

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma AZGIN

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN FARKLI *Bacillus* sp. SUŞLARININ
ANTİFUNGAL ETKİNLİKLERİNİN SAPTANMASI**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN FARKLI *Bacillus* sp. SUŞLARININ
ANTİFUNGAL ETKİNLİKLERİNİN SAPTANMASI**

Fatma AZGIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 21/06/2013 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri tarafından Oy Birliği /
Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Ömer ÇOLAK Prof. Dr. Burhan ARIKAN Prof.Dr. Zülküf KAYA
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof.Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

Bu Çalışma Ç.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF2010YL11

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere
tabidir

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *Bacillus* sp. SUŞLARININ ANTİFUNGAL ETKİNLİKLERİNİN SAPTANMASI

Fatma AZGIN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK

Yıl: 2013, Sayfa: 73

Jüri : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK

: Prof.Dr. Burhan ARIKAN

: Prof.Dr. Zülküf KAYA

Bu çalışmada Adana ili topraklarından yaklaşık 50 farklı *Bacillus* sp. suşu izole edilmiştir. Seçilen 9 suşun *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Penicillium* sp. ve *Trametes versicolor* funguslarına karşı antifungal aktiviteleri gösterilmiştir. *Bacillus* sp. AL-1 and *Bacillus* sp. DN-1 suşlarının test funguslarına karşı en güçlü etkiyi gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca *Bacillus* sp. AL-1 ve *Bacillus* sp. DN-1 suşları *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. funguslarının hem misel gelişimi hem de spor germinasyonunu inhibe etmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp., Antifungal, Biyokontrol, Spor Germinasyonu, Misel Gelişimi

ABSTRACT

MSc THESIS

DETERMINING THE ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF DIFFERENT *Bacillus* sp. STRAINS WHICH ISOLATED FROM SOIL

Fatma AZGIN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK

Year: 2013, Pages: 73

Jury : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK

: Prof. Dr. Burhan ARIKAN

: Prof.Dr. Zülküf KAYA

In this study, approximately different 50 *Bacillus* sp. strains were isolated from soil in Adana. 9 of these isolated strains were shown to be have an antifungal activity against *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Penicillium* sp. and *Trametes versicolor*. *Bacillus* sp. AL-1 and *Bacillus* sp. DN-1 strains were found to be have the most strong inhibition againts all of the fungal test organisms and these strains also showed their activity to the spore germination and mycelial growth of *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.

Keywords: *Bacillus* sp., Antifungal, Biocontrol, Spore Germination, Mycelial growth

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Ömer ÇOLAK' a çok teşekkür ediyorum.

Jüri üyelerim Prof. Dr. Burhan ARIKAN ve Prof. Dr. Zülküf KAYA' ya çok teşekkür ediyorum.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Dr. Fatma Esen SARIGÜLLÜ Dr. Emel KARADENİZ, Uzman Biyolog Işıl ÜNTAÇ' a teşekkür ediyorum.

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonuna, çalışmalarına katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında manevi desteğini hep yanımda hissettiğim Annem Döndü AZGIN' a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyokontrol Mekanizmaları	4
1.1.1. Direkt Antagonizma	5
1.1.2. Karışık Yollarla Antagonizma	5
1.1.2.1. Antibiyotikler	5
1.1.2.2. Litik Enzimler	7
1.1.2.3. Diğer Metabolitler	7
1.1.3. İndirekt Antagonizma	8
1.1.3.1. Rekabet.....	8
1.1.3.2. Konukçu Direncinin Arttırılması	8
1.2. Bacillus Cinsi	9
1.2.1. Bacillus Cinsinin Biyokontroldeki Yeri.....	9
1.3. Candida sp.	14
1.4. Küfler Hakkında Genel Bilgi	14
1.4.1. Alternaria sp.	14
1.4.2. Aspergillus sp.	15
1.4.3. Penicillium sp.	16
1.5. Trametes versicolor.	16
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	17
2.1. Bacillus Cinsi ile Yapılan Biyokontrol Çalışmaları	17
3. MATERYAL VE METOD	25
3.1. Materyal.....	25

3.1.1. Kullanılan Organizmalar	25
3.1.1.1. Bacillus sp Suşları	25
3.1.1.2. Test Organizmaları	26
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri	26
3.1.2.1. PDA	27
3.1.2.2. Nutrient Agar (N1) ve Nutrient Broth	27
3.1.2.3. CYM	27
3.1.2.4. Fermentasyon Besiyeri	28
3.1.2.5. M9-Nişasta Agar	29
3.1.2.6. Top Agar	29
3.1.2.7. SIM Agar	30
3.1.2.8. Nitrat Besiyeri	30
3.1.2.9. Simmon' s Sitrat Besiyeri	31
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	31
3.1.3.1. Gliserol Solüsyonu	31
3.1.3.2. Lugol	31
3.1.3.3. Kovac' s Çözeltisi	32
3.2. Metod	32
3.2.1. Bacillus sp. İzolasyonu ve Stok Kültürlerinin Hazırlanması	32
3.2.2. Test funguslarının İzolasyonu ve Stok Kültürlerinin Hazırlanması	33
3.2.2.1. Spor Zincir Morfolojilerinin İncelenmesi	34
3.2.3. Küf Sporunun Elde Edilmesi	35
3.3. Bacillus sp. Suşlarının Biyokimyasal Karakterizasyonu	36
3.3.1. Katalaz Testi	36
3.3.2. NaCl Toleransı	37
3.3.3. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi	37
3.3.4. SIM Testi	37
3.3.5. Sitrat Testi	38
3.3.6. Nitrat Testi	38
3.3.7. Katı Besiyerinde Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi	39
3.4. Bacillus sp. Suşlarının Antibiyotik Üretimi	40

3.5. Bacillus sp. Suşlarının Misel Gelişimine Etkilerinin Belirlenmesi.....	40
3.6. Bacillus sp. Suşlarının Küf Sporu Gelişimine Etkisinin Belirlenmesi.....	40
3.6.1. Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi.....	40
3.7. Bacillus sp. Suşlarının Candida sp. Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	43
4.1.Bulgular	43
4.1.1. Bacillus sp. Suşlarının Karakterizasyonu.....	43
4.1.2. Bacillus sp. Suşlarının Surfaktin Üretimi	43
4.1.3. Bacillus sp. Suşlarının Antifungal Aktiviteleri	45
4.1.3.1. Bacillus sp. Suşlarının Candida sp.Üzerine Antifungal Aktiviteleri	45
4.1.3.2. Bacillus sp. Suşlarının Misel Gelişimi Üzerine Antifungal Aktiviteleri	48
4.1.3.2.(1). Bacillus sp. Suşlarının Alternaria sp. Misel Gelişimi Üzerine Antifungal Aktiviteleri	48
4.1.3.2.(2). Bacillus sp. Suşlarının Aspergillus sp. Misel Gelişimi Üzerine Antifungal Aktiviteleri	51
4.1.3.2.(3). Bacillus sp. Suşlarının Penicillium sp. Misel Gelişimi Üzerine Antifungal Aktiviteleri	54
4.1.3.2.(4). Bacillus sp. Suşlarının Trametes versicolor Misel Gelişimi Üzerine Antifungal Aktiviteleri	57
4.2.3. Bacillus sp. Suşlarının Küf Sporu Çimlenmesi Üzerine Aktiviteleri	60
4.2. Tartışma.....	62
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge.1.1. Ülkemizden AB ülkelerine İhraç Edilen Bitkisel Ürünlerin Partilerine Göre Uygun Bulunmayanların Sayısı ve Nedenleri	3
Çizelge.1.2. Biyokontrol Mekanizmaları	5
Çizelge.1.3. Piyasada bulunan Biyokontrol ajanı Bacillus sp. ürünlerinin etki spektrumları ve kullandıkları mekanizmalar.....	10
Çizelge.1.4. Fitopatojenik Alternaria genusuna ait türler hedefi konukçu bitkiler.....	15
Çizelge.4.1. Bacillus sp. suşlarının karakterizasyonunu belirlemeye yönelik testlerin sonuçları	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Biyokontrol ajanlarının pestisit pazarındaki payı	4
Şekil 3.1. Bacillus sp. suşlarının Staphylococcus sp. suşlarına inhibisyon etkisi ...	25
Şekil 3.2. Alternaria sp. spor zincir morfolojileri	35
Şekil 3.3. Aspergillus sp. spor zincir morfolojileri	35
Şekil 3.4. Penicillium sp. spor zincir morfolojileri	35
Şekil 3.5. Katalaz testi pozitif ve negatif sonuçlar	36
Şekil 3.6. Sitrat pozitif (mavi renk) ve negatif (yeşil renk) bakterilerin görünümü	38
Şekil 3.7. Pembe-Kırmızı renk veren nitrat pozitif bakterilerin görünümü	39
Şekil 3.8. Agar kuyu difüzyon yöntemi için hazırlanmış PDA besiyeri	41
Şekil 4.1. Bacillus sp. SR-1 suşunun hemolitik etkisi	43
Şekil 4.2. Bacillus sp. SR-1 suşunun Candida sp. üzerine aktivitesi	45
Şekil 4.3. Bacillus sp. SR-2 suşunun Candida sp. üzerine aktivitesi	45
Şekil 4.4. Bacillus sp. SR-3 suşunun Candida sp. üzerine aktivitesi	45
Şekil 4.5. Bacillus sp. SR-4 suşunun Candida sp. üzerine aktivitesi	45
Şekil 4.6. Bacillus sp. K2A suşunun Candida sp. üzerine aktivitesi	46
Şekil 4.7. Bacillus sp. K4D suşunun Candida sp. üzerine aktivitesi	46
Şekil 4.8. Bacillus sp. K5A suşunun Candida sp. üzerine aktivitesi	46
Şekil 4.9. Bacillus sp. AL-1 suşunun Candida sp. üzerine aktivitesi	47
Şekil 4.10. Bacillus sp. DN-1 suşunun Candida sp. üzerine aktivitesi	47
Şekil 4.11. Bacillus sp. SR-1 suşunun Alternaria sp. üzerine etkisi	48
Şekil 4.12. Bacillus sp. SR-2 suşunun Alternaria sp. üzerine etkisi	48
Şekil 4.13. Bacillus sp. SR-3 suşunun Alternaria sp. üzerine etkisi	48
Şekil 4.14. Bacillus sp. SR-4 suşunun Alternaria sp. üzerine etkisi	48
Şekil 4.15. Bacillus sp. K2A suşunun Alternaria sp. üzerine etkisi	49
Şekil 4.16. Bacillus sp. K4D suşunun Alternaria sp. üzerine etkisi	49
Şekil 4.17. Bacillus sp. K5A suşunun Alternaria sp. üzerine etkisi	49
Şekil 4.18. Bacillus sp. AL-1 suşunun Alternaria sp. üzerine etkisi	50
Şekil 4.19. Bacillus sp. DN-1 suşunun Alternaria sp. üzerine etkisi	50

