0.989	
8	0.10	1.43	0.50	9.72214	7.03393	0.988	
9	0.10	1.66	0.50	9.6978	7.06578	0.981	
10	0.17	1.00	0.50	9.70284	7.19044	0.980	
11	0.16	1.09	0.50	9.70099	7.16556	0.980	
12	0.18	1.00	0.50	9.68987	7.22271	0.976	
13	0.10	1.00	0.55	9.75873	5.71266	0.973	
14	0.10	1.95	0.50	9.66754	7.1286	0.972	
15	0.34	1.00	0.73	9.50917	4.4598	0.792	

Şekil 4.36. Canlı hücre sayısını maksimize etmeye yönelik sayısal optimizasyon sonuçları.

İstenilirlik derecesi (“*desirability*”) tam olarak 1,0’e eşit olan 1. çözüm önerisi seçilmiştir. Bu durumda, optimum değerler olarak melas için %0,1, soya unu için %1,0 ve CaCl₂ için ise %0,5 belirlenmiştir.

Yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmaya yönelik besiyeri tasarımı

Yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmaya yönelik olarak optimize edilmek için belirlenen kriterler ve optimize edilmek istenen yanıtlar Çizelge 4.23’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.23. Yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmak için optimizasyon kriterleri.

Faktör	Çalışma Aralığı
Melas miktarı (%)	Maximize
Soya unu miktarı (%)	Maximize
CaCl ₂ miktarı (%)	Minimize
Yanıt	Amaç
Canlı hücre sayısı	In range
Yüzde büyüme inhibisyon değeri	Maximize

Bu optimizasyon kriterlerine göre yüzde büyüme inhibisyon değerini maksimize edecek şekilde melas ve soya unu miktarları maksimize edilirken CaCl₂ miktarı minimize edildiğinde elde edilen sayısal optimizasyon sonuçları Şekil 4.37’de gösterilmiştir.

Constraints

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
Melas	maximize	0.1	1	1	1	3
Soya unu	maximize	1	10	1	1	3
Cacl2	minimize	0.5	1	1	1	3
Canlı Hücre Say	is in range	8.08081	9.5092	1	1	3
Büyüme inhibisyon	maximize	2.24719	19.1011	1	1	3

Solutions

Number	Melas	Soya unu	Cacl2	Canlı Hücre Say	Büyüme inhibisyon	Desirability	Selected
1	0.91	10.00	0.50	8.08081	17.0831	0.943	Selected
2	0.91	9.95	0.50	8.08081	16.9633	0.941	
3	0.91	10.00	0.50	8.08081	16.9723	0.940	
4	0.93	9.79	0.50	8.08081	16.5468	0.935	
5	0.85	10.00	0.50	8.13218	17.222	0.928	
6	0.96	9.49	0.50	8.08081	15.8456	0.925	
7	0.83	10.00	0.50	8.15498	17.2835	0.921	
8	0.90	10.00	0.53	8.08081	15.7698	0.905	
9	1.00	8.34	0.50	8.16717	13.5933	0.861	
10	0.55	10.00	0.50	8.41352	17.9794	0.826	
11	0.68	9.09	0.50	8.38834	15.6016	0.822	
12	0.46	10.00	0.50	8.49983	18.2111	0.783	
13	0.37	10.00	0.50	8.57721	18.4186	0.735	

Şekil 4.37. Yüzde büyüme inhibisyon değerini maksimize etmeye yönelik sayısal optimizasyon sonuçları.

İstenilirlik derecesi (“*desirability*”) tam olarak 1,0’e eşit olmasa da 1. çözüm önerisi seçilmiştir. Bu durumda, optimum değerler olarak melas için %0,91, soya unu için %10,0 ve CaCl_2 için ise %0,5 belirlenmiştir.

Lima et al. (2020) yaptıkları çalışmada, yüksek glikoz şurubu ve maya ekstraktı konsantrasyonlarının toplam biyosüpfektan üretimini arttırdığını, yüksek kalsiyum klorür miktarının ise biyosüpfektan üretimini engellediğini göstermişlerdir. Bu nedenle, optimum üretim ortamında bulunması gereken CaCl_2 miktarı rsm ile optimize edilmiştir. Bizim çalışmamızda da, karbon ve azot kaynağı miktarının artmasının biyosüpfektan miktarını arttırdığı, CaCl_2 miktarının artmasının ise biyosüpfektan miktarını engellediği gösterilmiştir.

Canlı hücre sayısı ve yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmaya yönelik besiyeri tasarımı

Canlı hücre sayısı ve antifungal etkinin her ikisini de arttırılmasına yönelik olarak bir besiyeri optimize edilmek için belirlenen kriterler ve optimize edilmek istenen yanıtlar Çizelge 4.24’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.24. Canlı hücre sayısı ve antifungal etkiyi arttırmak için optimizasyon kriterleri.

Faktör	Amaç
Melas miktarı (%)	In range
Soya unu miktarı (%)	In range
CaCl_2 miktarı (%)	Minimize
Yanıt	Amaç
Canlı hücre sayısı	Maximize
Yüzde büyüme inhibisyon değeri	Maximize

Bu optimizasyon kriterlerine göre canlı hücre sayısını ve antifungal etkiyi maksimize edecek şekilde melas ve soya unu incelenen aralıkta bırakılıp CaCl_2 miktarı minimize edildiğinde elde edilen sayısal optimizasyon sonuçları Şekil 4.38’deki gibi elde edilmiştir.

İstenilirlik derecesi (“*desirability*”) 0,807 olan 1. çözüm önerisi seçilmiştir. Bu durumda, optimum değerler olarak melas için %0,1, soya unu için %10,0 ve CaCl_2 için ise %0,5 belirlenmiştir.

Constraints

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
Melas	is in range	0.1	1	1	1	3
Soya unu	is in range	1	10	1	1	3
Cacl2	minimize	0.5	1	1	1	3
Canlı Hücre Sayı	maximize	8.08081	9.5092	1	1	3
Büyüme inhibisyonu	maximize	2.24719	19.1011	1	1	3

Number	Melas	Soya unu	Cacl2	Canlı Hücre Sayı	Büyüme inhibisyonu	Desirability	
1	0.10	10.00	0.50	8.83104	19.0975	0.807	Selected
2	0.10	9.85	0.50	8.84656	18.6959	0.806	
3	0.11	10.00	0.50	8.82599	19.0828	0.805	
4	0.10	9.64	0.50	8.86877	18.1324	0.804	
5	0.10	9.49	0.50	8.88432	17.7417	0.803	
6	0.10	10.00	0.51	8.83017	18.7851	0.798	
7	0.10	9.96	0.51	8.83327	18.4957	0.793	
8	0.25	10.00	0.50	8.69159	18.725	0.748	
9	0.10	6.22	0.50	9.22392	11.0164	0.747	
10	0.10	5.37	0.50	9.31177	9.80527	0.728	
11	0.10	5.29	0.50	9.3206	9.69562	0.727	
12	0.34	7.51	0.50	8.86732	13.0209	0.706	
13	0.38	1.01	0.50	9.5092	7.70653	0.687	
14	0.37	1.07	0.50	9.50918	7.68347	0.686	
15	0.34	1.31	0.50	9.50921	7.5899	0.682	
16	0.30	1.69	0.50	9.50919	7.49445	0.678	
17	0.28	1.87	0.50	9.50919	7.47184	0.677	
18	0.61	1.00	0.50	9.29436	8.29039	0.673	
19	0.61	1.00	0.50	9.2898	8.30264	0.672	
20	0.62	1.00	0.50	9.28584	8.31327	0.672	
21	0.45	10.00	0.50	8.51019	18.2389	0.658	
22	1.00	1.08	0.50	8.92194	9.22615	0.625	
23	0.10	10.00	0.66	8.80746	11.9129	0.582	

Şekil 4.38. Canlı hücre sayısını ve yüzde büyüme inhibisyon değerini maksimize etmeye yönelik sayısal optimizasyon sonuçları.

Bacillus türleri kullanılarak gerçekleştirilen biyokütle ve lipopeptid üretiminin optimizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar Çizelge 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4.25. *Bacillus* türleri kullanılarak RSM ile gerçekleştirilen üretim ortamı optimizasyonu çalışmaları.

Mikroorganizma	Çalışmanın amacı	Deneysel tasarım	Optimize edilen faktörler	Optimum yanıtlar	Referans
<i>Bacillus subtilis</i>	Biyokütle üretimi	CCD	pH 6,72; %0,164 amonyum sitrat; %0,85 pepton	1 x 10 ¹⁰ kob/ml	Stamenkovic Stojanovic et al., 2019
<i>Bacillus coagulans</i>	Biyokütle üretimi	BBD	30 g/L soya unu; 6 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 6 g/L MgSO ₄	9,9 x 10 ⁸ kob/ml	Stamenkovic Stojanovic et al., 2019
<i>Bacillus subtilis</i>	Spor üretimi	CCD	16,18 g/L mısır ıslatma sıvısı; 17,53 g/L soya unu; 8,14 g/L maya ekstraktı	1,52 x 10 ¹⁰ spor/ml	Stamenkovic Stojanovic et al., 2019
<i>Bacillus subtilis</i>	Biyokütle üretimi	CCD	13 g/L soya peptone; 0,05 g/L CaCl ₂	3,033 g/L (CDW)	Stamenkovic Stojanovic et al., 2019
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipopeptid üretimi	CCD	%1,11 glikoz; %0,7 mısır ıslatma katısı	132,23 mg/L	Stamenkovic Stojanovic et al., 2019
<i>Bacillus sp.</i> BH072	İturin üretimi	CCD	%0,98 sakkaroz; %0,94 soya unu; %0,93 Mg ⁺²	52,21 mg/ml	Stamenkovic Stojanovic et al., 2019
<i>Bacillus subtilis</i>	İturin üretimi	CCD	0,998 g/L glikoz; 1,83 g/L soya unu	5,591 mg/kg iturin	Stamenkovic Stojanovic et al., 2019
<i>Bacillus natto</i> NT-6	Lipopeptid üretimi	-	10 g/L glikoz; 5 g/L L- monosodyum glutamat	563,20 mg/L	Petrila et al., 2020
<i>Bacillus subtilis</i> SPB1	Lipopeptid üretimi	-	40 g/L glikoz; 5 g/L üre	720 mg/L	Petrila et al., 2020

Çizelge 4.25. (devam)

Mikroorganizma	Çalışmanın amacı	Deneysel tasarım	Optimize edilen faktörler	Optimum yanıtlar	Referans
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> C2LP	Lipopeptid üretimi	-	7,97 g/L; 16,02 g/L L-sodyum glutamat	99,73 mg/L	Petrila et al., 2020
<i>Bacillus subtilis</i> MZ-7	Lipopeptid üretimi	-	2 g/L sakkaroz; 3 g/L maya ekstraktı	280 mg/L	Petrila et al., 2020
<i>Bacillus velezensis</i> 4-Ka-22	Biyokütle üretimi	BBD	%0,1 melas; %1 soya unu; %0,5 CaCl ₂	1,62 x 10 ⁹ kob/ml	Bu çalışmada

4.10.4. Besiyeri tasarımı için validasyon

Besiyeri bileşeni olarak melas, soya unu ve CaCl₂ kullanılarak iki farklı yanıt olan canlı hücre sayısını (1.besiyeri) ve yüzde büyüme inhibisyon değerini (2.besiyeri) ayrı ayrı arttırmaya yönelik olarak ve her iki yanıtı aynı besiyeri (3.besiyeri) ile arttırmaya yönelik olarak optimize edilen besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilen üretimler sonucu elde edilen veriler ve programdan elde edilen tahmini yanıtlar Çizelge 4.26’da gösterilmiştir.

Buna göre, elde edilen verilerin geliştirilen model ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Öncelikli hedef yüksek canlı hücre sayısı üretebilmek olduğu için canlı hücre sayısını arttırmaya yönelik olarak tasarlanan Besiyeri 1 sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

Çizelge 4.26. RSM ile incelenen yanıtlar için elde edilen sonuçların modelden elde edilen tahmini yanıtlarla karşılaştırılması.

Farklı besiyerinde incelenen yanıtlar		%95 CI low	%95 CI high	Elde edilen sonuç
Besiyeri 1	Canlı hücre sayısı (log; kob/ml)	7,77	8,39	9,20 (1,62x10 ⁹)
	Yüzde büyüme inhibisyonu	13,88	20,29	16,45
Besiyeri 2	Canlı hücre sayısı (log; kob/ml)	7,77	8,39	8,39 (2,49x10 ⁸)
	Yüzde büyüme inhibisyonu	13,88	20,29	15,87
Besiyeri 3	Canlı hücre sayısı (log; kob/ml)	8,5	9,16	8,18 (1,52x10 ⁸)
	Yüzde büyüme inhibisyonu	15,5	22,69	19,48

4.10.5. Besiyerine gliserol eklenmesinin canlı hücre sayısına ve antifungal etkiye olan etkisinin incelenmesi

Canlı hücre sayısını arttırmaya yönelik olarak tasarlanan ve %0,1 melas, %1 soya unu ve %0,5 CaCl₂ bileşenlerinden oluşan besiyeri içerisine %1, %2, %5 ve %10 oranında gliserol eklenerek 30°C gerçekleştirilen inkübasyon sonucunda alınan örneklerden elde edilen canlı hücre sayısı ve yüzde büyüme inhibisyon değeri sonucu Çizelge 4.27’de verilmiştir.

Çizelge 4.27. Canlı hücre sayısı ve antifungal etki üzerinde gliserolün farklı oranlarının etkisi.

Gliserol Oranları	Canlı Hücre Sayısı ± SS* (x10 ⁹ kob/ml)	Yüzde Büyüme İnhibisyon Değeri±SS*
%1	2,89±0,23 ^a	8,37±1,13 ^a
%2	2,47±0 ^{ab}	6,67±0,56 ^{ab}
%5	2,38±0,24 ^b	4,97±0 ^b
%10	1,83±0,18 ^c	4,41±1,69 ^b
Gliserolsüz	1,49±0,05 ^c	3,84±1,13 ^b

Aynı harfle gösterilen sütun içindeki ortalamalar, Tukey Testi’ne göre önemli ölçüde farklı değildir (P<0,05).

*SS: Standart sapma

Çalışmamızda üretim ortamına eklenen gliserol oranı arttıkça canlı hücre sayısı ve yüzde büyüme inhibisyon değeri düşmektedir. En yüksek sonuçlar %1 gliserol eklenen üretim ortamında elde edilmiştir. Optimize edilen üretim ortamına %1 gliserol eklenmesi sonucu canlı hücre sayısında 1,9 kat, yüzde büyüme inhibisyon değerinde ise 2,2 kat artış gerçekleşmiştir.

Benzer şekilde, *B.subtilis* #309 suşu kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, sabun kaynaklı atık gliserol kullanıldığında hem yüksek biyokütle konsantrasyonu hem de yüksek sürfaktin üretimi gözlemlenmiştir (Janek et al., 2021). Santhosh (2015) tarafından *B.megaterium* ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada Pikovskaya besiyerine hücre koruyucu olarak %0,5 oranında gliserol eklenmesi sonucu canlı hücre sayısında artış görülmüştür. Ayrıca, farklı bileşenler içeren formülasyonlar arasından kontrol besiyerinde canlı hücre sayısı 180 gün sonunda sıfırlanırken %0,5 oranında gliserol içeren formülasyonda $1,79 \times 10^{10}$ kob/ml'den $4,9 \times 10^9$ kob/ml'ye düşmüştür.

4.11. *Bacillus velezensis* 4-Ka-22 Suşu için Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu

4.11.1. *Bacillus velezensis* 4-Ka-22 suşu için sıcaklık optimizasyonu

RSM ile optimize edilen üretim ortamı (%0,1 melas, %1 soya unu ve %0,5 CaCl_2) kullanılarak altı farklı sıcaklıkta inkübe edilen *B.velezensis* 4-Ka-22 suşu için her sıcaklıkta elde edilen canlı hücre sayısı ve yüzde büyüme inhibisyon değerleri Çizelge 4.28'de verilmiştir.

Çizelge 4.28. Canlı hücre sayısı ve antifungal etki üzerinde farklı sıcaklıkların etkisi.

Sıcaklık	Canlı hücre sayısı $\pm$ SS* ($\times 10^8$ kob/ml)	Büyüme inhibisyon değeri $\pm$ SS (%)
24°C	16,5 $\pm$ 4,25 ^{abc}	3,8 $\pm$ 0 ^a
27°C	21,4 $\pm$ 6,95 ^{ab}	4,9 $\pm$ 2,3 ^a
30°C	25,0 $\pm$ 1,67 ^a	5,3 $\pm$ 0,6 ^a
33°C	22,3 $\pm$ 5,07 ^{ab}	6,3 $\pm$ 0,8 ^a
36°C	13,2 $\pm$ 2,6 ^{bc}	9,6 $\pm$ 5,1 ^a
40°C	5,29 $\pm$ 2,66 ^c	8,8 $\pm$ 3,0 ^a

Aynı harfle gösterilen sütun içindeki ortalamalar, Tukey Testi'ne göre önemli ölçüde farklı değildir (P<0,05).

*SS: Standart sapma

Sıcaklık 30°C'nin altına indiğinde ya da üstüne çıktığında canlı hücre sayısı düşüş göstermektedir. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ise, 36°C'ye kadar artış gösterirken 40°C'de düşmüştür. En yüksek canlı hücre sayısı 30°C'de elde edilirken, en yüksek yüzde büyüme inhibisyon değeri ise 36°C'de elde edilmiştir. Ancak yüzde büyüme inhibisyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması sebebiyle en yüksek canlı hücre sayısının elde edildiği ve daha düşük enerji maliyeti gerektiren 30°C üretim sıcaklığı olarak seçilmiştir.

Benzer şekilde, *Bacillus aryabhatai* ZDY2 suşu kullanılarak gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise, 25, 30, 35 ve 40°C'de üretim gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre biyosüpfektan üretiminin sıcaklık arttıkça arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, 45°C'nin üstünde suşun büyümesi engellenmiştir ve düşük biyosüpfektan verimi elde edilmiştir (Yaraguppi et al., 2020).

Bacillus türleri kullanılarak gerçekleştirilen literatürdeki benzer çalışmalar incelendiğinde, canlı hücre sayısı ve lipopeptid üretimi için en yüksek değerlerin 30°C'de elde edildiği görülmüştür. Meena et al., (2020) tarafından, *Bacillus subtilis* KLP2015 suşu kullanılarak lipopeptid üretimi için bir seferde tek faktör tekniği kullanılarak gerçekleştirilen sıcaklık optimizasyonunda 25, 30, 35, 37, 40, 45 ve 50°C gibi 7 farklı sıcaklıkta üretim gerçekleştirilmiştir ve hem canlı hücre sayısı hem de lipopeptid üretimi takip edilmiştir. Her iki faktör için de optimum sıcaklık 30°C olarak belirlenmiştir. Canlı hücre sayısı bakımından keskin düşüş 45°C'de görülürken, lipopeptid üretimi için ise 40°C'de görülmüştür. Benzer şekilde, çalışmamızda incelenen *B.velezensis* 4-Ka-22 suşu için canlı hücre sayısı ve antifungal etki bakımından keskin düşüşler görülmemekle birlikte, canlı hücre sayısı için 33°C'de düşüş başlarken lipopeptid üretimi için de 36°C'de düşüş başlamıştır. *Bacillus mojavensis* A21 tarafından biyosüpfektan üretimine 25, 30 ve 45°C gibi 3 farklı sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Biyosüpfektan üretiminin optimum olarak 30°C'de gerçekleştiği görülmüştür. Ayrıca, biyosüpfektan üretimi 45°C'de 30°C'ye göre %40 daha düşük olarak elde edilmiştir (Ayed et al., 2019). Zhao et al. (2014) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada da *Bacillus sp.* BH072 izolatının iturin A üretimi üzerinde sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 10, 20, 30, 40 ve 50°C'de üretim gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde maksimum iturin A konsantrasyonu 30°C'de elde edilmiştir.

Yapılan pek çok çalışmaya göre *B.subtilis* türü 25-37°C aralığında antifungal metabolitler üretebilmektedir. *B.subtilis* BBG208 suşu için en yüksek fengisin verimi 30°C’de elde edilmiştir. Sıcaklık 25°C’ye ve 35°C’ye doğru kaydıka fengisin sentezi azalmıştır. Bununla birlikte, *B.subtilis* MS21 suşunun büyümesi için optimum sıcaklık 35°C’dir. *Rhizoctonia solani*’ye karşı antagonistik aktiviteye sahip dört *B.subtilis* suşu, 15 ila 37°C aralığındaki sıcaklıklarda büyüebilmektedirler. Ancak maksimum hücre sayısı 22°C’de elde edilmiştir. Bu fark, suşların farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, her yeni suş için, çalışmaya uygun özgün büyüme koşullarının belirlenmesi gerekmektedir (Sidorova et al., 2020).

Optimize edilen üretim ortamına %1 gliserol eklenmesinin dört farklı sıcaklıktaki canlı hücre sayısı ve antifungal etki üzerindeki etkisi Çizelge 4.29’da verilmiştir.

Çizelge 4.29. Canlı hücre sayısı ve antifungal aktivite üzerinde %1 gliserolün farklı sıcaklıklardaki etkisi.

Sıcaklık	Canlı hücre sayısı $\pm$ SS* (x10 ⁹ kob/ml)	Büyüme inhibisyon değeri $\pm$ SS (%)
30°C	2,89 $\pm$ 0,23 ^a	8,37 $\pm$ 1,13 ^a
33°C	2,58 $\pm$ 0,43 ^a	10,9 $\pm$ 1,72 ^a
36°C	1,49 $\pm$ 0,06 ^b	7,74 $\pm$ 1,21 ^a
40°C	1,07 $\pm$ 0,35 ^b	7,03 $\pm$ 1,21 ^a

Aynı harfle gösterilen sütun içindeki ortalamalar, Tukey Testi’ne göre önemli ölçüde farklı değildir (P<0,05).

*SS: Standart sapma

Gliserol içeren üretim ortamında en yüksek canlı hücre sayısı 30°C’de elde edilirken, en yüksek yüzde büyüme inhibisyon değeri ise 33°C’de elde edilmiştir. Ancak, yüzde büyüme inhibisyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması sebebiyle gliserollü üretim ortamında en yüksek canlı hücre sayısının elde edildiği ve daha düşük enerji maliyeti gerektiren 30°C üretim sıcaklığı olarak seçilmiştir. Ayrıca, üretim ortamına gliserol eklenmesi sonucu hem canlı hücre sayısında hem de yüzde büyüme inhibisyon değerinde yaklaşık 2 kat artış gözlenmiştir.

Gliserol, bakteri hücrelerinin abiyotik stress faktörlerine karşı direnç göstermesini sağlayan koruyucu bir hücre ajanı olarak bilinen ekonomik bir polioldür (Lobo et al., 2019). Çalışmamızda gliserol içermeyen üretim ortamında canlı hücre sayısı 40°C’de logaritmik olarak düşüş gösterirken gliserol içeren üretim ortamında incelenen sıcaklıklarda canlı hücre sayısında logaritmik olarak bir fark görülmemiştir. Bu durumun gliserol varlığının hücrelerin olumsuz koşullara olan direncini arttırmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Antifungal etki sıcaklık arttıkça artış göstermekle birlikte gliserol içermeyen üretim ortamında 40°C’de, gliserol içeren üretim ortamında ise 36°C’de düşmüştür.

4.11.2. *Bacillus velezensis* 4-Ka-22 suşu için üretim parametrelerinin RSM ile optimizasyonu

Bacillus velezensis 4-Ka-22 suşunun yüksek biyokütle miktarı ve antifungal etki elde edilecek şekilde sıvı kültür fermentasyon yöntemi ile üretiminde RSM ile optimize edilecek bağımsız değişkenler olarak çalkalayıcı hızı (rpm), pH ve inokülasyon oranı (%) gibi üretim parametreleri seçilmiştir. Yanıt olarak ise, canlı hücre sayısı (kob/ml) ve antifungal etki (yüzde büyüme inhibisyon değeri) belirlenmiştir.

RSM analizi için Box-Behnken deney tasarımının kullanılması uygun bulunmuştur. Deney tasarımına göre yapılan denemelerden elde edilen canlı hücre sayısı ve antifungal etki ile ilgili yanıtlar Çizelge 4.30’da verilmiştir.

Çizelge 4.30. Box-Behnken deney seti ve incelenen yanıtlar için elde edilen deneysel ve tahmini sonuçlar.

No	Çalkalayıcı Hızı (rpm)	pH	İnokulasyon Oranı (%)	Canlı Hücre Sayısı (log(kob/ml))		Büyüme İnhibisyon Değeri (%)	
				Deneysel	Tahmini	Deneysel	Tahmini
1	150	5,0	3,0	9,04	9,06	5,56	6,39
2	210	5,0	3,0	9,16	9,13	12,22	11,11
3	150	9,0	3,0	9,07	9,10	3,33	4,44
4	210	9,0	3,0	8,91	8,89	3,33	2,5
5	150	7,0	1,0	8,85	8,73	11,11	9,58
6	210	7,0	1,0	8,77	8,71	7,78	8,19
7	150	7,0	5,0	9,11	9,18	3,33	2,92
8	210	7,0	5,0	8,94	9,06	5,56	7,08
9	180	5,0	1,0	8,81	8,91	11,11	11,81
10	180	9,0	1,0	8,65	8,74	5,56	5,97
11	180	5,0	5,0	9,33	9,24	7,78	7,36
12	180	9,0	5,0	9,31	9,21	3,33	2,64
13	180	7,0	3,0	9,27	9,22	7,78	10,22
14	180	7,0	3,0	9,17	9,22	12,22	10,22
15	180	7,0	3,0	9,28	9,22	12,22	10,22
16	180	7,0	3,0	9,11	9,22	8,89	10,22
17	180	7,0	3,0	9,26	9,22	10,0	10,22

Yüksek canlı hücre sayısı elde etmek amacıyla gerçekleştirilen üretim parametreleri optimizasyonu için elde edilen modelin uygunluğu varyans analizi (ANOVA) kullanılarak incelenmiştir ve sonuçlar Şekil 4.39’da gösterilmiştir. F değerinin 4,74 olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Şekil 4.39’da gösterilen sonuçlara göre inokulasyon oranı (C), A^2 ve C^2 canlı hücre sayısını arttırmak için anlamlı olarak bulunmuştur. Ayrıca 4,52 olan uyumsuzluk F değeri (“*Lack of Fit F-value*”), bu uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir. R^2 değeri 0,8591 olarak elde edilmiştir ve bu değer modelin canlı hücre sayısını arttırmak için %85,91 uygun olduğunu ifade etmektedir. Bu sonuçlar, seçilen modelin canlı hücre sayısını arttırmak için seçilen değişkenlerin ikinci dereceden etkilerini tatmin edici bir şekilde açıklayabildiğini göstermektedir.

Varyans Analizi (ANOVA):

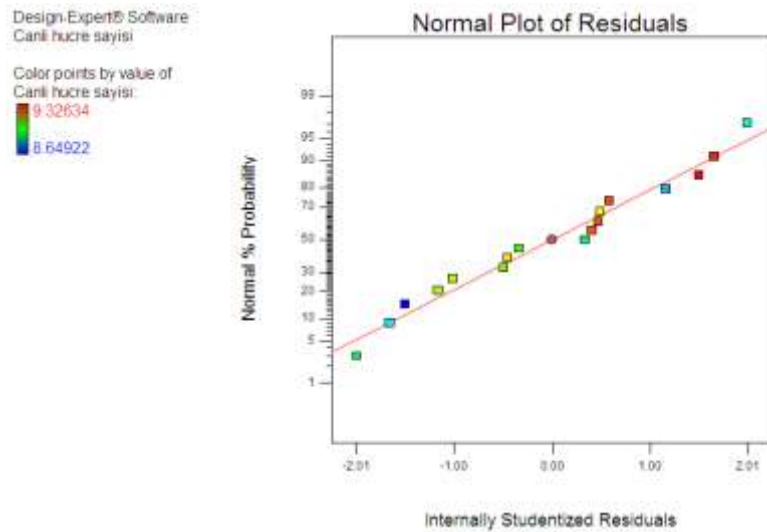
Response	1	Canlı hücre sayısı				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	0.59	9	0.066	4.74	0.0262	significant
A-rpm	9.825E-003	1	9.825E-003	0.71	0.4281	
B-pH	0.020	1	0.020	1.40	0.2747	
C-inokulasyon c	0.32	1	0.32	23.09	0.0020	
AB	0.018	1	0.018	1.31	0.2906	
AC	2.094E-003	1	2.094E-003	0.15	0.7093	
BC	5.006E-003	1	5.006E-003	0.36	0.5672	
A ²	0.084	1	0.084	6.04	0.0437	
B ²	5.431E-003	1	5.431E-003	0.39	0.5516	
C ²	0.11	1	0.11	7.99	0.0255	
Residual	0.097	7	0.014			
Lack of Fit	0.075	3	0.025	4.52	0.0895	not significant
Pure Error	0.022	4	5.533E-003			
Cor Total	0.69	16				

Şekil 4.39. Canlı hücre sayısına ait ikinci derece model için Design Expert programı ANOVA çıktısı.