Şekil 4.20. <i>Bacillus</i> sp. SR-1 suşunun <i>Aspergillus</i> sp. üzerine etkisi	51
Şekil 4.21. <i>Bacillus</i> sp. SR-2 suşunun <i>Aspergillus</i> sp. üzerine etkisi	51
Şekil 4.22. <i>Bacillus</i> sp. SR-3 suşunun <i>Aspergillus</i> sp. üzerine etkisi	51
Şekil 4.23. <i>Bacillus</i> sp. SR-4 suşunun <i>Aspergillus</i> sp. üzerine etkisi	51
Şekil 4.24. <i>Bacillus</i> sp. K2A suşunun <i>Aspergillus</i> sp. üzerine etkisi	52
Şekil 4.25. <i>Bacillus</i> sp. K4D suşunun <i>Aspergillus</i> sp. üzerine etkisi	52
Şekil 4.26. <i>Bacillus</i> sp. K5A suşunun <i>Aspergillus</i> sp. üzerine etkisi	52
Şekil 4.27. <i>Bacillus</i> sp. AL-1 suşunun <i>Aspergillus</i> sp. üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.28. <i>Bacillus</i> sp. DN-1 suşunun <i>Aspergillus</i> sp. üzerine etkisi	53
Şekil 4.29. <i>Bacillus</i> sp. SR-1 suşunun <i>Penicillium</i> sp. üzerine etkisi	54
Şekil 4.30. <i>Bacillus</i> sp. SR-2 suşunun <i>Penicillium</i> sp. üzerine etkisi	54
Şekil 4.31. <i>Bacillus</i> sp. SR-3 suşunun <i>Penicillium</i> sp. üzerine etkisi	54
Şekil 4.32. <i>Bacillus</i> sp. SR-4 suşunun <i>Penicillium</i> sp. üzerine etkisi	54
Şekil 4.33. <i>Bacillus</i> sp. K2A suşunun <i>Penicillium</i> sp. üzerine etkisi	55
Şekil 4.34. <i>Bacillus</i> sp. K4D suşunun <i>Penicillium</i> sp. üzerine etkisi	55
Şekil 4.35. <i>Bacillus</i> sp. K5A suşunun <i>Penicillium</i> sp. üzerine etkisi	55
Şekil 4.36. <i>Bacillus</i> sp. AL-1 suşunun <i>Penicillium</i> sp. üzerine etkisi.....	56
Şekil 4.37. <i>Bacillus</i> sp. DN-1 suşunun <i>Penicillium</i> sp. üzerine etkisi	56
Şekil 4.38. <i>Bacillus</i> sp. SR-1 suşunun <i>Trametes versicolor</i> üzerine etkisi	57
Şekil 4.39. <i>Bacillus</i> sp. SR-2 suşunun <i>Trametes versicolor</i> üzerine etkisi	57
Şekil 4.40. <i>Bacillus</i> sp. SR-3 suşunun <i>Trametes versicolor</i> üzerine etkisi	57
Şekil 4.41. <i>Bacillus</i> sp. SR-4 suşunun <i>Trametes versicolor</i> üzerine etkisi	57
Şekil 4.42. <i>Bacillus</i> sp. K2A suşunun <i>Trametes versicolor</i> üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.43. <i>Bacillus</i> sp. K4D suşunun <i>Trametes versicolor</i> üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.44. <i>Bacillus</i> sp. K5A suşunun <i>Trametes versicolor</i> üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.45. <i>Bacillus</i> sp. AL-1 suşunun <i>Trametes versicolor</i> üzerine etkisi.....	59
Şekil 4.46. <i>Bacillus</i> sp. DN-1 suşunun <i>Trametes versicolor</i> üzerine etkisi	59
Şekil 4.47. <i>Bacillus</i> sp. AL-1 suşunun <i>Alternaria</i> sp. spor çimlenmesine inhibisyonu.....	60
Şekil 4.48. <i>Bacillus</i> sp. DN-1 suşunun <i>Alternaria</i> sp. spor çimlenmesine inhibisyonu.....	60

Şekil 4.49. Bacillus sp. AL-1 suşunun Aspergillus sp. spor çimlenmesine inhibisyon.....	61
Şekil 4.50. Bacillus sp. DN-1 suşunun Aspergillus sp. spor çimlenmesine inhibisyonu.....	61
Şekil 4.51. Bacillus sp. AL-1 suşunun Penicillium sp. spor çimlenmesine inhibisyon.....	61
Şekil 4.52. Bacillus sp. DN-1 suşunun Penicillium sp. spor çimlenmesine inhibisyonu.....	61
Şekil.4.53. Bacillus sp. AL-1 ve DN-1 suşlarının spor çimlenmesi inhibisyonu zon çaplarının (cm) karşılaştırılması.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

atm.	: Atmosfer
°C	: Santigrat Derece
cm	: Santimetre
CYM	: Complete YeastMedium
dk.	: Dakika
g	: Gram
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
L	: Litre
µL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
µm	: Mikrometre (mikron)
PGPR	: Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin gücü)
rpm	: Round Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
SIM	: Sulfur Indol Motility
sp.	: Tür
spp.	: Türler

1. GİRİŞ

Dünyada artan nüfus dolayısıyla artan gıda ihtiyacı sınırlı tarım alanlarından daha fazla ürün elde etmeyi ve elde edilen ürünün tüketilinceye kadar muhafazasının verimli şekilde sağlanmasını gerektirmektedir. Bu nedenle tarımsal bitkilerin arazilerde, elde edilen ürünlerin ise hasat sonrası depolarda ve son tüketiciye ulaşınca kadar patojenler tarafından zarar görmesinin önüne geçilmesi önem arz etmektedir. Bitki hastalıkları dünya gıda üretiminin en az %10' unun kayımdan sorumlu (Cawoy ve ark., 2011) olduğundan etkili mücadele tekniklerinin geliştirilmesi gereği ortaya çıkmıştır.

DDT' nin 1939 yılında insektisit özelliğinin keşfiyle başlayan ve diğerlerinin keşfiyle devam eden, sentetik pestisitlerin tarımda kullanımı büyük bir hızla yaygınlaşmıştır. Bununla beraber sentetik pestisitlerin yaygın kullanımının artmasıyla birçok sorun da ortaya çıkmaya başlamıştır. 1946 yılında ilk defa DDT' ye direnç *Musca domestica*' da görülmüş, 1948 yılında ise Aldrin ve Dieldrin' in toprakta en fazla kalıcı olan insektisit olduğu tespit edilmiştir. İlerleyen yıllarda ise sentetik pestisitlerin zararlarına yönelik yeni bilgiler hızlı bir şekilde ortaya konulmaya başlanmış ve ortaya konan zararlara yönelik ülkelerce önleyici mevzuatlar oluşturulmuş, kullanımlarına yasaklamalar başlamıştır. İlk yasaklamalar 1970li yıllarda olmuştur (Ağar ve ark., 1991).

Sentetik pestisitlerin kullanımının yarattığı sorunlar:

- Toprak ve yer altı sularının kirliliği,
- Sürekli kullanıma bağlı olarak birikme,
- Geniş spektrumlu etkilerinden dolayı yararlı organizmalara da zarar vermeleri,
- Dirençli zararlıların ortaya çıkması,
- Besin zincirine dahil olmasından dolayı insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri, şeklinde sıralanabilir.

Tüm bu verilere rağmen günümüzde hala tarım zararlıları ile mücadele dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de sentetik pestisitlerin kullanımı ile eşdeğer olarak kabul görmektedir (DPT, 2006). Sentetik pestisitlerin hızlı etkinliklerinin yanı sıra geniş spektrumlu olmaları, kullanımlarının kolay olması ve görece ekonomik olması tercih edilmesine neden olmaktadır. Ancak ortaya konulan sorunlardan biri olan dirençli patojenlerin ortaya çıkması yüksek dozda sentetik pestisit kullanımını da beraberinde getirmiş ve bu durum kısır bir döngü halini almıştır. Yapılan bir çalışmada Avrupa ülkelerinde sentetik fungusit kullanımı patatesten % 30 ve elmada % 20 azaltılmasına karşın verimde bir düşüş olmadığı gösterilmiştir. (Gullino ve Kuijpers, 1994).

Ülkemizde sentetik pestisit kullanımının çiftçilerin deneyimlerine göre ya da bayi önerisi dikkate alınarak yapıldığı, bilinçli bir kullanımın mevcut olmadığı tespit edilmiştir (DPT, 2006). Ayrıca ekonomik değeri yüksek bitkisel ürünlerin ihracatlarında bu bilinçsiz kullanımdan kaynaklı pestisit kalıntıları nedeniyle olumsuzluklar yaşanmakta ve ekonomik zararlara neden olmaktadır. Söz konusu ve daha fazla olumsuzların ortaya çıkmasının önlenmesi amacıyla Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından “ Bitki Koruma Ürünlerinin Reçeteli Satış Usul ve Esasları Hakkında Yönetmelik” 12 Şubat 2009 tarihinde Resmi Gazetede yayınlanarak yürürlüğe girmiştir. Yönetmeliğin uygulanmasına yönelik yaşanan sorunların giderilmesi amacıyla ilk yayınlandığı tarihten şu ana kadar değişikliklerin yapıldığı da bilinmektedir.

Çizelge 1.1. Ülkemizden AB ülkelerine İhraç Edilen Bitkisel Ürünlerin Partilerine Göre Uygun Bulunmayanların Sayısı ve Nedenleri (Durmuşoğlu ve ark., 2010)

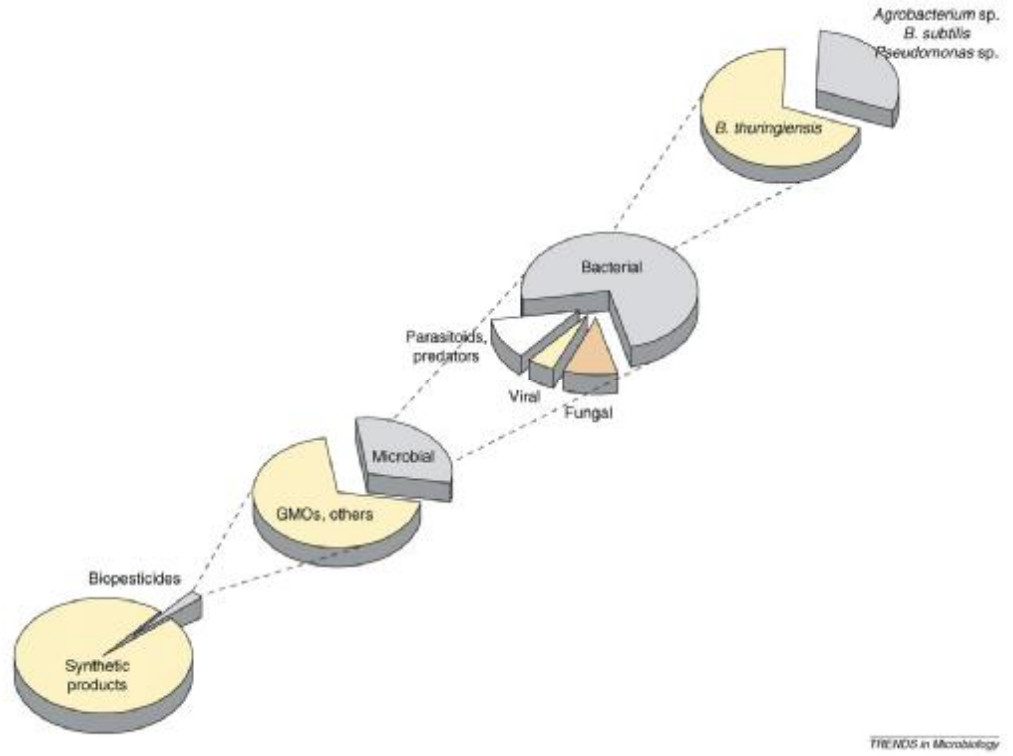
Yıl	Uygun Bulunmayan Parti Sayısı	Uygun Bulunmama Nedenleri		
		Pestisit Kalıntısı	Toksin Kalıntısı	Diğer
2004	141	16	90	35
2005	152	23	111	12
2006	221	21	263	39
2007	284	32	198	64
2008	308	53	192	63
2009 (ilk 4 ay)	89	10	68	11

Dünyada sentetik pestisitlere bağımlılığın önüne geçilmesi amacıyla çevreye ve insana daha az zararlı, ancak ürün kaybına neden olmayacak bir çözümün geliştirilmesinin gereği tartışılmaz boyuttadır. Çözüm arayışları, günümüzde birçok disiplin tarafından yoğun bir bilimsel çalışma alanı olarak karşımıza çıkmaktadır. “Biyolojik Kontrol” terimi ile ifade edilen bu mücadele şekli son yılların en yoğun çalışma konularından biridir.

“Biyolojik Kontrol” terimini; konukçudan hastalık etmenini uzak tutan, yok eden veya azaltan, konukçuyu bağışık ya da dayanıklı kılan başka bir organizmanın kullanılması proseslerini içeren bir disiplindir, şeklinde genel olarak tanımlayabiliriz.

Biyolojik Kontrol amacıyla en yaygın kullanılan mikroorganizmalar arasında *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Streptomyces* türleri sayılabilir (Cawoy ve ark., 2011). *Actinomyces* sp. 1927 yılında ABD’de patates çürüklerine karşı biyolojik kontrol amaçlı kullanılan ilk mikroorganizmadır. (Jung ve ark., 2005)

Araştırmamızın temelini oluşturan *Bacillus* sp. suşlarının antifungal aktivitelerinin incelenmesi yolu ile biyokontrol yetenekleri üzerinde değerlendirme yapılacaktır.



Şekil 1.1. Biyokontrol ajanlarının pestisit pazarındaki payı (Ongena ve Jacques, 2007)

1.1. Biyokontrol Mekanizmaları

Araştırmacılar tarafından incelenen antagonizma mekanizmaları sınıflandırıldığında aşağıdaki tablo ortaya çıkmaktadır.