Regresyon analizi sonucunda, canlı hücre sayısını arttıran (Y) bağımsız değişkenler olan çalkalayıcı hızı (rpm) (A), pH (B) ve inokülasyon oranı (C) cinsinden belirlenen denklem aşağıda verilmiştir:

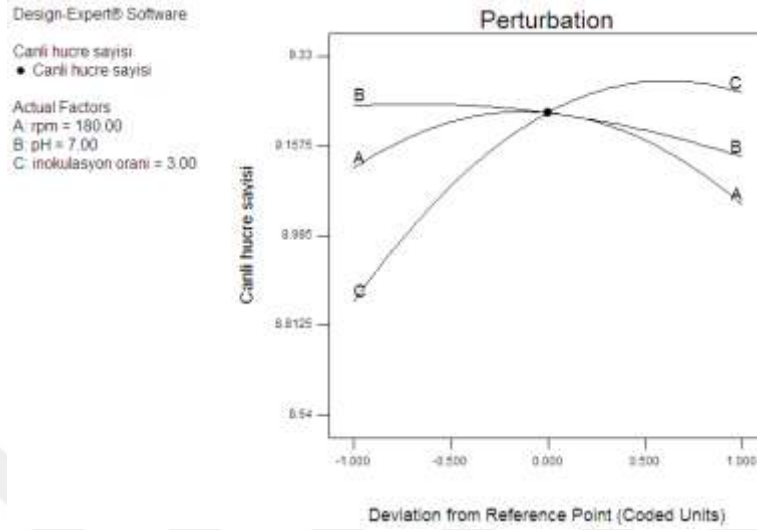
$$\text{Canlı Hücre Sayısı (Y)} = 9,22 - 0,035 \times A - 0,049 \times B + 0,20 \times C - 0,067 \times A \times B - 0,023 \times A \times C + 0,035 \times B \times C - 0,14 \times A^2 - 0,036 \times B^2 - 0,16 \times C^2$$

Şekil 4.40 bu sete ilişkin hata dağılım grafiğini göstermektedir. Hata dağılım grafiğindeki ufak sapmalar göz ardı edilebilecek boyuttadır ve hata dağılım grafiği modelin uygunluğunu desteklemektedir.



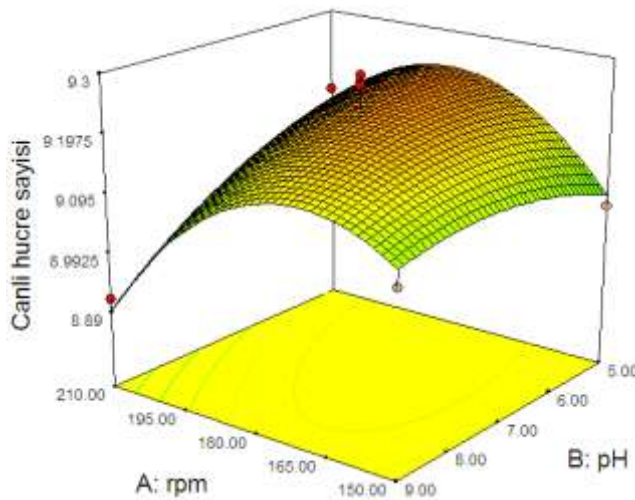
Şekil 4.40. Canlı hücre sayısını için hata dağılım grafiği.

Çalkalayıcı hızı (rpm), pH ve inokülasyon oranı değişkenlerinin canlı hücre sayısı üzerindeki etkilerini gösteren pertürbasyon grafiği Şekil 4.41’de verilmiştir.

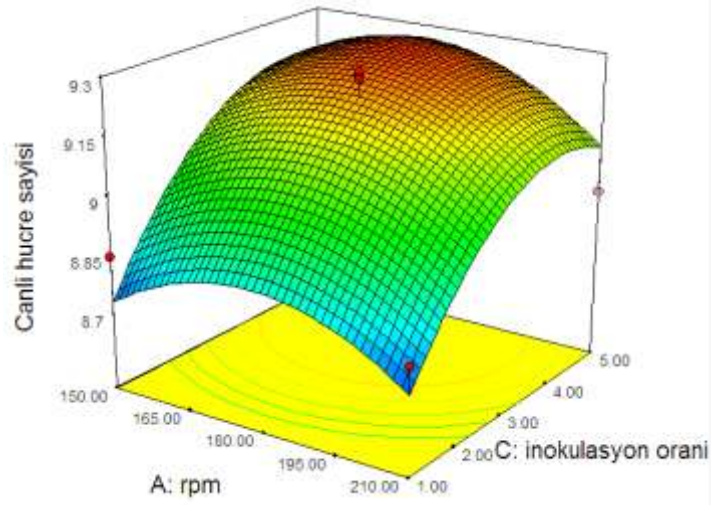


Şekil 4.41. Canlı hücre sayısı için pertürbasyon grafiği (A: Çalkalayıcı hızı (rpm), B: pH, C: inokülasyon oranı).

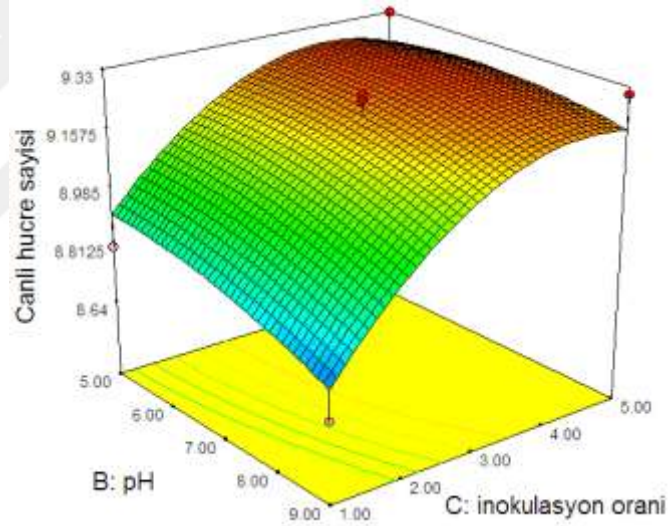
Pertürbasyon grafiğinden açıkça görülebildiği üzere, çalkalayıcı hızı (rpm) azaldıkça ve arttıkça canlı hücre sayısında düşüş gerçekleşmektedir. pH değeri azaldıkça ve inokülasyon oranı arttıkça canlı hücre sayısı artmaktadır. İnokülasyon oranı değişkeninin ilgili yanıt üzerindeki etkisinin diğer değişkenlere oranla oldukça fazla olduğu görülmektedir. Eğrilerin kesiştiği nokta referans noktasıdır ve bu grafik için merkez noktaları ifade etmektedir. RSM ile elde edilen regresyon eşitliğine ait 3D yanıt yüzeyi grafikleri Şekil 4.42-4.44’te gösterilmiştir.



Şekil 4.42. Canlı hücre sayısı ile çalkalayıcı hızı (rpm) ve pH değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.43. Canlı hücre sayısı ile çalkalayıcı hızı (rpm) ve inokülasyon oranı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.44. Canlı hücre sayısı ile pH ve inokülasyon oranı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar doğrultusunda üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri ve pertürbasyon grafiği incelendiğinde her üç bağımsız değişken için de deney tasarımı sırasında optimum değer aralıklarının kullanıldığı görülmektedir. Sonuç olarak *B.velezensis* 4-Ka-22 suşu ile gerçekleştirilecek üretim sonucu elde edilecek canlı hücre sayısı üzerinde inokülasyon oranının etkisinin daha fazla olduğu açıkça görülmektedir.

Yüksek yüzde büyüme inhibisyon değeri elde etmek amacıyla gerçekleştirilen üretim parametreleri optimizasyonu için elde edilen modelin uygunluğu varyans analizi (ANOVA) kullanılarak incelenmiştir ve sonuçlar Şekil 4.45'te gösterilmiştir. F değerinin 4,65 olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Şekil 4.45'te gösterilen sonuçlara göre pH (B) ve inokülasyon oranı (C) yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmak için anlamlı olarak bulunmuştur. Ayrıca 0,86 olan uyumsuzluk F değeri ("*Lack of Fit F-value*"), bu uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir. R^2 değeri 0,8567 olarak elde edilmiştir ve bu değer modelin yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmak için %85,67 uygun olduğunu ifade etmektedir. Bu sonuçlar, seçilen modelin yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmak için seçilen değişkenlerin ikinci dereceden etkilerini tatmin edici bir şekilde açıklayabildiğini göstermektedir.

Varyans Analizi (ANOVA):

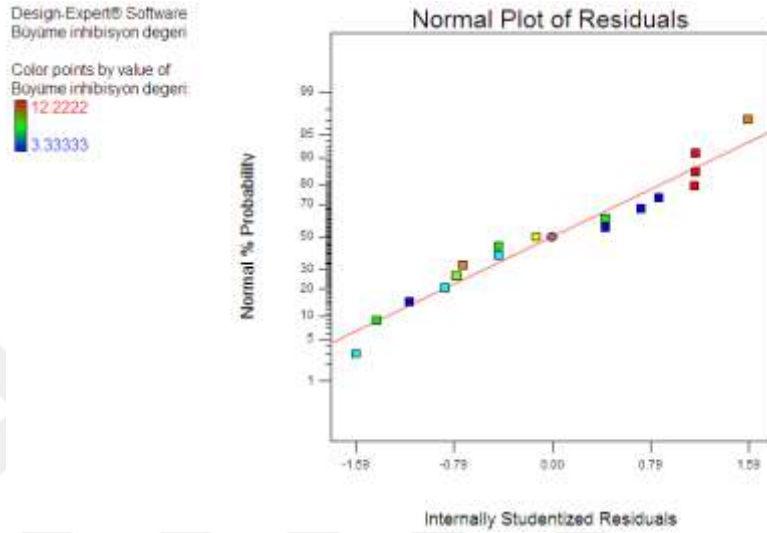
Response	2	Büyüme inhibisyon değeri				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	155.42	9	17.27	4.65	0.0275	significant
A-rpm	3.86	1	3.86	1.04	0.3419	
B-pH	55.71	1	55.71	15.01	0.0061	
C-inokulasyon c	30.25	1	30.25	8.15	0.0245	
AB	11.11	1	11.11	2.99	0.1273	
AC	7.72	1	7.72	2.08	0.1926	
BC	0.31	1	0.31	0.083	0.7814	
A ²	17.79	1	17.79	4.79	0.0648	
B ²	17.79	1	17.79	4.79	0.0648	
C ²	6.29	1	6.29	1.69	0.2342	
Residual	25.99	7	3.71			
Lack of Fit	10.19	3	3.40	0.86	0.5308	not significant
Pure Error	15.80	4	3.95			
Cor Total	181.41	16				

Şekil 4.45. Yüzde büyüme inhibisyon değerine ait ikinci derece model için Design Expert programı ANOVA çıktısı.

Regresyon analizi sonucunda, yüzde büyüme inhibisyon değerini arttıran (Y) bağımsız değişkenler olan çalkalayıcı hızı (rpm) (A), pH (B) ve inokülasyon oranı (C) cinsinden belirlenen denklem aşağıda verilmiştir:

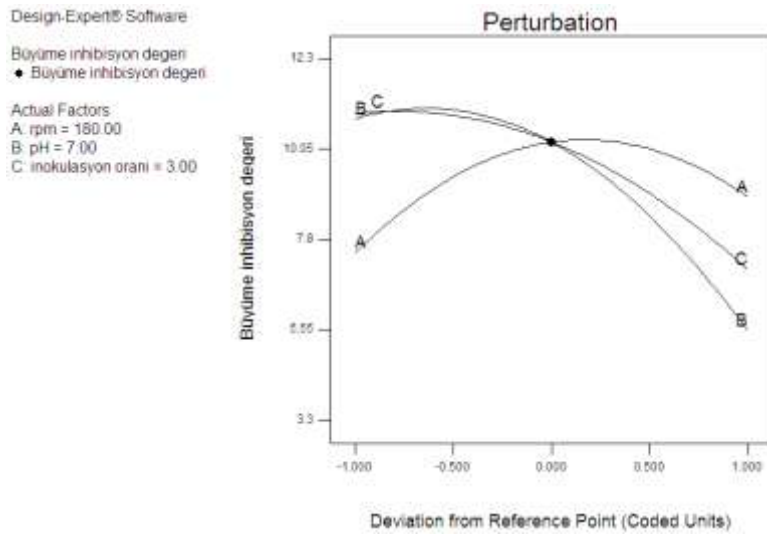
Yüzde Büyüme İnhibisyon Değeri (Y) = $10,22+0,69xA-2,64xB-1,94xC-1,67xAxB+1,39xAxC+0,28xBxC-2,06xA^2-2,06xB^2-1,22xC^2$

Şekil 4.46 bu sete ilişkin hata dağılım grafiğini göstermektedir. Hata dağılım grafiğindeki ufak sapmalar göz ardı edilebilecek boyuttur ve hata dağılım grafiği modelin uygunluğunu desteklemektedir.



Şekil 4.46. Yüzde büyüme inhibisyon değeri için hata dağılım grafiği.

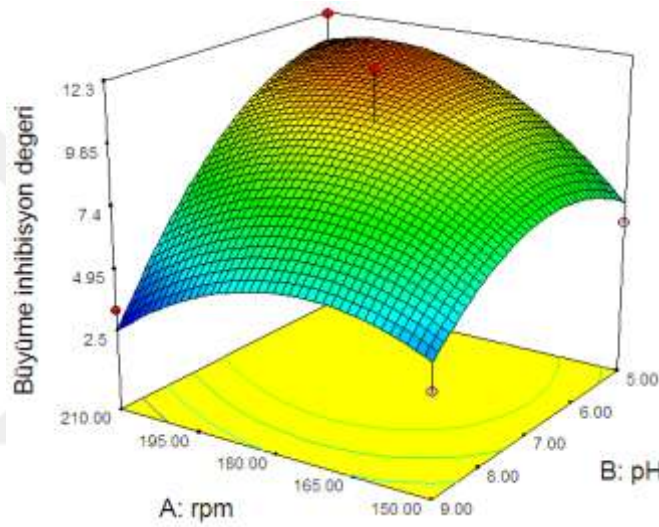
Çalkalayıcı hızı (rpm), pH ve inokülasyon oranı (%) değişkenlerinin yüzde büyüme inhibisyon değeri üzerindeki etkilerini gösteren pertürbasyon grafiği Şekil 4.47’de verilmiştir.



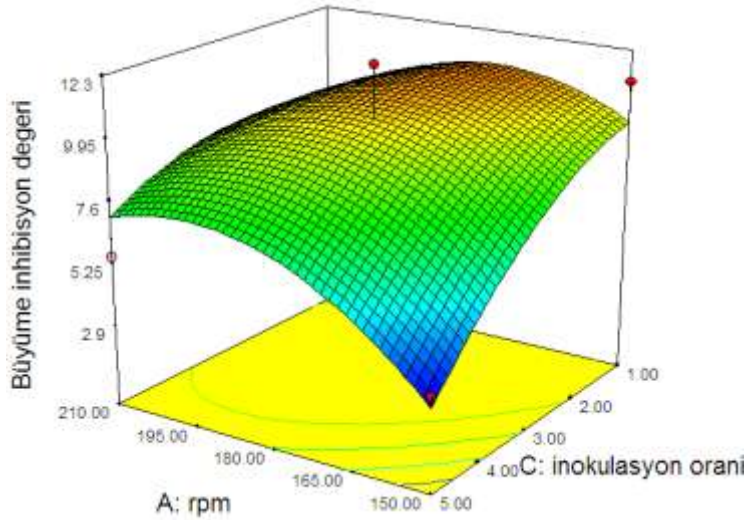
Şekil 4.47. Yüzde büyüme inhibisyon değeri için pertürbasyon grafiği (A: Çalkalayıcı hızı (rpm), B: pH, C: inokülasyon oranı).

Pertürbasyon grafiğinden açıkça görülebildiği üzere, çalkalayıcı hızı (rpm) azaldıkça ve arttıkça yüzde büyüme inhibisyon değerinde düşüş gerçekleşmektedir. pH değeri ve inokülasyon oranı azaldıkça yüzde büyüme inhibisyon değeri artmaktadır. pH değeri ve inokülasyon oranı değişkenlerinin ilgili yanıt üzerindeki etkisinin çalkalayıcı hızına oranla oldukça fazla olduğu görülmektedir. Eğrilerin kesiştiği nokta referans noktasıdır ve bu grafik için merkez noktaları ifade etmektedir.

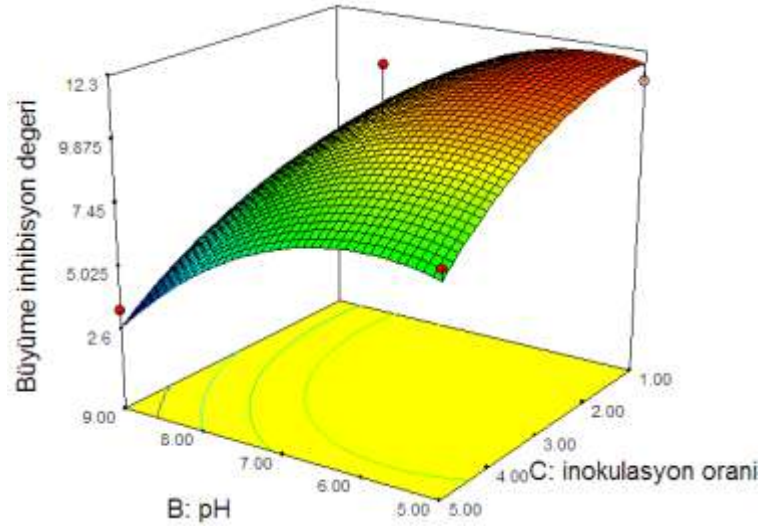
RSM ile elde edilen regresyon eşitliğine ait 3D yanıt yüzeyi grafikleri Şekil 4.48-4.50’de gösterilmiştir.



Şekil 4.48. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ile çalkalayıcı hızı (rpm) ve pH değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.49. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ile çalkalayıcı hızı (rpm) ve inokülasyon oranı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.50. Yüzde büyüme inhibisyon değeri ile pH ve inokülasyon oranı değişkenlerini ilişkilendiren üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar doğrultusunda üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri ve pertürbasyon grafiği incelendiğinde her üç bağımsız değişken için de deney tasarımı sırasında optimum değer aralıklarının kullanıldığı görülmektedir. Sonuç olarak *B.velezensis* 4-Ka-22 suşu ile gerçekleştirilecek üretim sonucu elde edilecek yüzde büyüme inhibisyon değeri üzerinde pH ve inokülasyon oranının etkisinin daha fazla olduğu açıkça görülmektedir.

Nümerik Optimizasyon:

Canlı hücre sayısını arttırmaya yönelik olarak optimize edilmek için belirlenen kriterler ve optimize edilmek istenen yanıtlar Çizelge 4.31’de gösterilmiştir. Öncelikli amaç canlı hücre sayısını arttırmak olduğu için ilgili faktörler için seçilen kriterler ona göre belirlenmiştir.

Çizelge 4.31. Yüzde büyüme inhibisyon değerini arttırmak için numerik optimizasyon kriterleri.

Faktör	Amaç
Çalkalayıcı hızı (rpm)	In range
pH	Minimize
İnokulasyon oranı (%)	Maximize
Yanıt	Amaç
Canlı hücre sayısı	Maximize
Yüzde büyüme inhibisyon değeri	Maximize

Bu optimizasyon kriterlerine göre canlı hücre sayısını maksimize edecek şekilde çalkalayıcı hızı (rpm) in range olarak alınıp pH değeri minimize edilirken inokülasyon oranı maksimize edildiğinde elde edilen sayısal optimizasyon sonuçları Şekil 4.51’de gösterilmiştir.

Constraints						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
rpm	is in range	150	210	1	1	3
pH	minimize	5	9	1	1	3
inokülasyon oranı	maximize	1	5	1	1	3
Canlı hücre sayı	maximize	8.64922	9.32634	1	1	3
Büyüme inhibisyonu	maximize	3.33333	12.2222	1	1	3

Solutions						
Number	rpm	pH	inokülasyon oranı	Canlı hücre sayı	Büyüme inhibisyonu	Desirability
1	194.54	5.00	4.35	9.24726	9.86877	0.859
2	194.65	5.00	4.33	9.24748	9.90693	0.859
3	194.27	5.00	4.36	9.24781	9.83179	0.859
4	194.10	5.00	4.35	9.24903	9.85124	0.859
5	<u>195.00</u>	<u>5.00</u>	<u>4.33</u>	<u>9.246</u>	<u>9.91721</u>	<u>0.859</u>
6	195.17	5.00	4.36	9.24427	9.87589	0.859

Şekil 4.51. Canlı hücre sayısını maksimize etmeye yönelik sayısal optimizasyon sonuçları.

İstenilirlik derecesi (“*desirability*”) arasında fark olmaması sebebiyle, hem canlı hücre sayısı hem de yüzde büyüme inhibisyon değeri için yüksek sonuç veren 5. çözüm seçilmiştir. Bu durumda, optimum değerler olarak çalkalayıcı hızı için 195 rpm, pH değeri için 5,0 ve inokülasyon oranı için ise %4,33 belirlenmiştir.

Optimizasyon öncesinde *B.velezensis* KLP2016 ile elde edilen lipopeptid miktarı 1852 mg/lt olarak belirlenmiştir. Üretim ortamının [%1 et ekstraktı ve %1 sorbitol içeren Luria Bertani besiyeri] farklı pH değerlerinin (4, 5, 6, 7, 8 ve 9) *B.velezensis* KLP2016 tarafından CLP üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir ve üretim ortamı pH değeri 7,0 olduğunda çalkalamalı erlenlerde maksimum CLP üretiminin (2506 mg/L) gerçekleştiği gösterilmiştir (Meena et al., 2018).

4.11.3. Üretim parametreleri tasarımı için validasyon

Optimize edilen besiyerinde üretim parametreleri olarak Kısım 4.11.2’de belirlenen çalkalayıcı hızı (rpm), pH ve inokülasyon oranı (%) değerleri kullanılarak üretim gerçekleştirilmiştir. İki farklı yanıt olan canlı hücre sayısı ve yüzde büyüme inhibisyon değeri için elde edilen sonuçlar ve programdan elde edilen tahmini yanıtlar Çizelge 4.32’de gösterilmiştir. Optimize edilen üretim parametrelerinin geliştirilen model ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.32. RSM ile incelenen yanıtlar için elde edilen sonuçların modelden elde edilen tahmini yanıtlarla karşılaştırılması.

İncelenen yanıtlar	%95 CI low	%95 CI high	Elde edilen sonuç
Canlı hücre sayısı (log; kob/ml)	9,04	9,45	9,51 (3,27x10 ⁹)
Yüzde büyüme inhibisyonu	6,53	13,30	8,04

Sonuç olarak, yüksek canlı hücre sayısı ile birlikte antifungal metabolitleri de içermesini sağlayacak şekilde optimize edilen üretim ortamı ve parametreleri kullanılarak gerçekleştirilen üretimler sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.33’te özetlenmiştir.

Çizelge 4.33. Optimizasyon aşamalarında elde edilen biyokütle miktarı ve yüzde büyüme inhibisyon değerleri.

	Canlı hücre sayısı±SS* (x10 ⁸ kob/ml)	Büyüme inhibisyon değeri±SS (%)
LB sıvı besiyeri (Kontrol)	2,44±0,6	13,04±2,2
Optimize edilen üretim ortamı	16,2±3,8	16,45±3,0
Optimize edilen üretim ortamı + Gliserol	28,9±2,3	8,37±1,1
Üretim parametreleri optimizasyonu sonrası	32,7±3,7	8,04±1,7

4.12. Üretim Ortamı Bileşenleri için Maliyet Hesabı

Bacillus velezensis 4-Ka-22 suşunun ekonomik bir prosesle üretim optimizasyonu amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda tasarlanan üretim ortamı için maliyet hesaplanmıştır ve ticari bir besiyeri olan LB sıvı besiyeri ile karşılaştırılmıştır. Maliyet hesabı yapılırken sadece üretim ortamını hazırlamak için gerekli olan bileşenlerin maliyeti dikkate alınmıştır. İşletme maliyetleri göz ardı edilmiştir. Her iki besiyerinden de 1 lt hazırlamak için gerekli olan maliyetler Çizelge 4.34'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.34. Ticari LB sıvı besiyeri ve optimize edilen üretim ortamından 1 lt hazırlamak amacıyla gerekli bileşenler için maliyet hesabı.

	LB Besiyeri	Optimize Edilen Üretim Ortamı			
		Melas	Soya unu	CaCl ₂	Gliserol
Birim fiyat	3500 ₺/kg	20 ₺/kg	56 ₺/kg	23,5 ₺/kg	80 ₺/lt
1 lt için gerekli miktar	20 g	1 g	10 g	6,6 g	10 ml
1 lt üretim ortamı için gerekli maliyet	70 ₺	0,02 ₺	0,56 ₺	0,15 ₺	0,8 ₺
		≈ 1,5 ₺			

Ticari olarak piyasada mevcut olan biyolojik mücadele preparatları genellikle 10^7 kob/ml canlı hücre sayısı içermektedir. Çalışmamızda LB sıvı besiyeri ($2,44 \times 10^8$ kob/ml) ve optimize edilen üretim ortamında ($3,27 \times 10^9$ kob/ml) elde edilen canlı hücre sayıları da göz önüne alındığında 100 lt 10^7 kob/ml canlı hücre sayısı içeren biyolojik mücadele preparatının elde edilebilmesi için gerekli olan maliyetler LB sıvı besiyeri için 700 ₺ olarak belirlenirken optimize edilen üretim ortamı için 1,5 ₺ olarak belirlenmiştir. Böylece, optimize edilen üretim ortamı ile *Bacillus* biyokütle üretiminin gerçekleştirilebileceği 467 kat daha ekonomik bir üretim ortamı tasarlanmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bacillus spp. toprakların çoğunda baskın olarak bulunan toprak bakterilerinden biridir ve bitkilere çok çeşitli faydalı etki gösterebilme yetenekleriyle bilinmektedir. Genetik ve metabolik çeşitlilikleri nedeniyle *Bacillus spp.* çok çeşitli çevresel koşullara iyi adapte olmuşlardır. Çok sayıda faydalı özelliğe sahip ve çevreye böylesine uyum sağlayabilen *Bacillus spp.* biyogübre veya biyolojik mücadele etmeni olarak kullanım için uygun adaylardır.

Bu çalışmada, 1574 adet *Bacillus* izolatının biyolojik mücadele etmeni olarak kullanım potansiyeli incelenmiştir. Bu amaçla, *B.cinerea*, *F.solani* ve *R.solani* gibi fitopatojenik funguslara karşı *Bacillus* izolatlarının antagonistik etkisi incelenmiştir. Her üç fitopatojenik fungusa karşı da inhibisyon zonu oluşturan 118 adet *Bacillus* izolatı belirlenmiştir. Antagonistik etki gösteren izolatlar arasından biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılabilme potansiyeli en yüksek olan izolatın belirlenebilmesi amacıyla bu izolatlar için antifungal etki mekanizmaları sırasıyla incelenmiştir.

İlk olarak, bu izolatlardan elde edilen siklik lipopeptid ekstraktlarının antifungal etkisi ve Q-TOF ile bu ekstraktlardaki sürfaktin ve iturin A miktarları belirlenmiştir. Q-TOF ile kantitatif veri elde edilmesi çalışmaya hem hassasiyet hem de özgünlük kazandırmıştır. Daha sonra, bu izolatlar tarafından üretilen ve fitopatojenlerin hücre duvarı yapısında bulunan bileşenlere etki ederek zarar görmelerine sebep olan proteaz, kitinaz ve kitosanaz gibi litik enzim aktiviteleri incelenmiştir. Ayrıca, uçucu bir organik bileşik olan hcn üretimi ve fitopatojenler ile rekabet edilmesine olanak tanıyan siderofor üretimi de incelenmiştir. Her ne kadar doğadan izole edilen toprak bakterileri ile çalışmalar gerçekleştirilmiş olsa da, olası patojenite varlığının tespiti amacıyla koagülaz aktivitesi incelenmiştir.

Sonuç olarak, tüm antifungal etki mekanizmaları incelendikten sonra özellikle lipopeptid antifungal lipopeptid üretim miktarı yüksek olan ve kitlesel üretim için uygun olduğu belirlenen *Bacillus velezensis* 4-Ka-22 suşu seçilmiştir. Daha sonra, bu suş için üretim ortamı ve parametreleri için optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, üretim ortamının içeriği %0,1 melas, %1 soya unu, %0,5 CaCl₂ ve %1 gliserol içerecek şekilde optimize edilmiştir. Üretim sıcaklığı olarak 30°C uygun bulunmuştur ve diğer üretim parametreleri çalkalayıcı hızı 195 rpm, pH 5,0 ve inokülasyon oranı %4,3 olacak şekilde optimize edilmiştir.