Çizelge 1.2. Biyokontrol Mekanizmaları (Pal ve Gardener, 2006)

Tipi	Mekanizma	Örnekler
Direkt Antagonizma	Hiperparazitizm	Litik ve bazı litik olmayan mikovirüsler <i>Pasteuria penetrans</i> <i>Trichoderma virens</i>
Karışık Yollarla Antagonizma	Antibiyotikler	2,4-diasetilfloroglukinol Fenazinler Siklik Lipopeptidler
	Litik Enzimler	Kitinaz Glukanaz Proteaz
	Diğer Metabolitler	Amonyak Karbondiyoksit Hidrojen Siyanitler
	Fiziksel\Kimyasal Etkileşimler	Topraktaki gözeneklerin tıkanması Çimlenme sinyallerinin azalması
İndirekt Antagonizma	Rekabet	Salgılar Siderofor
	Konukçu Direncinin Arttırılması	Fungal hücre duvarı ile temas Patojen kaynaklı moleküllerin saptanması Bitkisel hormonlarla sağlanan teşvikleme

1.1.1. Direkt Antagonizma

Hiperparazitizm patojenin direkt olarak özel bir biyokontrol ajanı tarafından saldırıya uğrayarak öldürülmesidir. 4 çeşit hiperparazitlik söz konusu olup bunlar; obligat bakteriyel patojenler, hipovirüsler, fakültatif parazitler ve predatörlük.

1.1.2. Karışık Yollarla Antagonizma

1.1.2.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler patojenleri öldüren ya da onların gelişimlerini inhibe eden sekonder metabolitlerdir. *Bacillus*, *Streptomyces* ve *Pseudomonas* gibi birçok mikroorganizma ile *Penicillium* gibi fungal organizmaların ürettikleri antibiyotikler

hem klinik çalışmalarda hem de gıda ve zirai endüstride, biyokontrol çalışmalarında önem arz etmektedir.

Son yıllarda *Bacillus* sp. türlerinin geniş spektrumlu antibiyotik üretim potansiyelleri üzerinde yoğun çalışmalar mevcuttur. Özellikle patojen hiçbir özelliği bulunmayan ve genomunun yaklaşık % 4-5i antibiyotik sentezine ait olan *Bacillus subtilis* biyokontrol çalışmalarında en dikkat çeken türdür (Ongena ve Jacques, 2007). Bunun yanında *B. amyloliquefaciens* (Wang ve ark., 2012), *B. cereus* (Romeiro ve ark.,2010), *B. licheniformis* (Cui ve ark. 2012), *B. megaterium* (Kildea ve ark., 2008), *B. mycoides* ve *B. pumilis* (Bottone ve Peluso, 2003) de antibiyotik üretim potansiyelleri açısından çalışılan türlerdir.

Bacillus cinsinin ürettiği antibiyotiklerin en etkili sınıfı peptid antibiyotiklerdir. Çeşitli içerik ve boyutlarda olan bu peptid antibiyotikler sadece aminoasitlerden oluşabileceği gibi başka diğer bileşikler de yapısında bulundurulabilirler. Bunlar genellikle peptidaz ve proteazların hidrolitik etkinliklerine karşı da oldukça dirençlidir.

Zwittermicin A ve Kanosamine *Bacillus cereus* tarafından üretilen antibiyotiklerdir ve bu antibiyotiklerin Oomycetes grubuna ait küflere karşı inhibisyon etkisinin olduğu belirlenmiştir. (Silo-suh ve ark., 1998)

Fosfonooligopeptid olan Rhizocticin antifungal ve antinematodal etkinlik gösterirken, antibakteriyel etkinliği bulunmamaktadır.

Bacillus brevis ve *Bacillus polymyxa* ürettiği gramicidin S ve polymyxin B peptid antibiyotiklerinin çileklerde patojen olan *Botrytis cinerea* gelişimi üzerine güçlü inhibisyon etkisi tespit edilmiştir.

Diğer bir grup peptid antibiyotiklerden olan lantibiyotikler ise gram pozitif bakteriler üzerine güçlü antibakteriyel etkisi bulunmakta ancak biyokontrol aktivitesi henüz gösterilmemiştir. Daha basit bir molekül olan dipeptid yapıdaki Bacilysin güçlü antibakteriyel etki göstermiş ve biyokontrolde etkinliği olduğu düşünülmüştür.

Bacillus cinsinin ürettiği peptid antibiyotikler içerisinde ana sınıf olarak kabul edilen Siklik Lipopeptidler 3 ana familya ile temsil edilirler. Bunlar; Surfaktin, İturin ve Fengycin familyalarıdır. Surfaktin ve iturin heptapeptid iken fengycin

lipodekapeptiddir. Bacillomycin ve Mycosubtilin İturin familyası içerisinde yer alan antibiyotiklerdir.

Surfaktin bir biyosüpfektan olup, hemolitik, antiviral, antimikoplazma ve antibakteriyel etkinliği bulunmaktadır. Ancak antifungal aktivitesi bulunmamaktadır. İturin ise güçlü bir antifungal özellik gösterirken, antibakteriyel özelliği çok sınırlı ve antiviral etkinliği hiç bulunmamaktadır. Fengycin ise özellikle filamentöz funguslara karşı olmak üzere güçlü antifungal özellik gösterir. Surfaktin ve İturin, Surfaktin ve Fengycin, İturin ve Fengycin sentezlerinin sinerjistik etkinliği bulunduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. (Ongena ve Jacques, 2007)

Ayrıca Surfaktin *Bacillus* sp. suşlarının daha güçlü biyofilm oluşturmalarını teşvik ederek kolonizasyonlarını sağlar. Biyokontrol açısından surfactinin en önemli iki etkinliği; biyofilm oluşumunu uyarması ve antibakteriyel özelliğidir. (Chen ve ark., 2012)

1.1.2.2. Litik Enzimler

Mikroorganizmalar kitin, protein, selüloz, hemiselüloz ve DNA gibi polimerik bileşikleri hidrolizleyen litik enzimler sentezleyerek patojenlere karşı antagonizma gösterebilirler. (Cawoy ve ark., 2011)(Pal ve Gardener, 2006)

Chitinase, Chitosanase, Protease, β -1, 3 glucanase gibi fungal hücre duvarını degrade eden enzimler patojenlerin biyokontrolünde kullanılan litik enzimlerdir.

1.1.2.3. Diğer Metabolitler

Biyokontrol mekanizmasının çok karışık olduğu, çoğu zaman tek bir yolla tanımlamanın yanıltıcı olabileceği düşünülmektedir. Bazı mikroorganizmalar antibiyotik ve enzim dışındaki bazı sekonder metabolitlerle de patojenlere karşı antagonizma gösterdiği bilinmektedir. Bunlara HCN (Hidrojen Siyanid), Amonyak örnek olarak verilebilir. (Cawoy ve ark. 2011)

Biyokontrol ajanı olan *Bacillus luciferensis* KJ2C12 suşunun proteaz aktivitesi gösterdiği, biyosüpfektan ve HCN ürettiği, biyofilm oluşturduğu ve

fitopatojen olan *Phytophthora capsici*' ye karşı antagonizma gösterdiği tespit edilmiştir. (Kim ve ark., 2009). HCN, sitokrom oksidaz yolağını etkili şekilde bloke eden bir metabolittir.

1.1.3. İndirekt Antagonizma

1.1.3.1. Rekabet

Mikroorganizmalar açısından toprak ve canlı bitki yüzeyleri besin yönünden kısıtlı alanlardır. Bitki yüzeyinde kolonize olabilmesi diğer patojen veya patojen olmayan mikroorganizmalar ve funguslarla rekabet gücünün yüksekliğine bağlıdır.

Yerfıstığında aflatoksin oluşumunu azaltmak amacıyla atoksijenik *Aspergillus flavus* suşları bitkilere püskürtülerek toksijenik *Aspergillus flavus* suşlarının kolonizasyonu engellenmiştir. (Geiser ve ark., 2000)(Huang ve ark., 2011)

Bu rekabet her zaman yer ve besin açısından olmaz. Demir gibi elementleri kullanabilmek için de rekabet sözkonusu olabilir. Demir toprağın pH değerine bağlı olarak toprakta çok az miktarda bulunur. Yüksek oranda okside olur ve havalandırılmış topraklarda suda çözünmeyen ve ferik formda bulunur ve konsantrasyonu 10^{-18} M kadar düşük olabilir. Bu oran mikroorganizma gelişimi için optimum miktar olan 10^{-6} M ile kıyaslandığında çok düşüktür. Bu koşullarda hayatta kalabilmek için organizmalar mikroçevrelerden demiri yakalamak için yüksek affinite gösteren siderofor denilen demir bağlayıcı ligandlar salgılamaktadır. Hemen hemen tüm mikroorganizmalar kateşol veya hidroksamat tipindeki sideroforları üretmektedir (Pal ve Gardener, 2006).

1.1.3.2. Konukçu Direncinin Arttırılması

Toprakta bulunan birçok mikroorganizma bitkilere zarar verirken, %20' den az bir kısmı da bitkinin gelişimini doğrudan veya dolaylı yollarla teşvik eder. Bu yararlı mikroorganizmalara PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) denilmekte olup son yılların önemli çalışma konularındandır.

1.2. *Bacillus* Cinsi

Bacillus cinsine ait bakteriler gram pozitif, 0.5- 1.2 μ m eninde 2.5-10 μ m boyunda basillerdir. Genellikle aerobik olmalarına karşın bazıları fakültatif aerobik özellik gösterirler. Gram boyama preparatlarında gözlenebileceği üzere tek veya çok sayıda hücreden oluşan uzun zincirler oluşturabilirler. Koloni morfolojileri besiyeri içeriği ve inkübasyon sıcaklığı gibi çevresel faktörlere göre değişmektedir.

Bacillus anthracis şarbon hastalığından sorumludur. *Bacillus cereus* ise emetik toksin ve enterotoksin salgılar ve gıda zehirlenmelerinden sorumludur. Bu iki tür dışındaki cinsin tüm üyeleri saprofitik olup genellikle patolojik özellik göstermezler.

Olumsuz çevre koşullarına dayanıklı olmalarını sağlayan spor oluşturma yetenekleri aynı zamanda izolasyonlarını da kolaylaştırmaktadır. Hücrede yer alan sporun yeri ve şekli türler arasında farklılık gösterebilir.

Bacillus cinsi üyelerinin tümü katalaz pozitifdir. Genellikle hareketli olmaları nedeniyle optimum koşullarda petri kabının tüm yüzeyini kolaylıkla kaplayabilirler.

1.2.1. *Bacillus* Cinsinin Biyolojik Kontroldeki Yeri

Bacillus genusu ürettiği birçok sekonder metabolit sayesinde biyokontrolün baş aktörlerinden bir tanesidir. Bu metabolitler geniş spektrumlu olup, ekstrem koşullara dayanıklılıkları ile de biyokontrol çalışmalarında önem arz etmektedir. Ayrıca sporlu olmalarından dolayı ticari olarak formülasyonlarının kolaylığı ve olumsuz koşullara dayanıklı olmaları nedeniyle diğer türlere göre avantajlı durumdadırlar (Grover ve ark, 2009, Cawoy ve ark.,2011).

Bacillus genusu 3 temel mekanizmayı kullanarak biyolojik kontrolü sağladığı düşünülmektedir. Bunlar; ekolojik niş ve besin rekabeti, inhibitör kimyasalların üretimi, bitki direncinin teşviki şeklinde sıralanabilir. Ancak çok karmaşık bir kurgu olan biyokontrolün mekanizmalarını açıklarken aralarındaki sınırların keskin çizgilerle belirlenmesinin mümkün olmadığı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Örneğin; biyokontrol ajanı olarak ticari piyasada yer alan bir *Bacillus* sp. suşunun

gerek patojen türler ile gerekse habitat içerisindeki diğer türlerle güçlü bir rekabet yeteneğine sahip olmalı ki, kolonizasyonu sağlayarak antibiyotik üretimi yoluyla bu işlevini yerine getirebilsin. (Cawoy ve ark.,2011).