Gerçekleştirilen optimizasyonlar sonucunda elde edilen canlı hücre sayısının ($3,27 \times 10^9$ kob/ml), kontrol olarak LB sıvı besiyerinde gerçekleştirilen üretimde elde edilen canlı hücre sayısının ($2,44 \times 10^8$ kob/ml) **13,4 katı** olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, maliyetli bir üretim ortamı olan LB besiyeri yerine daha düşük maliyetli melas ve soya unu gibi bileşenlerden oluşan bir üretim ortamı geliştirilmiştir. Bu üretim ortamı ile üretim ortamı maliyeti kontrol olarak kullanılan LB besiyerine göre **467 kat azaltılmıştır**. Böylece, ileride geliştirilmesi hedeflenen biyolojik mücadele preparatı için daha ekonomik kitlesel üretim gerçekleştirilebilecektir.

Çalışma ile ilgili incelenen literatürler ve gerçekleştirilen pekçok deneme ile *Bacillus* türlerine dayalı bir biyolojik mücadele etmeninin üretiminde kullanılabilecek kapsamlı bilgi birikimi oluşturulmuştur. Gerçekleştirilen çalışma sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda; aşağıda belirtilen konularda yapılacak çalışmaların da önemli sonuçlar sağlayacağı düşünülmektedir:

Bacillus izolatlarının antifungal etkisi üç farklı fitopatojene karşı incelenmiştir. Kullanılan fitopatojenik fungus sayısı artırılarak hastalığa spesifik farklı *Bacillus* izolatları seçilebilir ve üretim optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilebilir. Böylece, biyokontrol özellikleri belirlenmiş olan bir *Bacillus* kütüphanesi oluşturulmuştur ve bu kütüphaneden hastalığa spesifik biyolojik mücadele preparatları geliştirilebilir.

Biyolojik mücadele etmeni özelliklerine ek olarak biyogübre ve toprak iyileştirici etmen olarak da kullanılabilmesi için amilaz, selüloz ve hemiselüloz gibi enzimler, indol asetik asit, giberellin gibi sekonder metabolitler ve fosfat çözünürlüğü de incelenerek bu izolatlar için ekstra kullanım alanları geliştirilebilir.

Temel amaç, yüksek canlı hücre sayısı elde etmek olsa da, üretim sıvısı içerisinde bulunan antifungal metabolitlerin varlığı da geliştirilmesi hedeflenen biyolojik mücadele preparatı bakımından oldukça önemlidir. Bu nedenle, amino asitler ve lakton gibi büyüme arttırıcıların üretim ortamına eklenmesi biyosüpfektan verimini arttıracaktır. Ayrıca, demir ve mangan nanopartikülleri kullanılarak da biyosüpfektan veriminin arttırılması denenebilir.

Bacillus izolatu ile alg, fungus gibi farklı türlerin birlikte üretileceği kokültür çalışmaları gerçekleştirilebilir. Böylece, bir türün ürettiği diğer türün substratı olabilir ve üretimin ekonomik bir şekilde sürdürülmesi sağlanabilir. Aynı

zamanda, farklı antifungal etki mekanizmaları daha iyi olan farklı *Bacillus* suşlarının birlikte üretilmesi sonucu, bir türün eksikliği diğer tür ile kapatılarak daha etkili bir biyolojik mücadele preparatı oluşturulabilir.

Batık kültür ile gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları erlenlerde yapılmıştır. Geliştirilmesi hedeflenen biyolojik mücadele prepreparatının ticarileşme potansiyeli düşünüldüğünde ölçek büyütme çalışmaları ile reaktörlerde üretim optimizasyonu yapılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

Laboratuvarda in vitro koşullarda antagonistik aktivitesi belirlenen ve üretim optimizasyonu gerçekleştirilen *B.velezensis* 4-Ka-22 suşunun saha denemelerinde de etkinliğinin gösterilebilmesi için bitki denemeleri yapılmalıdır. Ayrıca, farklı biyotik ve abiyotik stres faktörleri altında, farklı ürün ve hastalık çeşitlerinde saha denemelerinin arttırılması faydalı olacaktır.