Çizelge 1.3. Piyasada bulunan Biyokontrol ajanı *Bacillus* sp. ürünlerinin etki spektrumları ve kullandıkları mekanizmalar (Cawoy ve ark, 2011)

Ürün	Biyojan	Etki Mekanizması	Hastalık/Hedef Patojen	Ürün	Kabul Edilen-Piyasaya Sürülen Ülke
Avogreen®	<i>B. subtilis</i>	Antibiyosis	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ve <i>Cercospora</i> leke hastalığı	Avokado	Güney Afrika
Bacillus SPP®	<i>Bacillus</i> spp.	Antibiyosis	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Birçok ürün	Şili
Ballad®	<i>B. pumilus</i>	Antibiyosis, rekabet, konukçu gelişimini teşvik etme ve konukçu direncinin artırılması	Kök çürüklüğü (<i>Rhizoctonia oryzae</i>), pas (<i>Puccinia</i> spp., <i>Uromyces betae</i> , <i>Puccinia sorghi</i>), külleme (<i>Peronospora manshurica</i> , <i>Erysiphe graminis</i> , <i>Erysiphe betae</i> , <i>Erysiphe polygoni</i>), yaprak leke hastalığı (<i>Cercospora</i> , <i>Cercospora beticola</i> <i>Entyloma</i> , <i>Dreschlera</i> , <i>Exserohilum turcicum</i> , <i>Helminthosporium</i> , <i>Bipolaris maydis</i> , <i>Cochliobolus heterostrophus</i> , <i>Cochliobolus</i> , <i>Ceratobasidium</i> , <i>Ramularia</i>), bakteriyel leke hastalığı (<i>Xanthomonas</i> spp.), <i>Phakopsora pachyrhizi</i>), kahverengi leke hastalığı (<i>Septoria glycines</i>), beyaz küf hastalığı (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	Tahıl ürünleri, yağlı bitkiler, şeker pancarı	ABD
Bio safe®	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibiyosis	Yaprak yanıklığı	Soya fasulye, pamuk	Brezilya
Cease®	<i>Bacillus subtilis</i>	---	Toprak kaynaklı patojenler (<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i>) ve yaprak patojenleri (<i>Botrytis</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Xanthomonas</i>)	Birçok ürün	ABD, Meksika

Biosubtilin	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibiyosis, rekabet	<i>Fusarium, Verticillium, Pythium, Cercospora, Colletotrichum, Alternaria, Ascochyta, Macrophomina, Myrothecium, Ramularia, Xanthomonas</i> ve <i>Erysiphe polygoni</i>	Pamuk, tahıl ürünleri, süs bitkisi ve sebzeler	Hindistan
Botrybel	<i>Bacillus velezensis</i>	---	<i>Botrytis cinerea</i>	Domates, marul, biber, asma, çilek	İspanya
Companion®	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibiyosis Rekabet Konukçu gelişimini teşvik etme ve konukçu direncinin artırılması	Kök çürüklüğü (<i>Aspergillus, Golovinomyces cichoracearum, Fusarium oxysporum, Fusarium nivale, Magnaporthe poae, Phytophthora, Pythium, Rhizoctonia solani, Sclerospora graminicola, Sclerotinia minor</i>), yaprak leke hastalığı (<i>Alternaria, Botrytis cinerea, Colletotrichum orbicular, Colletotrichum, Didymella bryoniae, Erwinia carotovora, Erwinia tracheiphila, Plasmodiophora brassicae, Podosphaera xanthi, Pseudomonas syringae, Xanthomonas campestris</i>)	Pamuk	ABD
EcoGuard™ Biofungicide	<i>Bacillus licheniformis</i>	Antibiyosis Enzimler	Antracnose (<i>Colletotrichum graminicola</i>) leke hastalığı (<i>Sclerotinia homeocarpa</i>)	Spor sahası çimi ve botanik bahçeleri	ABD
Ecoshot	<i>Bacillus subtilis</i>	---	Kurşuni küf (<i>B. cinerea</i>)	Asma, limon, sebze, baklagiller	Japonya
Yield Shield®	<i>B. pumilus</i>	---	Kök çürüklüğü (<i>R. solani</i> ve <i>Fusarium</i>)	Soya	ABD
HiStick N/T® / Subtillex® / Pro-Mix®	<i>Bacillus subtilis</i>	---	Kök çürüklüğü ve tohum uygulamaları (<i>Fusarium, Rhizoctonia solani, Aspergillus, Pythium</i> ve <i>Alternaria</i>)	Soya, süs bitkileri ve diğer bitkiler	ABD, Kanada

FZB24®WG, li ve TB	<i>Bacillus subtilis</i>	---	Kök çürüklüğü ve solgunluk (<i>Alternaria</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Curvularia radicola</i> , <i>Curvularia inequalis</i> , <i>Corynebacterium michiganense</i> , <i>E. carotovora</i> , <i>Fusarium avenaceum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gerberae</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> , <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>narcissi</i> , <i>Gaeumannomyces graminis</i> , <i>Gerlachia niveale</i> , <i>Phoma chrysanthemi</i> , <i>Phomopsis sclerotoides</i> , <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> , <i>P.ultimum</i> , <i>R. solani</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>Stromatinia freesia</i> , <i>Verticillium</i> spp.)	Birçok ürün	Almanya
Kodiak®	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibiyosis, rekabet, konukçu gelişimini teşvik etme ve konukçu direncinin artırılması	Toprak kaynaklı hastalıklar (<i>Rhizoctonia</i> ve <i>Fusarium</i>)	Pamuk	ABD
Rhizo Plus®	<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	---	Toprak kaynaklı patojenler	Birçok ürün	Almanya
RhizoVital®42 li ve RhizoVital 42TB	<i>B. amyloliquefaciens</i>	---	Toprak kaynaklı patojenler	Patates, mısır, çilek, domates, süs bitkileri, salatalık	Almanya
Sublic®	<i>Bacillus</i> sp.	---	Kök çürüklüğü ve solgunluk (<i>Botrytis</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Macrophomina</i> , <i>Phomopsis</i> ve <i>Pythium</i>)	Birçok ürün	İtalya

Rhapsody®	<i>Bacillus subtilis</i>	---	Antraknoz (<i>Colletotrichum</i> spp.), bakteriyel yaprak leke hastalığı (<i>Erwinia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i>), yaprak leke hastalığı (<i>Cercospora</i> , <i>Entomosporium</i> , <i>Helminthosporium</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Septoria</i> , <i>Diplocarpon rosea</i>), kurşuni küf (<i>B. cinerea</i>), Bağ Mildiyözü (<i>Peronospora</i> spp.), erken yanıklık (<i>Alternaria</i>), külleme (<i>Erysiphe</i> , <i>Oidium</i> , <i>Podosphaera</i> , <i>Sphaerotheca</i>), pas (<i>Puccinia</i>), scab (<i>V. inaequalis</i>), kök çürüklüğü (<i>R. solani</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i>), toprak kaynaklı diğer hastalıklar (<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> ve <i>Phytophthora</i>)	Çim alanları ve orman, süs bitkileri	ABD, Kanada
Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibiyosis	Kurşuni küf (<i>B. cinerea</i>), Botrytis (<i>B. cinerea</i>), erken yanıklık (<i>Alternaria solani</i>), geç yanıklık (<i>Phytophthora infestans</i>), külleme (<i>Leveillula taurica</i> , <i>Oidiopsis taurica</i> , <i>Erysiphe chichoracearum</i> , <i>Erysiphe</i> spp., <i>Sphaerotheca macularis</i> , <i>Sphaerotheca</i> spp., <i>Podosphaera clveestina</i> , <i>Podosphaera leucotricha</i> , <i>Uncinula necator</i>), erken yaprak leke hastalığı (<i>Cercospora</i> spp.), bakteriyel leke hastalığı (<i>Xanthomonas</i> spp.), ceviz yanıklığı (<i>Xanthomonas campestris</i>), ateş yanıklığı (<i>Erwinia amylovora</i>), antraknoz (<i>Colletotrichum</i>), beyaz küf hastalığı (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	Asma, elma, şeftali, muz, vişne, ceviz, fındık, domates, biber, kabak, mango, fasulye, soğan, sarmısak, patates, brokoli, havuç	Şili, ABD, Meksika, Japonya, İsrail, Kosta Rika, Filipinler, Guatemala, Honduras, Arjantin, İtalya, Fransa, Türkiye, Kore, Ekvador, Peru
Sonata®	<i>B. pumilus</i>	---	Külleme (<i>Oidiopsis taurica</i> , <i>Erysiphe</i> spp., <i>Erysiphe chichoracearum</i> , <i>Uncinula necator</i> , <i>Sphaerotheca</i> spp., <i>Sphaerotheca macularis</i> , <i>Podosphaera leucotricha</i>), erken yanıklık (<i>Alternaria solani</i>), geç yanıklık (<i>Phytophthora infestans</i>)	Domates, patates, asma, çilek, kabak, biber, elma, şeftali	ABD, Meksika, Peru, Almanya

1.3. *Candida* sp.

Candida cinsi mantarlar *Cryptococcaceae* familyasından olup 30dan fazla tür ile temsil edilirler. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, *C. viswanathii*, *C. parapsilosis* bilinen en yaygın türleridir.

C. albicans insanlarda Kandidiyazis hastalığına neden olur. *Candida* aynı zamanda gıda bozulma etkeni olan mayalardandır. Düşük su aktivitesi ve düşük pH koşullarında gelişebilmelerinden dolayı sebze, meyve suyu gibi içeceklerde bozulmalara neden olduğu bilinmektedir. Peynir ve şarabın bozulmasına da neden olurlar.

Bu organizmaların izolasyonları sorun oluşturmaz. Antifungal madde bulunmayan hemen tüm besiyerlerinde ürerler. Mısır unlu jeloz besiyerinde klamidospore yapmaya eğilimlidir. Bu sporlar pseudomiselyumlar ucunda gelişir ve 7-8 µm çapındadır.

1.4. Küfler Hakkında Genel Bilgi

Küfler geniş pH aralığında (pH 2-9), geniş sıcaklık aralığında (10-35 °C) ve geniş nem oranlarında üreyebilmektedir. Ayrıca zor çevre koşullarına bir çok organizmadan daha iyi adapte olabilirler. Gelişmeleri için bakterilerden ve mayalardan daha az suya ihtiyaç duyarlar ve bakterilerin tolere edebileceğinden daha fazla tuz ve şeker konsantrasyonunda kolaylıkla gelişebilir. Pektin ve diğer kompleks karbonhidratları, organik asitleri, proteinleri ve lipitleri kullanabilmektedirler.

Birçok küf aerobiktir ve karbondioksit gelişimlerini engeller. Belli bir karbondioksit konsantrasyonundan sonra küf gelişimi tamamen durur.

1.4.1. *Alternaria* sp.

Alternaria genusunun saprofitik türleri bulunduğu gibi bazı bitkiler üzerinde önemli hastalıklara neden olan parazitik türleri de mevcuttur. Ayrıca alerjik reaksiyonlara neden olduğu bilinmekte olup saman nezlesinin nedenleri arasındadır.

Çizelge 1.4. Fitopatojenik *Alternaria* genusuna ait türler hedefi konukçu bitkiler (Webster ve Weber, 2007)

<i>Alternaria</i> Türü	Konukçu Bitki
<i>Alternaria alternata</i>	Birçok tür üzerinde patojen
<i>Alternaria brassicae</i> , <i>A. brassicicola</i>	Lahana
<i>Alternaria dauci</i> , <i>A. radicina</i>	Havuç
<i>Alternaria dianthi</i>	Karanfil
<i>Alternaria linicola</i>	Keten
<i>Alternaria macrospora</i>	Pamuk
<i>Alternaria mali</i>	Elma
<i>Alternaria porri</i>	Soğan
<i>Alternaria solani</i>	Patates, domates

1.4.2. *Aspergillus* sp.

Aspergillus cinsi mensuplarının sporları hava ve toprakta boldur. Karbonhidrat bakımından zengin ekmek, şekerli meyve sularında ve peynirde yaşar ve miseli gençken beyazdır. Saprofittir, bazı türleri bitki ve hayvanda patojeniktir. Tür teşhisi, meydana getirdikleri koloninin rengine göre yapılır.

En yaygın türleri *Aspergillus glaucus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* olup son üçü insanda ve hayvanlarda aspergilloz hastalığına neden olur. *Aspergillus flavus* *A. Paraciticus*, ve *A. nomenus*’ un ürettiği “ aflatoksin” verftığı ve kabuğu soyulmuş fındık gibi yağlı yemiş materyalinde birikmektedir. Aflatoksin kanserojenik olması bakımından halk sağlığı açısından önemlidir. *Aspergillus niger* rutubetli ve havasız yerlerde depolanmış olan sarmısak, soğan, depodaki portakal, yer fıstığı, kuru erik, nohut gibi ürünlerde, tarım alanlarındaki bitkilerde siyah çürüklük hastalığına yol açar.

1.4.3. *Penicillium* sp.

Penicillium gıdalar açısından önem taşıyan ve yaygın olarak görülen bir küf cinsidir. *Penicillium* cinsi küfler konidioforlardan konidi üretirler. Oluşturdukları koloninin rengi tür teşhisinde belirleyici değildir.

Penicillium' lar hemen hemen her türlü gıda maddesi üzerinde görmek mümkündür. Toprak, hava, toz, unlu gıdalar, meyveler üzerinde yaygın olarak bulunurlar.

P. verrucosum, *P. viridicatum* ve *P.aurantiogriseum* hububatlarda yaygın olarak bulunurlar ve okratoksin ve penisilik asiti içeren birçok mikotoksin üretirler. *P. aurantiogriseum* yüksek nem içeren mısırlarda bulunur ve penisilik asit üretir. *P. expansum* elmada, *P. italicum* ve *P. digitatum* ise turuncgillerde yumuşak çürümeye neden olmaktadır.