Son olarak, antifungal etki mekanizmaları belirlenen, üretim ortamı ve parametreleri optimize edilen *B.velezensis* 4-Ka-22 suşunun büyük ölçekte üretilerek ticari bir biyolojik mücadele preperatı olarak piyasaya sunulabilmesi için uzun raf ömrü süreleri boyunca canlılığını koruyabilecek şekilde biyoformülasyon geliştirilmelidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelmoteleb, A., Troncoso-Rojas, R., Gonzalez-Soto, T., & González-Mendoza, D. (2017). Antifungal activity of autochthonous *Bacillus subtilis* isolated from *Prosopis juliflora* against phytopathogenic fungi. *Mycobiology*, 45(4), 385-391.
- Abirammi T. V., Suman A., Singh R. & Gond S. (2018). Siderophore –The Iron Chelator Production Potential of Bacteria Associated with Diverse Crops and Growth Medium Optimization for its High Production. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2018) 7(7): 1052-1062
- Agha, S. I., Jahan, N., Azeem, S., Parveen, S., Tabassum, B., Raheem, A., ... & Khan, A. (2022). Characterization of broad-spectrum biocontrol efficacy of *Bacillus velezensis* against *Fusarium oxysporum* in *Triticum aestivum* L. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(1), 12590.
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.
- Ajayi-Oyetunde, O. O., & Bradley, C. A. (2018). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant pathology*, 67(1), 3-17.
- Akarapisan, A., Khamtham, J., & Kositratana, W. (2020). Characterization of antagonistic–potential of *Bacillus velezensis* SK71 against bacterial brown spot on a terrestrial orchid (*Habenaria lindleyana*). *International Journal of Agricultural Technology*, 16(1), 1-18.
- Akbal, Z., (2011). Bazı Psikrotolerant *Bacillus* İzolatlarında Çeşitli Hidrolitik Enzimlerin Taranması ve Yüksek Aktivite Gösteren İzolatların Pilot Ölçekte Spor Üretiminin Yapılması ve Biyoformülasyonu, Doktora Tezi, Ege Fen Bilimleri Enstitüsü, 180 s.
- Akeed, Y., Atrash, F., & Naffaa, W. (2020). Partial purification and characterization of chitinase produced by *Bacillus licheniformis* B307. *Heliyon*, 6(5), e03858.
- Akhavan Sepahy, A., & Jabalameli, L. (2011). Effect of culture conditions on the production of an extracellular protease by *Bacillus* sp. isolated from soil sample of Lavizan Jungle Park. *Enzyme research*, 2011.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Aloo, B. N., Makumba, B. A., & Mbega, E. R. (2019). The potential of *Bacilli* rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. *Microbiological Research*, 219, 26-39.
- Al-Saraireh, H., Al-Zereini, W. A., & Tarawneh, K. A. (2015). Antimicrobial activity of secondary metabolites from a soil *Bacillus* sp. 7B1 isolated from south Al-Karak, Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 147(3427), 1-6.
- Alvindia, D. G., & Natsuaki, K. T. (2009). Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. *Crop Protection*, 28(3), 236-242.
- Ambrico, A., & Trupo, M. (2017). Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. *Postharvest Biology and Technology*, 134, 5-10.
- Amezquita-Aviles, C. F., Coronel-Acosta, C. B., Santos-Villalobos, S. D. L., Santoyo, G., & Parra-Cota, F. I. (2022). Characterization of native plant growth-promoting bacteria (PGPB) and their effect on the development of maize (*Zea mays* L.). *Biotechnia*, 24(1), 15-22.
- Anckaert, A., Arias, A. A., & Hoff, G. (2021). The use of *Bacillus* spp. as bacterial biocontrol agents to control plant.
- Antil, S., Kumar, R., Pathak, D. V., Kumar, A., Panwar, A., & Kumari, A. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria-*Bacillus cereus* KMT-5 and *B. megaterium* KMT-8 effectively suppressed *Meloidogyne javanica* infection. *Applied Soil Ecology*, 174, 104419.
- Aoki, T., O'Donnell, K., & Geiser, D. M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3), 189-201.
- Asha, B., & Palaniswamy, M. (2018). Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(2), 119-127.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Astuti, P. M., Setyahadi, S., Wardani, A. K., & Sutrisno, A. (2021, November). The effect of different substrates on chitinase activity from *Bacillus* sp. WS4F. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 924, No. 1, p. 012034). IOP Publishing.
- AYDIN, M. H. (2022). *Rhizoctonia solani* and Its Biological Control. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 9(1), 118-135.
- Ayed, H. B., Azabou, M. C., Hmidet, N., Triki, M. A., & Nasri, M. (2019). Economic production and biocontrol efficiency of lipopeptide biosurfactants from *Bacillus mojavensis* A21. *Biodegradation*, 30(4), 273-286.
- Ayed, H. B., Hmidet, N., Béchet, M., Chollet, M., Chataigné, G., Leclère, V., ... & Nasri, M. (2014). Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochemistry*, 49(10), 1699-1707.
- Baptista, J. P., Teixeira, G. M., Jesus, M. L. A., Bertê, R., Higashi, A., Mosella, M., ... & de Oliveira, A. G. (2022). Antifungal activity and genomic characterization of the isolate *Bacillus velezensis* CMRP 4489, a biocontrol agent for plant-pathogenic fungi.
- Bartal, A., Vigneshwari, A., Bóka, B., Vörös, M., Takács, I., Kredics, L., ... & Szekeres, A. (2018). Effects of different cultivation parameters on the production of surfactin variants by a *Bacillus subtilis* strain. *Molecules*, 23(10), 2675.
- Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., & El Enshasy, H. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, 13(3), 1140.
- Beg, Q. K., Sahai, V., & Gupta, R. (2003). Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 39(2), 203-209.
- Berger, G., Czarnocka, K., Cochard, B., Oszako, T., & Lefort, F. (2015). Biocontrol endotherapy with *Trichoderma* spp. and *Bacillus amyloliquefaciens* against *Phytophthora* spp.: A comparative study with phosphite treatment on *Quercus robur* and *Fagus sylvatica*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 5, 428-439.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Berić, T., Kojić, M., Stanković, S., Topisirović, L., Degrassi, G., Myers, M., & Fira, D. (2012). Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 50(1), 25-31.
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Rosas-Galván, N. S., Morales-Guzmán, D., & Trejo-Hernández, M. R. (2018). Statistical design, a powerful tool for optimizing biosurfactant production: a review. *Colloids and Interfaces*, 2(3), 36.
- Bhowmik, S., Islam, S., Ahmed, M. M., Hossain, M. B., & Hossain, M. A. (2015). Protease producing bacteria and activity in gut of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 10(6), 489.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brown, J.H. 1939. Bergey's manual of determinative bacteriology.
- Brzezinska, M. S., Kalwasińska, A., Świątczak, J., Żero, K., & Jankiewicz, U. (2020). Exploring the properties of chitinolytic *Bacillus* isolates for the pathogens biological control. *Microbial Pathogenesis*, 148, 104462.
- Carolin C, F., Kumar, P. S., & Ngueagni, P. T. (2021). A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process.
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in microbiology*, 302.
- Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., & Ongena, M. (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases. *Pesticides in the modern world-pesticides use and management*, 273-302.
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987-1998.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chandra, P., Khobra, R., Sundha, P., Sharma, R. K., Jasrotia, P., Chandra, A., ... & Singh, G. P. (2021). Plant growth promoting *Bacillus*-based bio formulations improve wheat rhizosphere biological activity, nutrient uptake and growth of the plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43(11), 1-12.
- Chang, W. T., Hsieh, C. H., Hsieh, H. S., & Chen, C. (2009). Conversion of crude chitosan to an anti-fungal protease by *Bacillus cereus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 375-382.
- Chen, H., Wang, L., Su, C. X., Gong, G. H., Wang, P., & Yu, Z. L. (2008). Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in applied microbiology*, 47(3), 180-186.
- Chen, L., Wang, N., Wang, X., Hu, J., & Wang, S. (2010). Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. *Bioresource Technology*, 101(22), 8822-8827.
- Chen, L., Zhang, H., Zhao, S., Xiang, B., & Yao, Z. (2021). Lipopeptide production by *Bacillus atrophaeus* strain B44 and its biocontrol efficacy against cotton rhizoctoniosis. *Biotechnology Letters*, 43(6), 1183-1193.
- Cheng, X., Ji, X., Ge, Y., Li, J., Qi, W., & Qiao, K. (2019). Characterization of antagonistic *Bacillus methylotrophicus* isolated from rhizosphere and its biocontrol effects on maize stalk rot. *Phytopathology*, 109(4), 571-581.
- Chenniappan, C., Narayanasamy, M., Daniel, G. M., Ramaraj, G. B., Ponnusamy, P., Sekar, J., & Ramalingam, P. V. (2019). Biocontrol efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric. *Biological Control*, 129, 55-64.
- Coutte, F., Lecouturier, D., Ait Yahia, S., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., & Dhulster, P. (2010). Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 499-507.
- Coutte, F., Lecouturier, D., Dimitrov, K., Guez, J. S., Delvigne, F., Dhulster, P., & Jacques, P. (2017). Microbial lipopeptide production and purification bioprocesses, current progress and future challenges. *Biotechnology journal*, 12(7), 1600566.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cozzolino, M. E., Distel, J. S., García, P. A., Mascotti, M. L., Ayub, M. J., Benazzi, L. M., ... & Silva, P. G. (2020). Control of postharvest fungal pathogens in pome fruits by lipopeptides from a *Bacillus* sp. isolate SL-6. *Scientia Horticulturae*, 261, 108957.
- D'Ambrosio, G., Cariddi, C., Mannerucci, F., & Bruno, G. L. (2022). In Vitro Screening of New Biological Limiters against Some of the Main Soil-Borne Phytopathogens. *Sustainability*, 14(5), 2693.
- Dai, D. H., Hu, W. L., Huang, G. R., & Li, W. (2011). Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1. *african Journal of biotechnology*, 10(13), 2476-2485.
- Dame, Z. T., Rahman, M., & Islam, T. (2021). Bacilli as sources of agrobiotechnology: recent advances and future directions. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 14(2), 246-271.
- Dang, Y., Zhao, F., Liu, X., Fan, X., Huang, R., Gao, W., ... & Yang, C. (2019). Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 through metabolic engineering and culture conditions optimization. *Microbial cell factories*, 18(1), 1-14.
- Daniel, G. R., Tewari, A. K., Dev, D., & Upadhyay, P. (2022). In-vitro evaluation of *Bacillus subtilis* strains for their antagonistic potential against different fungal Phytopathogens and their compatibility with commonly used fungicides.
- Deepak, R., & Jayapradha, R. (2015). Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus thuringiensis* pak2310: a potential antagonist against *Fusarium oxysporum*. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(1), e15-e24.
- Devi, C. S., Srinivasan, V. M., Archana, B., Roy, S. S., & Naine, S. J. (2014). Production and partial purification of antifungal chitinase from *Bacillus cereus* VITSD3. *Bio. Sci. J*, 31, 960-968.
- Di Francesco, A., Martini, C., & Mari, M. (2016). Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action?. *European Journal of Plant Pathology*, 145(4), 711-717.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Diabankana, R. G. C., Afordoanyi, D. M., Safin, R. I., Nizamov, R. M., Karimova, L. Z., & Validov, S. Z. (2021). Antifungal Properties, Abiotic Stress Resistance, and Biocontrol Ability of *Bacillus mojavensis* PS17. *Current Microbiology*, 78(8), 3124-3132.
- Dimkić, I., Janakiev, T., Petrović, M., Degrassi, G., & Fira, D. (2022). Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117, 101754.
- Dimkić, I., Stanković, S., Nišavić, M., Petković, M., Ristivojević, P., Fira, D., & Berić, T. (2017). The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in microbiology*, 8, 925.
- El-Baky, N. A., & Amara, A. A. A. F. (2021). Recent approaches towards control of fungal diseases in plants: An updated review. *Journal of Fungi*, 7(11), 900.
- Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., & Matambo, T. (2021). Biopesticides in sustainable agriculture: a critical sustainable development driver governed by green chemistry principles. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 141.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, 285, 44-55.
- Fooladi, T., Abdesahian, P., Moazami, N., Soudi, M. R., Kadier, A., Yusoff, W. M. W., & Hamid, A. A. (2018). Enhanced biosurfactant production by *Bacillus pumilus* 2IR in Fed-batch fermentation using 5-L BIOREACTOR. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 42(3), 1111-1123.
- Gajbhiye, A., Rai, A. R., Meshram, S. U., & Dongre, A. B. (2010). Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1187-1194.
- Gao, X. A., Ju, W. T., Jung, W. J., & Park, R. D. (2008). Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 513-520.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ge, B., Liu, B., Nwet, T. T., Zhao, W., Shi, L., & Zhang, K. (2016). *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, isolated from Changbai Mountain, China, has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent. *PloS one*, 11(11), e0166079.
- GhodsSalavi, B., Ahmadzadeh, M., Soleimani, M., Madloo, P. B., & Taghizad-Farid, R. (2013). Isolation and characterization of rhizobacteria and their effects on root extracts of *Valeriana officinalis*. *Australian journal of crop science*, 7(3), 338.
- Gomaa, E. Z. (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *The journal of Microbiology*, 50(1), 103-111.
- Gopi, G. K., Meenakumari, K. S., Nysanth, N. S., & Subha, P. (2019). An optimized standard liquid carrier formulation for extended shelf-life of plant growth promoting bacteria. *Rhizosphere*, 11, 100160.
- Grover, M., Nain, L., Singh, S. B., & Saxena, A. K. (2010). Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24. *Current microbiology*, 60(2), 99-106.
- Haddad, N. I., Wang, J., & Mu, B. (2009). Identification of a biosurfactant producing strain: *Bacillus subtilis* HOB2. *Protein and Peptide letters*, 16(1), 7-13.
- Harba, M., Jawhar, M., & Arabi, M. I. E. Antagonistic comparative efficacy of *Bacillus* species against different soilborne fungal pathogens.
- He, D. C., He, M. H., Amalin, D. M., Liu, W., Alvindia, D. G., & Zhan, J. (2021). Biological control of plant diseases: An evolutionary and eco-Economic consideration. *Pathogens*, 10(10), 1311.
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of biological sciences*, 10(4), 273-290.
- Hong, S., Kim, T. Y., Won, S. J., Moon, J. H., Ajuna, H. B., Kim, K. Y., & Ahn, Y. S. (2022). Control of Fungal Diseases and Fruit Yield Improvement of Strawberry Using *Bacillus velezensis* CE 100. *Microorganisms*, 10(2), 365.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- <https://magaza.hammaddeler.com/urun/kalsiyum-klorur-e509-25-kg>(Erişim tarihi: 28.08.2022)
- <https://www.akakce.com/un/en-ucuz-soyfleks-25-kg-yagsiz-soya-u-fiyati,1592444494.html> (Erişim tarihi: 28.08.2022)
- https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/l3522?gclid=CjwKCAjwgaeYBhBAEiwAvMgp2p24nIEd12mpqKREdUj1QqBV4JG53UfPt9ebHfLFmW_QacjSTMYbohoC-N4QAvD_BwE (Erişim tarihi: 28.08.2022)
- <https://www.trendyol.com/kimyaciniz/bitkisel-gliserin-gliserol-99-7-30-kg-dogal-gliserin-saf-gliserin-kozmetik-kalite-p-313162405?boutiqueId=61&merchantId=133102> (Erişim tarihi: 28.08.2022)
- <https://www.trendyol.com/konya-seker/melas-yem-maddesi-organik-toprak-duzenleyici-sulfursuz-sivi-seker-pancari-melasi-25-kg-p-1052783264> (Erişim tarihi: 28.08.2022)
- Huang, C., Xu, G., Wang, L., Zhang, P., Zhao, P., & Zhong, Y. (2021). Antagonistic Properties and Screening of *Bacillus velezensis* Nhw-B72 against Wood Fungal Decay. *Forests*, 12(6), 785.
- Inès, M., & Dhouha, G. (2015). Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*, 71, 100-112.
- Işıkçı, E., (2014). Sivrisinek Mücadelesi İçin Yeni *Bacillus* Formülasyonlarının Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Fen Bilimleri Enstitüsü, 106 s.
- Jamali, H., Sharma, A., & Srivastava, A. K. (2020). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Journal of basic microbiology*, 60(3), 268-280.
- Janek, T., Gudiña, E. J., Połomska, X., Biniarz, P., Jama, D., Rodrigues, L. R., ... & Lazar, Z. (2021). Sustainable surfactin production by *Bacillus subtilis* using crude glycerol from different wastes. *Molecules*, 26(12), 3488.
- Jangir, M., Pathak, R., Sharma, S., & Sharma, S. (2018). Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biological Control*, 123, 60-70.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jiang, J., Zhang, H., Zhang, C., Han, M., Du, J., Yang, X., & Li, W. (2021). Production, purification and characterization of 'Iturin A-2'a lipopeptide with antitumor activity from Chinese Sauerkraut Bacterium *Bacillus velezensis* T701. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(3), 2135-2147.
- Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019). Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 184, 109607.
- Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., & Bhat, M. A. (2013). Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences*, 1(2), 39-57.
- Jungkind, D. L., Torhan, N. J., Corman, K. E., & Bondi, J. M. (1984). Comparison of two commercially available test methods with conventional coagulase tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 19(2), 191-193.
- Kalam, S., Basu, A., & Podile, A. R. (2020). Functional and molecular characterization of plant growth promoting *Bacillus* isolates from tomato rhizosphere. *Heliyon*, 6(8), e04734.
- Keskin Gündoğdu, T., Deniz, I., Çalışkan, G., Şahin, E. S., & Azbar, N. (2016). Experimental design methods for bioengineering applications. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 368-388.
- Khattab, A. I., Babiker, E. H., & Saeed, H. A. (2016). Streptomyces: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites. *International Current Pharmaceutical Journal*, 5(3), 27-32.
- Kobayashi, T., Koide, O., Deguchi, S., Horikoshi, K., 2011, Characterization of chitosanase of a deep biosphere *Bacillus* strain, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(4):669-673 pp.
- Koul, O. (2011). Microbial biopesticides: opportunities and challenges. *CAB Rev*, 6, 1-26.
- Krause, K., Jung, E. M., Lindner, J., Hardiman, I., Poetschner, J., Madhavan, S., ... & Kothe, E. (2020). Response of the wood-decay fungus *Schizophyllum commune* to co-occurring microorganisms. *PLoS One*, 15(4), e0232145.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Krishna, G. S., Devi, S. S., & Anuradha, K. SIDEROPHORE PRODUCTION BY INDIGENOUS *BACILLUS* ISOLATE AND ITS ROLE IN GROWTH OF *CICER ARIETINUM*.
- Kumar, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C., & Negi, S. (2012b). Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent research in science and technology*, 4(1).
- Kumar, A., Saini, S., Wray, V., Nimtz, M., Prakash, A., & Johri, B. N. (2012a). Characterization of an antifungal compound produced by *Bacillus* sp. strain A5F that inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of basic microbiology*, 52(6), 670-678.
- Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R., & Gupta, V. K. (2012c). Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Archives of Applied Science Research*, 4(4), 1763-1770.
- Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., & Mishra, V. (2021). An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance. *Plants*, 10(6), 1185.
- Kumar, P. N., Swapna, T. H., Khan, M. Y., Reddy, G., & Hameeda, B. (2017). Statistical optimization of antifungal iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* RHNK22 using agro-industrial wastes. *Saudi journal of biological sciences*, 24(7), 1722-1740.
- Kumar, S. S., Sharmila, G., Muthukumaran, C., Tamilarasan, K., & Gopinath, M. (2015). Statistical optimization of critical medium components for biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 4(2).
- Kumari, N., Sharma, P., Sharma, N., & Kumar, P. (2017). Antagonistic activity of *Bacillus* strain against fungal pathogens. *Int J Appl Curr Res*, 1(1), 11-18.
- Kumari, P., Netam, R. S., & Kumar, P. (2019). Studying microbial diversity having biofertilizing and bio-antagonistic traits from finger millet rhizosphere of Bastar plateau of Chhattisgarh. *Indian J Pure App Biosci*, 7(5), 205-213.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kurakake, M., Yo-u, S., Nakagawa, K., Sugihara, M., Komaki, T., 2000, Properties of chitosanase from *Bacillus cereus* S1, *Current Microbiology*, 40(1):6-9 pp.
- Lee, K. J., Kamala-Kannan, S., Sub, H. S., Seong, C. K., & Lee, G. W. (2008). Biological control of Phytophthora blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. *World journal of microbiology and biotechnology*, 24(7), 1139-1145.
- Lestari, P., Prihatiningsih, N., & Djatmiko, H. A. (2017). Partial biochemical characterization of crude extract extracellular chitinase enzyme from *Bacillus subtilis* B 298. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 172, No. 1, p. 012041). IOP Publishing.
- Li, T., Chen, X. B., Chen, J. C., Wu, Q., & Chen, G. Q. (2014). Open and continuous fermentation: products, conditions and bioprocess economy. *Biotechnology journal*, 9(12), 1503-1511.
- Liaqat, F., (2018). Kitinolitik *Bacillus* Suşları Kullanılarak Kitoooligosakkaritlerin Enzimatik Üretimi, Doktora Tezi, Ege Fen Bilimleri Enstitüsü, 164 s.
- Lima, F. A., Santos, O. S., Pomella, A. W. V., Ribeiro, E. J., & de Resende, M. M. (2020). Culture Medium Evaluation Using Low-Cost Substrate for Biosurfactants Lipopeptides Production by *Bacillus amyloliquefaciens* in Pilot Bioreactor. *Journal of Surfactants and Detergents*, 23(1), 91-98.
- Liu, R., Li, J., Zhang, F., Zheng, D., Chang, Y., Xu, L., & Huang, L. (2021). Biocontrol activity of *Bacillus velezensis* D4 against apple Valsa canker. *Biological Control*, 163, 104760.
- Liu, X., Ren, B., Gao, H., Liu, M., Dai, H., Song, F., ... & Zhang, L. (2012). Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *PloS one*, 7(5), e34430.
- Lobo, C. B., Tomás, M. S. J., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E. (2019). Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological research*, 219, 12-25.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lopes, R., Tsui, S., Gonçalves, P. J., & de Queiroz, M. V. (2018). A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(7), 1-10.
- López, A. C., & Alippi, A. M. (2009). Diversity of *Bacillus megaterium* isolates cultured from honeys. *LWT-Food Science and Technology*, 42(1), 212-219.
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of microbiology & biology education: JMBE*, 12(1), 51.
- Luo, Y., Zhang, G., Zhu, Z., Wang, X., Ran, W., & Shen, Q. (2013). Optimization of medium composition for lipopeptide production from *Bacillus subtilis* N7 using response surface methodology. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 41(1), 52-59.
- Ma, C., Li, X., Yang, K., & Li, S. (2020). Characterization of a new chitosanase from a marine *Bacillus* sp. and the anti-oxidant activity of its hydrolysate. *Marine drugs*, 18(2), 126.
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., ... & Kazan, K. (2013). Fusarium pathogenomics. *Annu Rev Microbiol*, 67(1), 399-416.