1.5. *Trametes versicolor*

Polyporaceae grubuna ait beyaz çürükçül mantarlardandır. Dünyada çok yaygın olan odun tahripçisidir. Ürettikleri ligninolitik enzimler sayesinde çevre biyoteknolojinde geniş alanlarda kullanılmaktadır. Crystin (PSC) adıyla bilinen çok değerli tıbbi bileşikler içerir. Kanserlerin çoğunu ve AIDS gibi viral birçok hastalığı baskıladığı gösterilmiştir (Güzeldağ, 2007).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Bacillus* Cinsi ile Yapılan Biyokontrol Çalışmaları

Chittara ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan çalışmada hasat öncesi mısırdan izole edilen *Bacillus subtilis* YM10-20 suşunun ürettiği antifungal bileşiğin *Penicillium roqueforti*' nin spor çimlenmesi ve gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bileşiğin sıcaklığa karşı çok stabil olduğu, proteolitik degradasyona dirençli olduğu, kolesterol varlığında aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Bu karakteristik özelliklere sahip bileşiğin İturin benzeri bir bileşik olduğu düşünülmüştür. İturin benzeri bileşiklerin fungal sporların geçirgenliğini arttırdığı ve bu yolla çimlenmeyi inhibe ettiği belirtilmiştir.

Kim ve arkadaşları (2003) tarafından *Bacillus* GB-017 ve GB-0356 suşları üzerinde yapılan çalışmalarda *Botrytis cineria*, *Fusarium sp.*, *Pythium sp.*, ve *Rhizoctania solani*' ye karşı antifungal bileşik ürettikleri gösterilmiştir. Bu antifungal bileşiğin etkinliğini pH 9' a ve 80°C' ye kadar devam ettirdikleri ortaya konulmuştur.

Broggini ve arkadaşları (2005) biyokontrol ajanı olarak Biopro ticari ismiyle piyasaya sürülen *Bacillus subtilis* BD170 suşunun kullanımından itibaren 2 yıl boyunca izlemişlerdir. Elma, şeftali ve diğer çekirdekli meyvelerin patojeni olan *Erwinia amylovora*' nı neden olduğu ateş yanıklığı hastalığının biyokontrolünde kullanılan suşa eklenen spesifik bir marker sayesinde izlenmiş ve ağaçların çiçeklenme döneminde uygulandığında etkili bir şekilde pistillerde kolonize oldukları görülmüştür. Daha sonra ikinci kolonizasyonun yani bakteriyel yayılmanın tomurcuklanma ya da çiçeklerin kapanması döneminde olduğu görülmüştür. Bal arılarının Biopro®' nun yayılmasını sağladığı görülmüş olup dolayısıyla bal kovanlarının enfekte olduğu tespit edilmiştir. *Bacillus subtilis*'in bilinen bir zararı olmamasına karşın bu durumun neden olabileceği olumsuz etkiler üzerinde çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Liu ve arkadaşları (2007) *Bacillus subtilis* B-916 suşu ile yaptıkları çalışmalarda antifungal etkinliği bulunan, moleküler kütlesi 41,9 kDa olan ve

“ bacisubin” ad verdikleri yeni bir protein izole etmişlerdir. Bacisubin’ in daha önce bildirilen antifungal proteinlerden moleküler kütesinin farklı olduğu, daha geniş spektruma sahip olduğu (*Magnaporthe griseae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria oleracea*, *Alternaria brassicae* and *Botrytis cinerea*) ve N-terminal ucun bilinen *Bacillus* orijinli antifungal proteinlerden farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca sözkonusu proteinin proteinaz ve proteinaz inhibitörü aktivitesinin olmadığı, buna karşılık hemaglutinasyon ve ribonükleaz aktivitesinin mevcut olduğu gösterilmiştir. Bacisubin’ in sadece misel gelişimini inhibisyonu üzerine deneyler yapılmış, spor çimlenmesine etkisi incelenmemiştir.

Fernando ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada dört bakteriyal suşu *Pseudomonas chlororaphis* (PA-23), *Bacillus amyloliquefaciens* (BS6), *Pseudomonas* sp. (DF41) ve *B. amyloliquefaciens* (E16)’ın kanolada kökte çürümeye neden olan *Sclerotinia sclerotiorum*’ a karşı biyokontrol aktivitelerini sera ve tarla koşullarında incelemişlerdir. *P. chlororaphis* PA-23’ ün askospor çimlenmesini inhibe ettiğini göstermiştir. İki yıl süren tarla denemeleri sonucunda ise *P. chlororaphis* PA-23 ve *B. amyloliquefaciens* BS6’ın biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Intana ve arkadaşları (2008) Rambutan bitkisi yaprak yüzeyinden izole ettikleri *Bacillus* sp. B-NST-01, B-NST-02, B-NST-03, B-NST-04 suşlarının antifungal aktivitelerini incelemişlerdir. Özellikle B-NST-02 ve B-NST-03 suşlarının domates çökerten hastalığına neden olan *Pythium aphanidermatum* patojenine karşı hem laboratuvar hem de sera koşullarında antifungal etkinliğini göstermişlerdir.

Baysal ve arkadaşları (2008) patojen ile enfekte domates rizosferinden izole ettikleri *Bacillus subtilis* EU07 ile yaptıkları çalışmalarda *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* üzerine güçlü antifungal etkisi olduğunu göstermişlerdir. Ticari biyocontrol ajanı olan *B. subtilis* QST 713 (Serenade) sözkonusu patojene karşı % 53 inhibisyon oranı gösterirken, *B. subtilis* EU07 suşunun %75 gibi yüksek bir oranda inhibisyonu tespit edilmiştir. Her iki suşun da Fen D, Bmy A ve Itu C genlerine sahip olduğu, inhibisyondaki farklılığa neden olan ise quorum sensing ile ilişkili olan ve biocontrol verimliliği ile doğru orantılı olan HLS (Acyl-homoserine lactonose) üretiminin etkili olabileceği düşünülmüştür.

Chung ve arkadaşları (2008) topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* ME488 suşunun 42 farklı toprak kaynaklı bitki patojeninin 39' u üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiklerini tespit etmişlerdir. ME488 suşunun Bacilysin, iturin ve mersacidin genlerini taşıdığını belirlemişlerdir. Ürettikleri sözkonusu antibiyotikleri aracılığıyla salatalık patojeni *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ve biber patojeni *Phytophthora capsici*'ye karşı biyokontrol amacıyla kullanılabileceğini de göstermişlerdir.

Kim ve arkadaşlarının (2009) topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* CMB32 suşunun, ticari öneme sahip bitkilerde antraknoz hastalığı etkeni olan *Colletotrichum gloeosporioides* üzerinde antifungal aktiviteleri üzerinde çalışmışlardır. Sözkonusu suşun 3 antifungal lipopeptid ürettiği, bunlardan Fengycin ve iturin A' m tek başlarına antifungal aktivitelerinin bulunduğunu, diğer lipopeptid olan surfactin A' m ise iturin A ile sinerjistik faktör olarak rol oynadığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada M9 besiyerine ilave edilen Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cs^{+} , Ni^{+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} metal iyonları eklenmiş ve *Bacillus subtilis* CMB32 suşunun lipopeptid üretimini Mn^{2+} iyonunun 2,6 kat arttırdığını tespit etmişlerdir.

Yang ve arkadaşları (2009) tarafından Çinde izole edilen *Bacillus subtilis* NJ-18 suşunun *Rhizoctonia solani* ve *Sclerotinia sclerotiorum* fungal patojenlerine karşı etkinliği gösterilmiştir. Daha önce yapılan farklı çalışmalarda *Rhizoctonia solani*' ye karşı % 30 – 80 düzeyinde, *Sclerotinia sclerotiorum*' a karşı %30 – 50 kontrol verimliliği sağlanmış iken NJ-19 suşunun sırasıyla %100 ve %77 düzeylerinde kontrol verimliliği gösterdiği saha deneyleriyle tespit edilmiştir.

Kumar ve arkadaşları (2009) topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* MTCC-8114 suşunun dermatolojik hastalık etkeni olan *Microsporum fulvum* ve *Trichophyton spp.* üzerindeki inhibisyonunu incelemiştir. Antifungal bileşik ürettiği belirlenen *Bacillus subtilis* MTCC-8114 suşunun antifungal etkinliğinin farklı besiyeri içeriği, pH, inkübasyon periyodu, aerasyon ve sıcaklık gibi değişkenlerin etkisi araştırılmıştır. Besiyeri olarak nutrient broth (NB), sucrose broth (SB), trypticase dextrose broth (TDB) ve trypticase soya broth (TSB) kullanılmış ve TSB ortamındaki antifungal üretimin maksimum olduğu tespit edilmiştir. TSB besiyerinde diğer değişkenlerin etkisi incelenmiştir. Diğer değişkenler ise 37 °Cde 120 rpmde

statik duruma oranla daha fazla antibiyotik ürettiği görülmüşken, pH 7 de 48 saatlik inkübasyon periyodu sonunda ve 37 °Cde optimum antibiyotik üretimi şartları olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca farklı solventler ile yapılan ekstraksiyonlarda sadece kloroform ekstraksiyonunda antifungal aktivitenin devam ettiği gözlenmiştir. Yapılan kromotagrafik analizi antifungal bileşiğin protein yapısında olduğunu göstermiştir. Antifungal bileşiğin Minimum İnhibisyon Konsatrasyonu (MIC) da belirlenmiş ve *Microsporum fulvum*’ un *Trichophyton spp.*den daha hassas olduğu görülmüştür. Araştırmacılar tarafından, bu veriler ışığında sözkonusu dermatofitlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı *Bacillus subtilis* MTCC-8114 suşunun dikkate değer sonuçlar gösterdiği kanaatine varılmıştır.

Maldonado ve arkadaşları (2009), *Geotrichum candidum* fitopatojenine karşı biyokontrol ajanı çalışmaları dahilinde izole ettikleri *Bacillus* sp. IBA 33 suşunun ürettiği antifungal metaboliti karakterize etmeye çalışmışlardır. Biyokimyasal ve moleküler yöntemler neticesinde antifungal bileşiğin iturin familyasına mensup siklik bir lipopeptid olduğu anlaşılmıştır. Bileşiğin farklı sıcaklıklarda (20-30-40-60-100-121 °C) etkinliğini devam ettirdiği görülmüştür. İturin familyasına ait olan bu bileşiğin yeni bir fungisid olduğu, ancak karakterizasyonu için daha ileri araştırmaların yapılması gerektiği bildirilmiştir.

Živković ve arkadaşları (2010) meyvelerde antraknoz hastalığı etkeni olan *Colletotrichum acutatum* ve *C. gloeosporioides* üzerine antagonistik olan farklı mikroorganizmaların etkinliklerini karşılaştırmışlardır. Bu amaçla sıkça kullanılan *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Streptomyces* ve *Bacillus* türlerinin sözkonusu fitopatojenlerle ilişkileri incelenmiştir. Fungal antagonistler *Trichoderma* ve *Gliocladium* konidial çimlenmeyi ortalama inhibe ederken, *Streptomyces* suşları ve *B. subtilis* güçlü bir inhibisyon göstermiştir. Misel gelişimi üzerine etkileri de incelenmiş olup, farklı mekanizmaları (rekabet, antibiosis gibi) içeren bir antagonizma gözlenmiştir.

Nihorimbere ve arkadaşları (2010) Kongo topraklarından izole edilen *Bacillus subtilis* S499 suşunun domates patojeni olan *Fusarium*’ u inhibisyonu ve domates bitkisinin gelişimini teşvik etmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Laboratuvar şartlarında antifungal etkinliği gösterilen S499 suşu 2 yıl boyunca domates

yetiştirilen arazilere de uygulanmış olup domates bitkilerinin gelişimine ve meyve verimine olumlu katkılarının olması yanında *Fusarium* patojenine karşı da yüksek düzeyde koruma sağladığı gösterilmiştir.

Grover ve arkadaşları (2010) bir çok fitopatojenik mantar üzerinde antagonistik etki gösteren *Bacillus subtilis* RP24 suşu üzerinde çalışmalar yapmıştır. RP24 suşunun ürettiği antifungal metabolitlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu sonucunda iturin A, surfaktin ve fengycin lipopeptidlerinin varlığı gösterilmiştir. Kimyasal bir mutajen vasıtasıyla gerçekleşen mutasyon, RP24 suşunun antibiotik üretmesini sonlandırmıştır. Bu durum, geniş bir antifungal spektruma sahip bileşik ve etkili bir biyokontrol ajanı elde etmek için 3 lipopeptidin de beraber sentezlenmesi gerektiği sonucuna varılmasını sağlamıştır.

Thasana ve arkadaşları (2010) karides kabuğu atıklarından izole ettikleri *Bacillus subtilis* SSE4 suşu ile yaptıkları çalışmalarda fitopatojenik mantar olan *Colletotrichum gloeosporioides* ve *Sclerotium rolfsii* üzerinde oldukça yüksek antifungal etkisi bulunduğunu göstermişlerdir. SSE4 suşu TSB sıvı besiyerinde 4 saat (exponential faz) ve 48 saat (stationer faz) üretilmiştir. Kültür filtratları % 10, % 20, % 30 oranlarında PDA besiyerine eklenmiş ve stationer faz kültür filtratlarının tüm oranlarda yüksek derecede mantar gelişimini inhibe ettikleri gözlenmiştir. Yapılan in vivo çalışmalarda; kimyasal bir antifungal ajan olan Mancozeb ile SSE4 suşu kültür filtratlarının benzer düzeyde antifungal etkinlik gösterdikleri gözlenmiştir. Ayrıca organik solvent ile ekstraksiyonu yapılan kültür filtratlarının *Saccharomyces cerevisiae*' nin yanı sıra gram pozitif ve gram negatif bir çok bakteri türü üzerinde ve hatta insanlarda patojen olan *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter cloacae* ile fitopatojen *Xanthomonas campestris* üzerinde de toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumun önceki çalışmalardan farklılık göstermesi üzerine yapılan moleküler ve biyokimyasal analizler neticesinde “ Subtulene A” adı verdikleri 8 aminoasit içeren yeni bir lipopeptid keşfedilmiştir. Subtulene A’ nın sitotoksik aktivitesi de incelenmiş ve antitümör etkinliğinin olduğu da düşünülmüştür.

Liu ve arkadaşları (2011) bir gıda katkısı olan Sodyum bicarbonat'ın biyocontrol etkinliği üzerine yaptıkları çalışmada, biyokontrol ajanı olan *Bacillus subtilis* ile sodyum bikarbonat kombinasyonunun fitopatojen olan *Botryosphaeria*

berengeriana üzerindeki inhibisyonunu ele almışlardır. *Bacillus subtilis* ile sodyum bikarbonat kombinasyonun fitopatojenin kontrolünde etkinliği tek başına uygulamalara göre önemli ölçüde arttırdığını göstermişlerdir.

Lin ve arkadaşları (2011) *Bacillus subtilis* BS-99, BS-23857 ve BS-33608 üzerinde yaptıkları çalışmada sözkonusu *Bacillus* suşlarının üritildiği fermentasyon besiyerinin MeOH, *n*-hexane ve EtOAc ile yapılan ekstraksiyonlarının *Pestatiopsis eugeniae* patojenine karşı antifungal etkinlikleri, PDA üzerindeki etkinlikleri ile karşılaştırılmıştır. BS-99 suşunun *P. eugeniae* patojenine karşı PDA üzerindeki etkinliği oldukça yüksek olmasına karşın diğer suşların etkinliği gözlenmemiştir. Ayrıca BS-99 suşunun fermentasyon besiyerinin MeOH ekstratının antifungal etkinliği gözlemlenirken, diğer ekstraksiyonların antifungal etkinliği hiç gözlenmemiştir. BS-99 suşunun iturin A ve surfaktin genlerine sahip olduğu gösterilirken, diğer suşların iturin A genine sahip olmadığı ancak surfaktin ekspresyonu yaptıkları gösterilmiştir. Bu çalışmada surfaktin ile iturin A'ın sinerjik etki gösterdikleri de anlaşılmıştır.

Coşkuntuna ve arkadaşları (2011) marulda *Botrytis cinerea* (Pers)'in neden olduğu kurşuni küf hastalığına karşı *Bacillus subtilis* (1.7x10⁹ cfu/g, B. s. 1) içerikli biyolojik preparat, piyasada domateste *B. cinerea*'ya ruhsatlı *Bacillus subtilis* QST 713 ırk (1x10⁹ cfu/ml, B. s. 2) içerikli preparat, test fungusidi olarak da fenhexamide etkili maddesi kullanılarak etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, hastalığı önlemede test fungusidi, *B. subtilis* QST 713 ve denemeye alınan *B. subtilis* 1 sırasıyla % 72.89, % 23.03 ve % 49.38 oranlarında etkili bulunmuşlardır.

Yiğit ve Baysal (2011) domateste Geç Yarıklık etkeni *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary' e karşı biyolojik mücadele etmenlerinin etkinliğini arttırmak amacıyla iklim odalarında yürüttükleri çalışmada *Bacillus subtilis* Y 1336 izolatının bor, kalsiyum klorür, potasyum ve mankozep+metalaxyl ile farklı kombinasyonları uygulanmıştır. Sadece *B. subtilis* uygulanmış bitkilerde hastalık şiddetinin 2.40, *B. subtilis* + bor uygulamasında 1.42, *B. subtilis*+bor+kalsiyum klorür+potasyum sülfat uygulamasında 1.04, *B. subtilis*+mankozep+metalaxyl uygulamasında 0.42 ve kontrol bitkilerde ise 3.81 şeklinde olduğu tespit edilmiştir. *B. subtilis*+mankozep+metalaxyl kombinasyonu % 89, *B. subtilis*+bor+kalsiyum

klorür+potasyum sülfat ise hastalığı % 73 kontrol ettiği gösterilmiştir. Metalaxyl EPA tarafından düşük riskli ya da çevre dostu olarak nitelendirilen pestisidlerdendir.

Wang ve arkadaşları (2012) *Bacillus amyloliquefaciens* IMAUB1034 suşu ile yaptıkları çalışmalarda *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Phytophthora drechsleri* Tucker, *Fusarium oxysporum* ve *Glomerella cingulata* olmak üzere geniş spektrumlu surfaktin analogu bir antifungal bileşik ürettiğini göstermişlerdir. Suşun ürettiği antifungal bileşik ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde etkinliğini devam ettirmiştir.

Li ve arkadaşları (2012) tarafından Salatalık (*Cucumber spp.*) bitkisi kökünden izole edilen *Bacillus subtilis* B068150 suşu üzerinde yapılan çalışmalarda *Fusarium* solgunluğu etkeni olan *Fusarium* mantarına karşı antifungal etkinliği gösterilmiştir. *Bacillus subtilis* B068150 suşunun antifungal etkinliğinin PCR ile amplifiye edilen Fengcin antibiyotiği sentezinden sorumlu *fenB* ve Surfactin antibiyotiği sentezinden sorumlu *sfp* genlerine sahip olmasından kaynaklandığı gösterilmiştir. Ayrıca suşun güçlü biyofilm tabakası oluşturma yeteneği bitkiye bir çeşit biyobariyer oluşturarak patojen enfeksiyonlarına karşı koruma sağlayabileceği düşünülmüştür.

Rebib ve arkadaşları (2012) tuzlu topraklardan izole ettikleri *Bacillus subtilis* SR146 suşunun buğdayın kök çürüklüğü etmeni olan *Fusarium* patojeninin biyokontrol etkinliğini incelemişlerdir. Yapılan çalışmalarda SR146 suşunun TSB besiyerinde stationer fazda antifungal bileşik ürettikleri ve moleküler ve biyokimyasal analizler neticesinde sözkonusu güçlü antifungal bileşiğin “fengycin” olduğu tespit edilmiştir. Bileşiğin enzimatik degradasyona, yüksek sıcaklığa, pH 2’ ye kadar olan çok düşük asidik ortamlara karşı dirençli olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma ile ilk defa halotolerant *Bacillus* suşunun antifungal etkinliği gösterilmiştir.

Yánez-Mendizábal ve arkadaşları (2012) *Bacillus subtilis* CPA-8 ile yaptıkları çalışmalarda şeftalide kahverengi çürüklüğü etkeni *Monilinia spp.*ye karşı güçlü bir antifungal bileşik ürettiği tespit edilmiştir. CPA-8 suşunun fengycin, iturin ve surfactin sentezlediği ancak güçlü antifungal özelliğin fengycin sentezinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Fengycin sentezi yapmasını engelleyen bir mutasyonla da bu durum kanıtlanmıştır. Mutantın şeftali ağacına inokulasyonu yapılarak, kolonizasyonun sürdüğü görülmüştür. Mutasyon CPA-suşunun antifungal etkisini

azaltmasına rağmen kolonizasyonunda herhangi bir değişiklik yapmamıştır. Elde ettikleri sonuçlar göz önünde bulundurularak, Serenade Max[®] olarak adlandırılan ticari biyokontrol ajanı *Bacillus subtilis* QST-713 ile karşılaştırıldığında benzer hatta daha iyi sonuçlar verdiği düşünülmüştür.

3. MATERYAL VE METOD

3. 1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Organizmalar

3.1.1.1. *Bacillus* sp. Suşları

Adana il sınırları içerisinde yer alan tarım alanı, Çukurova Üniversitesi kampüsü ve evsel atık çöplüğü topraklarından yaklaşık 50 *Bacillus* sp. suşu izole edilmiştir. Söz konusu suşların antifungal aktivitelerinin gözlenmesi çok fazla zaman alacağından bölümümüz stoklarından tedarik edilen *Staphylococcus* sp. suşu ile antibiyotik aktivitelerinin varlığına göre elimine edilmiştir.



Şekil 3.1. *Bacillus* sp. suşlarının *Staphylococcus* sp. suşuna inhibisyon etkisi

Aşağıdaki tabloda *Staphylococcus* sp. suşuna karşı antibiyotik etkinliği bulunan suşlar yer almaktadır.

<i>Bacillus</i> sp. suşları	SR-1	Sofulu Evsel Atık Çöplüğü
	SR-2	
	SR-3	
	SR-4	
	K2A	Ç.Ü.F.E.F. Binası çevresi
	K4D	
	K5A	
	AL-1	Ç.Ü.Tarımsal Araştırma Arazisi Yüreğir
	DN-1	Ç.Ü.F.E.F. Binası çevresi

3.1.1.2. Test Organizmaları

Test organizması olarak kullanılan küfler kampüs toprağından, maya ve mantar ise bölümümüz stoklarından elde edilmiştir.

Test Organizmaları
<i>Alternaria</i> sp.
<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Candida</i> sp.
<i>Penicillium</i> sp.
<i>Trametes versicolor</i>

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan tüm besiyerleri otoklavda 121°C' de 1.2 atm' de 20 dk. steril edildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.2.1. Potato Dekstrose Agar (PDA)

Saf kültür olarak seçilmiş olan *Alternaria* sp. *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp., *Trametes versicolor* ve *Candida* sp. suşlarının üremesi ve canlılığını devam ettirebilmesi amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca antifungal aktivitenin gösterilmesinde de kullanılmıştır.

Besiyeri bileşenleri (g /L)

Potato Dekstrose Agar (Merck) 39 g / L

3.1.1.2. Nutrient Agar (N1) ve Nutrient Broth

Saf kültür olarak seçilmiş *Bacillus* sp. suşlarının üremesi ve devamlılığını sağlamak amacıyla kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

Besiyeri bileşenleri (g /L)

Pepton	10 g
Et özütü	10 g
Maya özütü	5 g
Glukoz	1 g
Agar	15 g

Nutrient broth içerisinde agar bulunmamaktadır.

3.1.1.3. Complete Yeast Medium (CYM)

Trametes versicolor'ın misel formunun araştırma süresince üremesi ve devamlılığını sağlamak amacıyla kullanılmıştır. (Perkins, 1969)

Besiyeri bileşenleri (g /L)

Glukoz	20 g
Pepton	2 g
Maya özütü	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	0.46 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
Agar	20 g

3.1.1.4. Fermentasyon Besiyeri

Bacillus sp. suşlarının antibiyotik üretmeleri için dizayn edilmiş bir sıvı besiyeridir. (Muhammad ve ark., 2009)

Besiyeri bileşenleri (g /L)

L-glutamic acid	5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.01 g
NaCl	0.01 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.015 g
Glukoz	10 g

Yukarıdaki tabloda belirtilen bileşenler saf su içerisinde çözülmüş ve pH'ı 7-8 arasında bir değer olacak şekilde ayarlandıktan sonra sterilizasyonu yapılarak kullanılmıştır.

3.1.1.5. M9-Nişasta Agarı

M9-Nişasta Agar, *Bacillus* sp. suşlarının amilaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. (Aygan ve ark., 2008)

Besiyeri Bileşenleri (g/L)

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	6
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.24
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.24
Pepton	3
Nişasta	10
Agar	15

3.1.2.6. Top Agar**Besiyeri bileşenleri (g /L)**

Glukoz	1 g
Maya �z�t�	1 g
Tripton	1 g
Agar	6 g

Yukarıdaki tabloda belirtilen bileşenler saf su içerisinde çözüldükten sonra tüplere 5’ er mL konularak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.2.7. SIM Agar

Bakterilerin hareketliliğini, H₂S ve indol oluşumunu belirlemede kullanılan besiyeridir (Anonymous, 1978).