- Magdalena, S., ANGELIA, A., & Yogiara, Y. (2020). Characterization of antibacterial activity produced by *Bacillus* spp. isolated from honey and bee-associated products against foodborne pathogens. *Asian Journal of Tropical Biotechnology*, 17(2).
- Mahmoud, M. A., Nassif, F. A., Twab, A., Ata, E. A. H., & Soltan, H. A. (2015) Molecular And Physiological Identification Of Endophytic Bacterial Isolates Of Tomato (*Lycopersicon Esculentum*) And Their in vitro Antagonistic Activity. *Minia J. of Agric. Res. & Develop.* Vol. (35), No. 1, pp. 159-175, 2015
- Maines, M.D., (1999). *Current Protocols in Toxicology*, John Wiley & Sons Inc, ISBN10: 0471241067.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maitra, S., Brestic, M., Bhadra, P., Shankar, T., Praharaj, S., Palai, J. B., ... & Hossain, A. (2022). Bioinoculants—Natural Biological Resources for Sustainable Plant Production. *Microorganisms*, 10(1), 51.
- Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2002). Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45 C. *Journal of surfactants and detergents*, 5(1), 11-17.
- Maral, D., (2012). Biyokontrol Ajanı Olarak Trichoderma Mikropropagüllerinin Sıvı Kültür Fermentasyonu ile Üretim Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 159 s.
- Mardanova, A. M., Hadieva, G. F., Lutfullin, M. T., Khilyas, I. V. E., Minnullina, L. F., Gilyazeva, A. G., ... & Sharipova, M. R. (2017). *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi. *Agr Sci*, 8(1), 1-20.
- Márquez, R., Blanco, E. L., & Aranguren, Y. (2020). *Bacillus* strain selection with plant growth-promoting mechanisms as potential elicitors of systemic resistance to gray mold in pepper plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(8), 1913-1922.
- Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2015). Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed research international*, 2015.
- Meena, K. R., Saha, D., & Ramashish, K. (2014). Isolation and partial characterization of iturin like lipopeptides (a bio-control agent) from a *Bacillus subtilis* strain. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(10), 121-126.
- Meena, K. R., Sharma, A., Kumar, R., & Kanwar, S. S. (2020). Two factor at a time approach by response surface methodology to aggrandize the *Bacillus subtilis* KLP2015 surfactin lipopeptide to use as antifungal agent. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 337-348.
- Meena, K. R., Tandon, A., Sharma, A., & Kanwar, S. S. (2018). Lipopeptide antibiotic production by *Bacillus velezensis* KLP2016. *J Appl Pharm Sci*, 8, 91-98.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Miljaković, D., Marinković, J., & Balešević-Tubić, S. (2020). The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, 8(7), 1037.
- Ming, S., Zhang, Y., Guan, Y., Li, C., Shu, X., Rong, J., ... & Li, G. (2019, October). Fermentation Optimization of *Bacillus licheniformis*. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 612, No. 2, p. 022112). IOP Publishing.
- Mohanty, P., Singh, P. K., Chakraborty, D., Mishra, S., & Pattnaik, R. (2021). Insight into the role of PGPR in sustainable agriculture and environment. *Front. Sustain. Food Syst*, 5.
- Mosquera, S., González-Jaramillo, L. M., Orduz, S., & Villegas-Escobar, V. (2014). Multiple response optimization of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture and identification of antifungal metabolites. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 378-385.
- Mouafi, F. E., Eloud, M. M. A., & Moharam, M. E. (2016). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnology Reports*, 9, 31-37.
- Mukherjee, S., Das, P., Sivapathasekaran, C., & Sen, R. (2009). Antimicrobial biosurfactants from marine *Bacillus circulans*: extracellular synthesis and purification. *Letters in applied microbiology*, 48(3), 281-288.
- Mushtaq, Z. (2021). PGPR: present role, mechanism of action and future prospects along bottlenecks in commercialization. *EQA-International Journal of Environmental Quality*, 41, 9-15.
- Ngalimat, M. S., Yahaya, R. S. R., Baharudin, M. M. A. A., Yaminudin, S. M., Karim, M., Ahmad, S. A., & Sabri, S. (2021). A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*, 9(3), 614.
- Nihorimbere, V., & Ongena, M. (2017). Isolation of plant growth promoting *Bacillus* strains with biocontrol activity in vitro. *Merit Res. J. Microbiol. Biol. Sci*, 5(2), 013-021.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Öztopuz, Ö., Pekin, G., Park, R. D., & Eltem, R. (2018). Isolation and evaluation of new antagonist *Bacillus* strains for the control of pathogenic and mycotoxigenic fungi of fig orchards. *Applied biochemistry and biotechnology*, 186(3), 692-711.
- Pajčin, I., Grahovac, J., Dodić, J., Vlajkov, V., Dodić, S., Rončević, Z., & Mitrović, I. (2019, October). Utilization of raw glycerol from biodiesel industry for production of microbial biocontrol agents. In *Proceedings of the 5th Jubilee Virtual International Conference on Science, Technology and Management in Energy (eNergetics 2019)*, Niš, Serbia (pp. 28-29).
- Pandav, P. V., Ahire, R. S., Patil, S. R., & Pawar, S. B. (2021). Process Development for High Density Cultivation Yield for *Bacillus subtilis*. *International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Topics*, 2(7), 335-339.
- Penha, R. O., Vandenberghe, L. P., Faulds, C., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2020). *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. *Planta*, 251(3), 1-15.
- Pertiwinigrum, A., Anggraini, F. D., Fitrianto, N. A., & Rochijan, R. (2017). Isolation and identification of bacterial protease enzyme of leather waste. *Journal of Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 42(1), 33-41.
- PETRILA, L. M., BLAGA, A. C., & KRIER, F. (2020) A REVIEW ON THE OPTIMIZATION OF LIPOPEPTIDES PRODUCTION. *Bul. Inst. Polit. Iasi*, Vol. 66 (70), Nr. 1.
- Pournejati, R., & Karbalaee-Heidari, H. R. (2020). Optimization of fermentation conditions to enhance cytotoxic metabolites production by *Bacillus velezensis* strain RP137 from the Persian Gulf. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 12(2), 116.
- Prakash, N., & Gopal, S. (2017). Characterization of an extracellular chitosanase from the soil bacterium *Bacillus cereus* CH12. *IIOAB J*, 8, 1-6.
- Pueyo, M. T., Bloch, C., Carmona-Ribeiro, A. M., & Di Mascio, P. (2009). Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. *Microbial ecology*, 57(2), 367-378.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Punrata, T., Thaniyavarna, J., Napathorna, S. C., Anuntagoolb, J., & Thaniyavarna, S. (2020). Production of a sophorolipid biosurfactant by *Wickerhamomyces anomalus* MUE24 and its use for modification of rice flour properties. *ScienceAsia*, 46(1), 11-18.
- Puri, S., Beg, Q. K., & Gupta, R. (2002). Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. *Current microbiology*, 44(4), 286-290.
- Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2017). *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Frontiers in physiology*, 8, 667.
- Rajashekhar, M., Shahanaz, E., & Vinay, K. (2017). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus* spp. isolated from insects. *J. Entomol. Zool. Stud*, 5(5), 581-588.
- Ramnath, L., Sithole, B., & Govinden, R. (2017). Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. *Biotechnology Reports*, 15, 114-124.
- Rampersad, S. N. (2020). Pathogenomics and management of Fusarium diseases in plants. *Pathogens*, 9(5), 340.
- Rane, A. N., Baikar, V. V., Ravi Kumar, V., & Deopurkar, R. L. (2017). Agro-industrial wastes for production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and its application in synthesis of silver and gold nanoparticles. *Frontiers in microbiology*, 8, 492.
- Rangarajan, V., & Clarke, K. G. (2015). Process development and intensification for enhanced production of *Bacillus* lipopeptides. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 31(1-2), 46-68.
- Rao, Y. K., Tsay, K. J., Wu, W. S., & Tzeng, Y. M. (2007). Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 42(4), 535-541.
- Ratón, T. O., Giro, Z. G., Díaz, M. S., & Pérez, S. R. (2012). In vitro growth inhibition of *Curvularia gudauskasii* by *Bacillus subtilis*. *Annals of microbiology*, 62(2), 545-551.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., & Cammue, B. P. (2020). Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management—a review. *Biological Control*, 144, 104240.
- Ren, H., Su, Y. T., & Guo, X. H. (2018). Rapid optimization of spore production from *Bacillus amyloliquefaciens* in submerged cultures based on dipicolinic acid fluorimetry assay. *AMB Express*, 8(1), 1-9.
- Riaz, U., Mehdi, S. M., Iqbal, S., Khalid, H. I., Qadir, A. A., Anum, W., ... & Murtaza, G. (2020). Bio-fertilizers: eco-friendly approach for plant and soil environment. In *Bioremediation and Biotechnology* (pp. 189-213). Springer, Cham.
- Riskuwa-Shehu, M. L., Nata'ala, M. K., & Baba, E. E. (2019). Biocontrol potential of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil against mosquito larva. *South Asian Journal of Parasitology*, 2(3), 1-7.
- Ruiz-Garcia, C., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 191-195.
- Ryu, Y., Lee, K. E., Cha, I. T., & Park, W. (2020). Optimization of bacterial sporulation using economic nutrient for self-healing concrete. *Journal of Microbiology*, 58(4), 288-296.
- Saeed, Q., Xiukang, W., Haider, F. U., Kučerik, J., Mumtaz, M. Z., Holatko, J., ... & Mustafa, A. (2021). Rhizosphere Bacteria in Plant Growth Promotion, Biocontrol, and Bioremediation of Contaminated Sites: A Comprehensive Review of Effects and Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10529.
- Saha, D., Purkayastha, G. D., Ghosh, A., Isha, M., & Saha, A. (2012). Isolation and characterization of two new *Bacillus subtilis* strains from the rhizosphere of eggplant as potential biocontrol agents. *Journal of Plant Pathology*, 109-118.
- Santhosh, G. P. (2015). Formulation and shelf life of liquid biofertilizer inoculants using cell protectants. *IJRBA T, II*, (7), 243-247.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Santos-Moriano, P., Kidibule, P. E., Alleyne, E., Ballesteros, A. O., Heras, A., Fernandez-Lobato, M., & Plou, F. J. (2018). Efficient conversion of chitosan into chitooligosaccharides by a chitosanolytic activity from *Bacillus thuringiensis*. *Process Biochemistry*, 73, 102-108.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872.
- Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Abaidullah, M., Sessitsch, A., & Hafeez, F. Y. (2018). Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PloS one*, 13(6), e0198107.
- Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2020). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of applied microbiology*, 128(6), 1583-1594.
- Seenivasagan, R., & Babalola, O. O. (2021). Utilization of Microbial Consortia as Biofertilizers and Biopesticides for the Production of Feasible Agricultural Product. *Biology*, 10(11), 1111.
- Seenivasan, C., Radhakrishnan, S., Muralisankar, T., & Bhavan, P. S. (2012). *Bacillus subtilis* on survival, growth, biochemical constituents and energy utilization of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 38(3), 195-203.
- Shafi, J., Mingshan, J., Zhiqiu, Q., Xiuwei, L., Zumin, G., Xinghai, L., ... & Kai, W. (2017b). Optimization of *Bacillus aerius* strain JS-786 cell dry mass and its antifungal activity against *Botrytis cinerea* using response surface methodology. *Archives of Biological Sciences*, 69(3), 469-480.
- Shafi, J., Sun, Z., Ji, M., Gu, Z., & Ahmad, W. (2018). ANN and RSM based modelling for optimization of cell dry mass of *Bacillus* sp. strain B67 and its antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(1), 58-68.
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017a). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sharma, S. K., Ramesh, A., & Johri, B. N. (2013). Isolation and characterization of plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* strain sks_bnj_1 and its influence on rhizosphere soil properties and nutrition of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *J Virol Microbiol*, 2013(2013), 1-19.
- Sherzad, Z., & Canming, T. (2020). A new strain of *Bacillus velezensis* as a bioagent against *Verticillium dahliae* in cotton: isolation and molecular identification. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-14.
- Shoeb, E., Ahmed, N., Akhter, J., Badar, U., Siddiqui, K., ANSARI, F., ... & ANSARI, M. A. (2015). Screening and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from the Arabian Sea coast of Karachi. *Turkish Journal of Biology*, 39(2), 210-216.
- Si, J. B., Jang, E. J., Charalampopoulos, D., & Wee, Y. J. (2018). Purification and characterization of microbial protease produced extracellularly from *Bacillus subtilis* FBL-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 23(2), 176-182.
- Sidorova, T. M., Asaturova, A. M., Homyak, A. I., Zhevnova, N. A., Shternshis, M. V., & Tomashevich, N. S. (2020). Optimization of laboratory cultivation conditions for the synthesis of antifungal metabolites by *Bacillus subtilis* strains. *Saudi journal of biological sciences*, 27(7), 1879-1885.
- Singh, M., & Pandey, N. (2020). Evaluation of antifungal activity of *Bacillus* spp. against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* in Chick pea (*Cicer arietinum* L.). *Annals of Plant Protection Sciences*, 28(1), 33-37.
- Singh, P., Patil, Y., & Rale, V. (2019). Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of applied microbiology*, 126(1), 2-13.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Frontiers in microbiology*, 7, 2087.
- Slimene, I. B., Tabbene, O., Gharbi, D., Mnasri, B., Schmitter, J. M., Urdaci, M. C., & Limam, F. (2015). Isolation of a chitinolytic *Bacillus licheniformis* S213 strain exerting a biological control against *Phoma medicaginis* infection. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(7), 3494-3506.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Smitha, K. P., Mohan, R., Devadason, A., & Raguchander, T. (2015). Exploiting novel rhizosphere *Bacillus* species to suppress the root rot and wilt pathogens of chickpea. *African Journal of Microbiology Research*, 9(15), 1098-1104.
- Soltan, H. A. H., Dakhly, O. F., Mahmoud, M. A., & Fayz, Y. F. (2022). Microbiological and genetical identification of some vermicompost beneficial associated bacteria. *SVU-International Journal of Agricultural Sciences*, 4(1), 21-36.
- Soni, R., & Keharia, H. (2021). Phytostimulation and biocontrol potential of Gram-positive endospore-forming Bacilli. *Planta*, 254(3), 1-24.
- Sousa, M., Melo, V. M. M., Rodrigues, S., Sant'Ana, H. B., & Gonçalves, L. R. B. (2012). Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(6), 897-906.
- Soussi, S., Essid, R., Hardouin, J., Gharbi, D., Elkahoui, S., Tabbene, O., ... & Limam, F. (2019). Utilization of grape seed flour for antimicrobial lipopeptide production by *Bacillus amyloliquefaciens* C5 strain. *Applied biochemistry and biotechnology*, 187(4), 1460-1474.
- Sperber, W. Z., & Tatini, S. R. (1975). Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 29(4), 502-505.
- Stamenković, S., Beškoski, V., Karabegović, I., Lazić, M., & Nikolić, N. (2018). Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(1).
- Stamenković-Stojanović, S., Karabegović, I., Beškoski, V., Nikolić, N., & Lazić, M. (2019). *Bacillus* based microbial formulations: Optimization of the production process. *Hemijaska industrija*, 73(3), 169-182.
- Su, C., Wang, D., Yao, L., Yu, Z., 2006a, Purification, characterization, and gene cloning of a chitosanase from *Bacillus* species strain S65, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12):4208-4214 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tariq, M., Noman, M., Ahmed, T., Hameed, A., Manzoor, N., & Zafar, M. (2017). Antagonistic features displayed by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *J Plant Sci Phytopathol*, 1(1), 038-43.
- Thakkar, A., Patel, R., & Thakkar, J. (2016). Partial purification and optimization of chitinase form *Bacillus* spp. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 6, 26-33.
- Thavasi, R., Sharma, S., & Jayalakshmi, S. (2011). Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* S, 1, 1-6.
- Thomas, N. N., Archana, V., Shibina, S., & Edwin, B. T. (2021). Isolation and characterization of a protease from *Bacillus* sps. *Materials today: proceedings*, 41, 685-691.
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2018). Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in microbiology*, 9.
- Türkiye Cumhuriyeti Ticaret Bakanlığı, ‘Yeşil Mutabakat Eylem Planı, 2021’, <https://ticaret.gov.tr/data/60f1200013b876eb28421b23/MUTABAKAT%20YE%C5%9E%C4%B0L.pdf> (Erişim tarihi: 13.08.2022)
- Vahed, M., Motalebi, E., Rigi, G., Akbari Noghabi, K., Soudi, M. R., Sadeghi, M., & Ahmadian, G. (2013). Improving the chitinolytic activity of *Bacillus pumilus* SG2 by random mutagenesis. *J Microbiol Biotechnol*, 23(11), 1519-1528.
- Valenzuela Ruiz, V., Gálvez Gamboa, G. T., Villa Rodríguez, E. D., Parra Cota, F. I., Santoyo, G., & Santos-Villalobos, S. D. L. (2020). Lipopeptides produced by biological control agents of the genus *Bacillus*: a review of analytical tools used for their study. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(2), 419-432.
- van Kan, J. A. (2003, August). Infection strategies of *Botrytis cinerea*. In *VIII International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants* 669 (pp. 77-90).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vassilev, N., Malusa, E., Requena, A. R., Martos, V., López, A., Maksimovic, I., & Vassileva, M. (2017). Potential application of glycerol in the production of plant beneficial microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(4-5), 735-743.
- Vassileva, M., Malusà, E., Sas-Paszt, L., Trzcinski, P., Galvez, A., Flor-Peregrin, E., ... & Vassilev, N. (2021). Fermentation Strategies to Improve Soil Bio-Inoculant Production and Quality. *Microorganisms*, 9(6), 1254.
- Vignesh, M., Shankar, S. R. M., MubarakAli, D., & Hari, B. N. V. (2021). A Novel Rhizospheric Bacterium: *Bacillus velezensis* NKMV-3 as a Biocontrol Agent Against Alternaria Leaf Blight in Tomato. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-17
- VS, R. K. K., Meena, S., Karthikeyan, S., & Jawahar, D. (2022). Isolation, screening, characterization, and optimization of bacterium isolated from calcareous soils for siderophore production.
- Walter, V., Sylđatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Biosurfactants*, 1-13.
- Wang, S., Sun, L., Zhang, W., Chi, F., Hao, X., Bian, J., & Li, Y. (2020). *Bacillus velezensis* BM21, a potential and efficient biocontrol agent in control of corn stalk rot caused by *Fusarium graminearum*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-10.
- Wee, Y.J., Reddy, L., Chung, K.C., Ryu, H.W., 2009, Optimization of chitosanase production from *Bacillus* sp. RKY3 using statistical experimental designs, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(9):1356-1363 pp.
- Wen, C. Y., Yin, Z. G., Wang, K. X., Chen, J. G., & Shen, S. S. (2011). Purification and structural analysis of surfactin produced by endophytic *Bacillus subtilis* EBS05 and its antagonistic activity against *Rhizoctonia cerealis*. *The Plant Pathology Journal*, 27(4), 342-348.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5), 561-580.
- Wu, L., Wu, H. J., Qiao, J., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1395.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, S., Liu, G., Zhou, S., Sha, Z., & Sun, C. (2019). Characterization of Antifungal Lipopeptide Biosurfactants Produced by Marine Bacterium *Bacillus* sp. CS30. *Marine Drugs*, 17(4), 199.
- Wu, W. J., & Ahn, B. Y. (2011). Isolation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* BY01 with high productivity of menaquinone for cheonggukjang production. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(5), 783-789.
- Xu, B. H., Ye, Z. W., Zheng, Q. W., Wei, T., Lin, J. F., & Guo, L. Q. (2018). Isolation and characterization of cyclic lipopeptides with broad-spectrum antimicrobial activity from *Bacillus siamensis* JFL15. *3 Biotech*, 8(10), 1-10.
- Yadav, V. K., Yadav, R. C., Choudhary, P., Sharma, S. K., & Bhagat, N. (2022). Mitigation of drought stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) by inoculation of drought tolerant *Bacillus paramycoides* DT-85 and *Bacillus paranthracis* DT-97. *Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol*, 10(1), 59-69.
- Yan, L., Jing, T., Yujun, Y., Bin, L. I., Hui, L. I., & Chun, L. I. (2011). Biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an antifungal chitinase. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(1), 128-134.
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., & Teixidó, N. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*, 60(3), 280-289.
- Yangui, T., Rhouma, A., Triki, M. A., Gargouri, K., & Bouzid, J. (2008). Control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* using olive mill waste water and some of its indigenous bacterial strains. *Crop Protection*, 27(2), 189-197.
- Yaraguppi, D. A., Bagewadi, Z. K., Muddapur, U. M., & Mulla, S. I. (2020). Response surface methodology-based optimization of biosurfactant production from isolated *Bacillus aryabhattai* strain ZDY2. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, 10(6), 2483-2498.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yezza, A., Tyagi, R. D., Valero, J. R., Surampalli, R. Y., & Smith, J. (2004). Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 545-552.
- Yuan, X., Hou, X., Chang, H., Yang, R., Wang, F., & Liu, Y. (2019). *Bacillus methylotrophicus* has potential applications against *Monilinia fructicola*. *Open Life Sciences*, 14(1), 410-419.
- Zehra, A., Raytekar, N. A., Meena, M., & Swapnil, P. (2021). Efficiency of microbial bio-agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: A review. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100054.
- Zhang, C., Li, Y., Zhang, T., & Zhao, H. (2021). Increasing chitosanase production in *Bacillus cereus* by a novel mutagenesis and screen method. *Bioengineered*, 12(1), 266-277.
- Zhang, S. M., Wang, Y. X., Meng, L. Q., Li, J., Zhao, X. Y., Cao, X., ... & Li, J. F. (2012). Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. *African Journal of Microbiology Research*, 6(8), 1747-1755.
- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., ... & Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(15), 5951-5960.
- Zhao, X., Han, Y., Tan, X. Q., Wang, J., & Zhou, Z. J. (2014). Optimization of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology. *Journal of Microbiology*, 52(4), 324-332.
- Zhu, J., Tan, T., Shen, A., Yang, X., Yu, Y., Gao, C., ... & Zeng, L. (2020). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon. *Journal of Plant Pathology*, 1-9.
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Popović, T., & Balaž, J. (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences*, 62(3), 611-623.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince bana her türlü desteği veren, değerli bilgi ve tecrübeleriyle beni her konuda yönlendiren, tez çalışmam dışında da farklı bilimsel çalışmalarda yer almamı sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Rengin ELTEM'e,

Tez çalışmalarım süresince karşılaştığım her engelde çözüme ulaşmamda yardımcı olan ve akademik bilgileriyle beni aydınlatan tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Murat ELİBOL ve Prof. Dr. Ataç UZEL'e,

Biyomühendisk Bölümü Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda her ihtiyacım olduğunda desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman arkamda onların gücünü hissettiğim canım aileme,

Beni bu süreçte asla yalnız bırakmayan ve çalışmalarımı tamamlayabilmem için her türlü desteği veren sevgili eşime ve ondan çalmak zorunda kaldığım vakti fazlasıyla telafi edeceğime söz verdiğim oğlum Ege'ye,

Doktora eğitimim sırasında 2211C-Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında almaya hak kazandığım burs için TÜBİTAK'a,

FDK-2019-20159 nolu doktora tez projesi kapsamında, tez çalışmalarım için mali destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim.

08/08/2022

Derya MARAL GÜL

ÖZGEÇMİŞ

Derya MARAL GÜL, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nde 2004-2009 yılları arasında lisans eğitimini tamamlamıştır. Daha sonra, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik ABD'de 2009-2012 yılları arasında yüksek lisansını tamamlamıştır ve ardından aynı ana bilim dalında 2016 yılında doktora öğrenimine başlamıştır.

Yer Aldığı Projeler

Biyolojik Mücadele Etmeni Olarak *Bacillus* İzolatlarının Ekonomik Bir Prosesle Üretim Optimizasyonu, 2019-2022, BAP Projesi (FDK-2019-20159)

Yerel Bir *Trichoderma* İzolatı Kullanılarak Terkedilmiş Maden Sahalarının Islah Potansiyelinin Arttırılması, 2019-2020, TÜBİTAK-3001 Projesi

Grafen, çinko oksit ve nikel oksit nanopartikül kaplanmış basınç eşitleme tüplerinin farklı otopatojenik bakteriyel suşlara bağlı biyofilm oluşumunun azaltılmasındaki etkinliğinin araştırılması: *in vitro* çalışma, 2018-2019, TÜBİTAK-1001 Projesi (215S0609)

Biyokontrol Ajanı Olarak *Trichoderma* Mikropropagüllerinin Sıvı Kültür ile Üretimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi, 2009-2012, TÜBİTAK-1001 Projesi (109-M-551)

Yayınlar

Gezgin, Y., **Maral Gül, D.**, Şenşatar Sozer, S., Kara, C., Sargın, S., Eltem, R., Vardar-Sukan, F., 2020, "Evaluation of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma citrinoviride* growth profiles and their potentials as biocontrol agent and biofertilizer", Turkish Journal of Biochemistry, cilt.45, ss.1-13.

Ulusal ve Uluslararası Etkinliklerde Sunulan Sözlü ve Poster Bildiriler

Bora, Ş., **Maral-Gül, D.**, Eltem, R., “Mısır Yetiştiriciliğinde Bitki Büyümesini Teşvik Edici Rizobakteri (PGPR) Uygulamasının Bitki Gelişimine Etkisinin İncelenmesi”, 18. Biyomühendislik Günleri, 2021, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova-İZMİR, TÜRKİYE

Süslü, B., **Maral-Gül, D.**, Eltem, R., “Soya Fasulyesi Üretiminde *Rhizobium* Suşları ile Bitki Büyümesini Teşvik Eden Kök Rizobakterlerin (PGPR) Ko-inokülasyonu”, 18. Biyomühendislik Günleri, 2021, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova-İZMİR, TÜRKİYE

Karaca, K., **Maral-Gül, D.**, Eltem, R., “*Bacillus* Temelli Biyogübre Formülasyonunun Hidroponik Sistemde Etkinliğinin İncelenmesi”, 17. Biyomühendislik Günleri, 2020, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova- İZMİR, TÜRKİYE

Kiy, A., **Maral-Gül, D.**, Eltem, R., “*In vitro* Koşullarda Bazı *Trichoderma* İzolatlarının Bazı Domates Patojeni Bakterilere Karşı Antagonistik Etkisinin İncelenmesi”, 17. Biyomühendislik Günleri, 2020, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova- İZMİR, TÜRKİYE

Kezbez, Ö, **Maral-Gül, D.**, Eltem, R., “*In vitro* koşullarda: yerli *Bacillus* izolatlarının fitopatojen bakterilere karşı antagonistik etkisinin incelenmesi”, 17. Biyomühendislik Günleri, 2020, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova- İZMİR, TÜRKİYE

Maral Gül D., Çağlayan K., Kuşçu M., Azak C., Yerli D., Bayar B., Eltem, R., “Fitopatojen Funguslara Karşı Antifungal Aktiviteye Sahip Yerel *Bacillus* İzolatlarının *in vitro* Koşullarda Seçilmesi”, Hezarfen Uluslararası Fen Matematik ve Mühendislik Bilimleri Kongresi, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye, 8 – 10 Kasım 2019, ss.95-106

Aktaş Z., **Maral-Gül D.**, Eltem R., “*In vitro* koşullarda: Yerli *Trichoderma* izolatlarının fitopatojenik funguslara karşı antagonistik etkisinin incelenmesi”, 16. Biyomühendislik Günleri, 16 Mayıs 2019, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova-İZMİR, TÜRKİYE

Keçeciler C. , Çelik O., **Maral D.** , Eltem R., Özer A., Özer Ü.H. , et al., "Antibacterial effect of carbon-based nanomaterials: an in vitro study", IV. International Ege Composite Materials Symposium (KOMPEGE), Ege University, , İZMİR, TÜRKİYE, 6-8 Eylül 2018, pp.3-3

Çelik O., Yapıcı K. , Çelenk C., Peker S. , Keçeciler C. , **Maral D.**, et al., "Nickel oxide and zinc oxide have antibacterial activity against pathogenic bacteria", IV. International Ege Composite Materials Symposium (KOMPEGE), Ege University, İZMİR, TÜRKİYE, 6-8 Eylül 2018, pp.57-57

Yerli D., Bayar B., **Maral D.**, Eltem R., “In vitro koşullarda: Fitopatojen funguslara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olan yerel *Bacillus* izolatlarının seçilmesi”, 15. Biyomühendislik Günleri, 4 Mayıs 2018, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova-İZMİR, TÜRKİYE

Sami Ş., **Derya M.**, Eltem R., "*Trichoderma citrinoviride* mikropropagüllerinin üretimi ve *Bacillus* formülasyonlarıyla etkileşiminin incelenmesi", 14. Biyomühendislik Günleri, 5-6 Mayıs 2017, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova –İZMİR, TÜRKİYE

Gezgin Y., **Maral D.**, Sözer S., Kara C.U., Sargın S., Vardar F., et al., "Determining the potential of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma citrinoviride* as biocontrol agent and biofertilizer", 1st International Eurasia Mycology Congress, MANİSA, TÜRKİYE, 3-5 Temmuz 2017, pp.51-51

Gezgin Y., **Derya M.**, Sözer S., Sargın S., Vardar F., Eltem R., "Effect of optimal physical parameters and nutrient sources on the growth profiling of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma citrinoviride* strains as biopesticide", VIIth International Bioengineering Congress, İZMİR, TÜRKİYE, 19-21 Kasım 2015, pp.53-53

Maral, D., Sozer, S., Gezgin, Y, Kara, C., Sargın, S., Eltem, R., Vardar-Sukan, F. “Evaluation of the properties of *Trichoderma* sp. isolates as biocontrol agent and biofertilizer”, Environmental Microbiology and Biotechnology, In the Frame of the Knowledge-Based Bio&Green Economy, EMB 2012, April 10-12, 2012, Faculty of Engineering, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Bologna-ITALY

Maral, D., Sargin, S., Eltem, R., Vardar Sukan, F. “Optimization of production conditions for *Trichoderma* sp. P7 as a biocontrol agent by liquid culture fermentation”, New Biotechnology, Vol 28S, S163 15th European Congress on Biotechnology, 23-26 September 2012, İstanbul-TURKEY

Maral, D., Gezgin, Y., Eltem, R., “In vitro mycoparasitic activity of *Trichoderma* isolates against some phytopathogenic fungi”, The 5th International Bioengineering Congress for 16-19 June 2010, Tepekule Convention Center, İzmir-TURKEY