Besiyeri bileşenleri (g /L)

Kazein Peptonu	20 g
Et Peptonu	6,6 g
Amonyum Fe(III) sitrat	0.2 g
Na-tiyosülfat	0.2 g
Agar	3 g

Yukarıdaki tabloda belirtilen bileşenler saf su içerisinde çözüldükten sonra tüplere 5’ er mL konularak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.2.8. Nitrat Besiyeri

Bu besiyeri nitrat redüksiyonu için kullanılır. Bileşimi modifiye edilerek kullanılmıştır (Çetin, 1968).

Besiyeri bileşenleri (g /L)

Trypton	5
Pepton	5
KNO ₃	1
Glikoz	0,1
Agar	10

3.1.2.9. Simmons Sitrat Besiyeri

Karbon kaynağı olarak yalnızca sodyum sitrat bulunan besiyerinde, bakterilerin sitratı parçalayıp parçalamadıklarını belirleyen bir test için kullanılan bir besiyeridir (Çetin, 1968).

Besiyeri bileşenleri (g /L)

NaCl	5
Magnezyum sülfat	0,2
Amonyum dihidrojen fosfat	1
Dipotasyum fosfat	1
Sodyum sitrat	2
Agar	20

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

3.1.3.1. Gliserol Solüsyonu

Küf sporu elde edilmesinde ve stoklanmasında kullanılmıştır.

Glicerol hydrate 100 mL /L

Solüsyon içeriği saf su ile tamamlanarak 121 ° C ‘ de 1.2 atm basınçta 20 dk steril edildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.3.2. Lügol

M9-Nişasta Agar besiyerinde amilaz aktivitesinin saptanması için kullanılmıştır.

Bileşimi	g/100mL
İyot	7 g
Potasyum iyodür	3 g
Distile Su	100 mL

20 kat sulandırılarak kullanılmıştır (Çetin, 1968).

3.1.3.3. Kovac' s Çözeltisi

Para-dimetil-amino-benzaldehit alkolde eritildikten sonra HCl ilavesiyle hazırlanan bir çözeltidir (Çetin, 1968).

Bileşimi	
Para-dimetil-amino-benzaldehit	5 g
Amil veya butil alkol	75 mL
%37' lik HCl	25 mL

3.2. Metod

3.2.1. *Bacillus* sp. İzolasyonu ve Stok Kültürlerinin Hazırlanması

Adana' m 5 farklı alanından elde edilen toprak örnekleri aşağıdaki prosedüre uygun olarak işleminden geçirilerek *Bacillus* spp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir. (Aygan, 2008)

- Her bir bölgeden alınan topraktan 50 gr örnek tartılıp içerisinde 450 mL steril saf su bulunan erlene ilave edilmiştir. Böylelikle 10^{-1} lik dilüsyon elde edilmiştir. Homojenizasyon için elle 5-10 dakika süre ile çalkalanmıştır.
- İyice çalkalandıktan sonra erlenler 80 °C' de 10 dakika süreyle sıcak su banyosunda bekletilmiştir.

- Erlenler soğuduktan sonra aseptik koşullarda, 1' er mL alıp içerisinde 9 mL steril saf su bulunan tüplere ilave edilerek, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ve 10^{-8} lık ardışık dilüsyonlar elde edilmiştir.
- Daha sonra 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ve 10^{-8} lik dilüsyonlardan 1' er mL alan örnek daha önce hazırlanmış Nutrient agar (N1) besiyeri bulunan petrilere yayılarak ekilmiştir.
- 24 saat 30 °C' de inkübasyondan sonra her bir petrideki koloniler gözle incelenmek suretiyle morfolojik olarak birbirinden farklı, düzensiz şekilli, saf, beyaz-krem koloniler seçilerek saflık kontrolü için petrilere önceden hazırlanmış Nutrient Agar üzerine çizgi ekim yapılarak 30 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda tek kolonilerden eğik nutrient agar içeren tüplere ekim yapılarak saf kültürler olarak izole edilmiştir. Bu şekilde elde edilen her bir izolat hem eğik nutrient agar içeren tüplerde saklanmaktadır.
- Daha sonra her bir izolat için kültürden Gram boyama yapılarak gram reaksiyonu ve görünümü incelenmiştir.

3.2.2. Test Funguslarının İzolasyonu ve Stok Kültürlerinin Hazırlanması

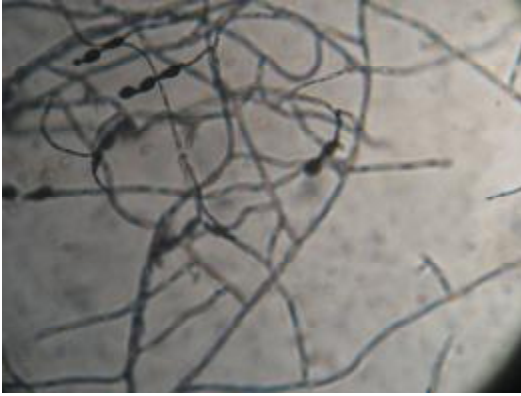
Alternaria sp., *Aspergillus* sp. ve *Penicillium* sp. küfleri PDA besiyeri kullanılarak Çukurova Üniversitesi kampus toprağından izole edilmiştir.

Toprak örneği bir miktar su ile homojenize edilerek 10^{-5} ile 10^{-8} e kadar ardışık dilüsyonlar elde edilmiştir. Her bir sulandırmadan PDA üzerine yayma yapılmıştır. Petri üzerinde miseller oluşturarak üreyen tek düşmüş koloniler PDA besiyerine ekilerek saflaştırılmıştır.

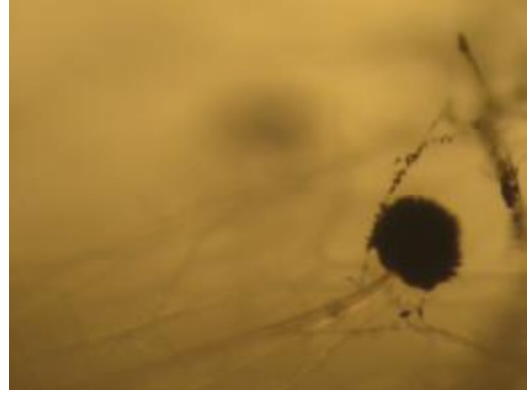
Spor zincir morfolojileri incelenerek identifikasyonları yapılmış ve eğik PDA bulunan tüplere ekimleri yapılarak 7 gün 28 °C' de gelişimi sağlanmış ve gerektiğinde kullanılmak üzere stoklanmıştır.

3.2.2.1 Spor Zincir Morfolojilerinin İncelenmesi

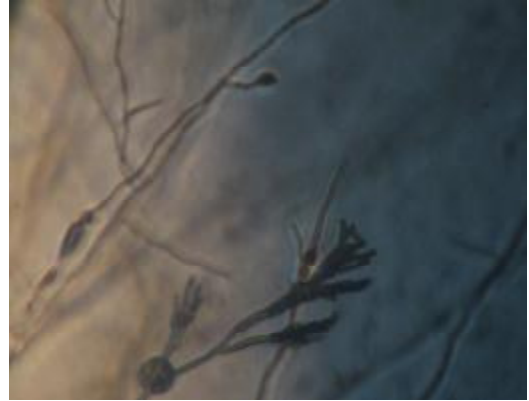
Saf olarak izole edilen organizmalar PDA besiyeri sterilizasyondan çıkarıldıktan sonra petrilerde henüz katılaşmadan iki steril lamel 45° lik açı ile besiyerine yerleştirilmiştir. Besiyeri katılaştıktan sonra besiyeri ile lamelin birleştiği bölgeye izolasyonu yapılmış küf mantarlarının ekimi yapılarak 28 °C de 4-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra lamel dikkatlice üzerindeki besiyeri ile birlikte çıkarılmış ve bir lam üzerine yerleştirilerek ışık mikroskopunda incelenmiştir. Spor zincir morfolojilerine göre identifikasyonları yapılmıştır.



Şekil 3.2. *Alternaria* sp. spor zincir morfolojileri



Şekil 3.3. *Aspergillus* sp. spor zincir morfolojileri



Şekil 3.4. *Penicillium* sp. spor zincir morfolojileri

3.2.3. K f Sporunun Elde Edilmesi

Alternaria sp., *Aspergillus* sp. ve *Penicillium* sp organizmaları t p içerisinde e ik PDA' da 28  C' de 7 gün inkübe edilerek misel ve spor  lumu sağlanmıştır. Sporların elde edilmesi için, aseptik koşullarda 10 mL steril % 10 gliserol içeren

solüsyon tüp içerisine eklenerek birkaç defa alt üst edilmiştir. Daha sonra steril huni ve gazlı bez yardımıyla bir boş tüpe aktarılarak misel yapıları uzaklaştırılmış ve duyarlılık testlerinde kullanılmıştır. Küf Sporu Süspansiyonu kullanılıncaya kadar - 20 °C’ de saklanmıştır.

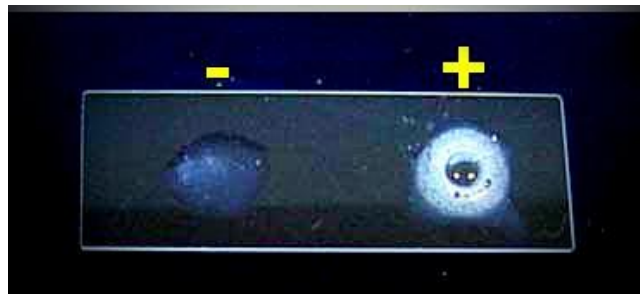
3.3. *Bacillus* sp. Suşlarının Biyokimyasal Karakterizasyonu

İzole edilen *Bacillus* sp. suşlarının biyokimyasal karakterinin belirlenmesi için şu testler yapılmıştır.

3.3.1. Katalaz Testi

Dehidrogenaz üreten bazı bakterilerde bu enzimin aktivitesi ile bir oksijenin bir hidrojen akseptörü gibi iş görmesi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Katalaz enzimi hidrojen peroksiti parçalayan bir enzimdir. Zorunlu anaerob bakteriler dışında bakterilerin çoğu bu enzimi sentezlerler.

Katalaz deneyi için bakterinin nutrient agar besiyerinde 37°C’ deki 24 saatlik kültürü kullanılır. Lam yüzeyine öze yardımıyla alınan bir bakteri üzerine Hidrojen peroksitin %30’ luk çözeltisinden bir damla damlatılır. Gaz kabarcıklarının meydana gelmesi bu reaksiyonun pozitif olduğunu gösterir. Herhangi bir gaz kabarcığının oluşmaması negatif sonucu gösterir (Çetin, 1968).



Şekil 3.5. Katalaz testi pozitif ve negatif sonuçları
(http://iws2.collin.edu/dcairn/CCCCD%20Micro/catalase_test.htm)

3.3.2. NaCl Toleransı

Nutrient agara %5, %7 ve %10 düzeylerinde NaCl eklenerek izole edilen *Bacillus* sp. suşlarının tuza toleransları saptanmaya çalışılmıştır.

3.3.3. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi

Nutrient agara %10 oranında eritrosit süspansiyonu eklenerek kanlı agar hazırlanmış ve izole edilen *Bacillus* sp. suşlarının hemolitik aktiviteleri saptanmaya çalışılmıştır. Bakterilerin 24 saatlik kültürlerinden kanlı agara çizgi ekim yapılarak 48 saat 37 °C’ de üremeleri sağlanmış ve hemolitik aktiviteleri gözlenmiştir.

3.3.4. SIM Testi

5 mL’ lik SIM agar bulunan tüplere, bakterilerin 24 saatlik kültürleri ğne öze ile batırma şeklinde ekilir. Tüpler 37°C’ de 1-4 gün inkübe edilir (Anonymous, 1978).

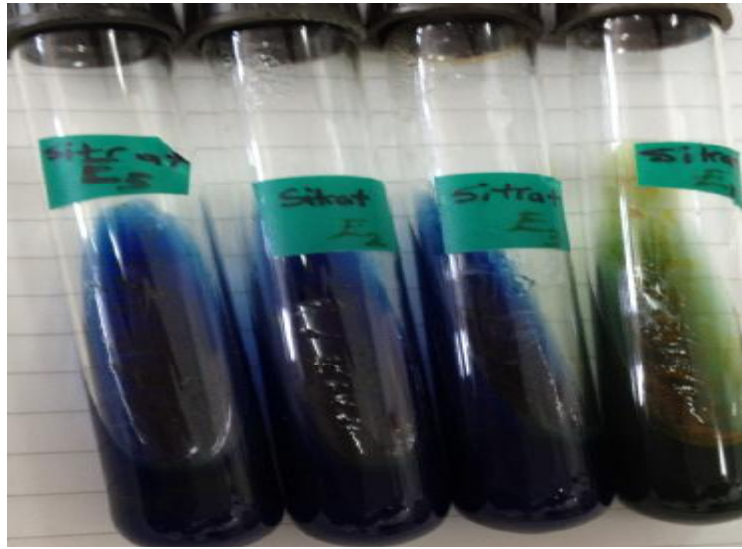
Hareketsiz bakteriler yalnız iğnenin batırıldığı çizgi boyunca ürer, besiyerinin diğer kısımları şeffaf kalır. Hareketli bakteri ise bu çizgiden besiyerinin içine doğru yayılarak ürer. Üremeden dolayı besiyeri hafif opak olur ve bunu gözle görmek mümkündür.

Bazı bakteriler sistin ve diğer kükürt ihtiva eden bileşiklerden bir kısmını kükürtlü hidrojen teşkil ederek parçalayabilirler. H₂S oluşturan bakterilerde, bakterilerin ürediği bölgede koyu siyah renk meydana gelir.

Bazı bakteriler triptofanı parçalayarak indol oluşturur. Triptofan indol halkası ihtiva eden ve kullanılan peptonlarda hemen daima bulunan bir aminoasittir. İndol oluşumunu test etmek için, 37°C’ de bakterilerin ürediği tüplere birkaç damla Kovac’ s ayracılave edilir ve tüpler çalkalanır. Koyu kırmızı bir rengin husulü indol mevcudiyetini gösterir (Çetin, 1968).

3.3.5. Sitrat Testi

Bakterilerin karbon kaynağı olan sitratı parçalayıp, parçalayamadıklarını gösteren bir testtir. Bakterilerin 24 saatlik kültürleri, 5 mL' lik ğık katı şeklinde hazırlanan Simmon' s sitrat besiyeri içeren tüplere öze ile ekilir. Tüpler 37°C' de 3-4 gün bekletilir. Bakteri sitratı kullanıyorsa indikatör mavi renk alır (Çetin, 1968).



Şekil 3.6. Sitrat pozitif (mavi renk) ve sitrat negatif (yeşil renk) bakterilerin görünümü

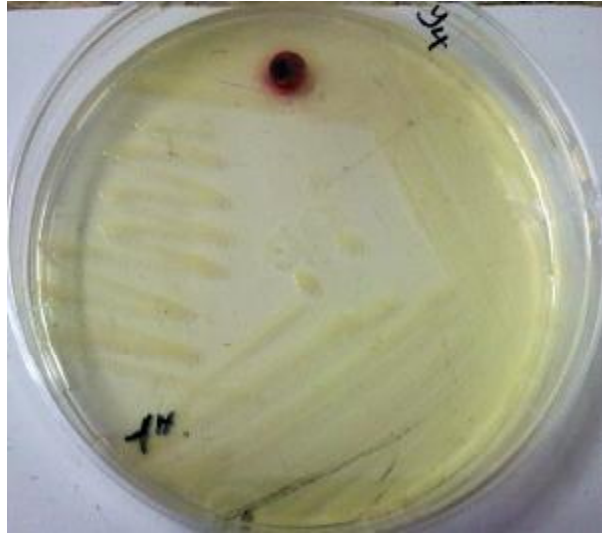
3.3.6. Nitrat Testi

Nitrat redüksiyonu; bakterilerin etkisi ile nitratların kaybolması ve daha az okside olmuş bileşiklerin oluşması şeklinde ifade edilebilir. Nitrat, hidrojen akseptörü gibi davranarak üremeyi destekler. Bakterilerin çoğu redüksiyonu nitrit devresinden öteye götüremez. Bazı şartlarda redüksiyon amonyak devresine, hatta bazen moleküler azota kadar ilerleyebilir (Çetin, 1968).

Nitrat diskleri organizmanın nitratı indirgeme yeteneğini belirlemek amacıyla kullanılır. Bu test, uygun elektron donörü varlığında nitratın nitrite redüksiyonunda görev alan nitrat redüktaz enziminin belirlenmesini içerir. Bu enzimin varlığı, uygun kolorimetrik ayıraç ile belirlenir. Nitratın, nitrite ve nitrojen gazına indirgenmesi,

genellikle organizmanın oksijeni nitrattan elde ettiği anaerobik koşullarda gerçekleşir. Fakültatif anaerobların çoğu oksijen yokluğunda nitrata indirgemektedirler. Enterobacteriaceae' lerin çoğu nitrata indirgerler. Bu anaerobik solunum, inorganik maddelerin enerji üretimi için elektron akseptörü olarak oksijen sağladığı bir oksidasyon sürecidir. Nitrat indirgenmesinin son ürünü bakteri türlerine bağlıdır. En çok bilinen son ürün, nitritin indirgenmesi sonucu oluşan moleküler nitrojendir. Çevresel koşullara bağlı olarak, bu ürünler genellikle daha ileriye oksitlenmez veya hücre metabolizmasında birikmezler, fakat çevresindeki ortama salgılanırlar.

Bu test nitrat disk kiti (Fluka, 51138) ile yapılmıştır. Bakterilerin 24 saatlik kültürlerinden öze ile alınıp, petrilerde hazırlanmış nitrat besiyerine azaltma yöntemi ile ekilir ve 37°C' de inkübe edilir. 1 günlük inkübasyon süresinden sonra, üreyen kolonilerin üzerine diskler yerleştirilir. Nitrat pozitif bakteriler pembe-kırmızı rengin meydana gelmesiyle anlaşılır.



Şekil 3.7. Pembe-kırmızı renk veren nitrat pozitif bakterilerin görünümü

3.3.7. Katı Besiyerinde Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Niştastalı M9 besiyerine çizgi şeklinde ekilen *Bacillus* sp. suşları, 3 gün 37°C de inkübasyona bırakıldıktan sonra besiyeri petri kutusunun kapağına dökülen iyod buharına tutularak boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Nişasta içeren zemin koyu

maviye boyanırken, amilaz enzimi üreten kolonilerin çevresinde şeffaf zon oluşumunun gözlenen suşlar amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Aygan, 2008).

3.4. *Bacillus* sp. Suşlarının Antibiyotik Üretimi

Bacillus sp. suşları 5 mL N1 besiyeri bulunan tüplerde 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 250 mL' lik erlenlerde bulunan 100 mL Fermentasyon Besiyerine aktararak 150 rpm ve 37 °C' de 6 gün inkübe edildikten sonra 10.000 rpmde 4 °C' de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonucunda bakteri ile metabolitler içeren sıvının (süpernatant) birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Süpernatant sıvı evaporatör aracılığıyla 1/10 oranında konsantre hale getirilmiştir. Konsantre süpernatant 0.45 µm çapındaki bakteri filtresinden (Isolab, PTFE 45-25) geçirilerek steril edilmiştir. Kullanılncaya kadar -20 °C' de saklanmıştır.

3.5. *Bacillus* sp. Suşlarının Misel Gelişimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

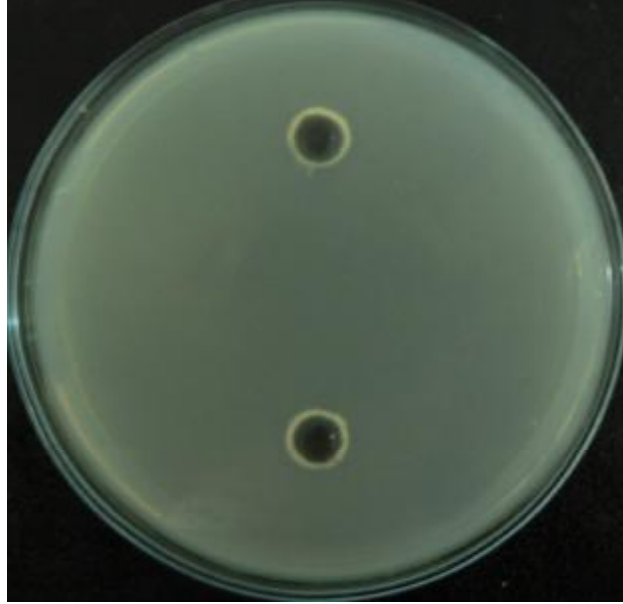
PDA besiyeri üzerinde *Bacillus* sp. suşları ile *Trametes versicolor*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. karşılıklı olarak ekilerek misel gelişimleri üzerindeki etkileri gözlenmiştir.

3.6. *Bacillus* sp. Suşlarının Küf Sporu Gelişimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

3.6.1. Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi

Agar kuyu difüzyon yöntemi ile yaklaşık olarak 20 mL PDA içeren petrilere karşılıklı 2 tane 1' er cm çapta kuyucuklar açılmıştır. Misel gelişimini inhibe eden AL-1 ve DN-1 suşlarına ait süpernatant konsantresinden 100 µL kuyucukların bir tanesine konulurken diğeri kontrol amacıyla boş bırakılmıştır. Süpernatant konsantresinin agara difüzyonunun gerçekleşmesi amacıyla 1 gece bekletilmiştir. 500

μ L Kf Sporu Süspansiyonu sıvı top agar ile karıştırılmış ve söz konusu petrilere dökülerek yayılmıştır. Petriler 28 °Cde 5 gün inkübasyona bırakılmıştır.



şekil 3.8. Agar kuyu difüzyon yöntemi için hazırlanmış PDA besiyeri

3.7. *Bacillus* sp. Suşlarının *Candida* sp. zerine Etkilerinin Belirlenmesi

Bacillus sp. suşlarının *Candida* sp. zerine inhibisyon etkisinin varlığının saptanabilmesi için bakterilerin PDA (20 mL) besiyerine nokta ekim yapılarak 48 saat inkübasyonu sağlanmıştır. 24 saatlik PDAda inkübe edilen *Candida* sp. den bir miktar ze yardımıyla alınarak henüz sıvı haldeki top agara karıştırılmıştır. Daha sonra top agar *Bacillus* sp. suşlarının bulunduğu PDA zerine dökülerek yayılması sağlanmıştır. Petriler 28 °Cde inkübasyona bırakılarak inhibisyon zonu oluşturup oluşturmadıkları gözlenmiştir.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. *Bacillus* sp. Suşlarının Karakterizasyonu

Bacillus sp. suşlarının karakterizasyonunun belirlenmesine yönelik testler yapılmış ve sonuçları tablo haline getirilmiştir. (Çizelge 4.1.)

4.1.2. *Bacillus* sp. suşlarının Sürfaktin Üretimi

Bacillus sp. suşlarının kanlı nutrient agar üzerine ekimi yapılarak 2 gün 37 °C’ de inkübasyonlar sağlanmıştır. Bütün suşların hemolitik aktivite gösterdiği saptanmıştır. (Sriram ve ark., 2011)



Şekil 4.1. *Bacillus* sp. SR-1 suşunun hemolitik aktivitesi

Çizelge 4.1. *Bacillus* sp. suşlarının karakterizasyonunu belirlemeye yönelik testlerin sonuçları

Test Adı	Bacillus sp. Suşları								
	SR-1	SR-2	SR-3	SR-4	K2A	K4D	K5A	AL-1	DN-1
Hareketlilik	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S Oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol Oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz Aktivitesi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nişastanın Hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitratın Nitrite İndirgenmesi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sitrat Kullanımı	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemoliz Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Halotolerans (NaCl)	% 5	+	+	+	+	+	+	+	+
	% 7	+	+	+	+	+	+	+	+
	% 10	+	-	+	+	+	+	+	+

4.1.3. *Bacillus* sp. Suşlarının Antifungal Aktiviteleri

4.1.3.1. *Bacillus* sp. Suşlarının *Candida* sp. Üzerine Antifungal Aktiviteleri

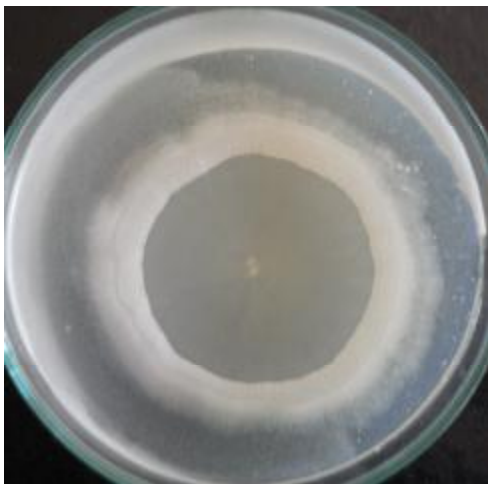
Bacillus sp. suşlarının *Candida* sp. üzerine SR-1, SR-2 suşlarının herhangi bir antifungal aktitesi bulunmazken, diğer suşların oldukça güçlü aktivitelerinin bulunduğu görülmektedir.



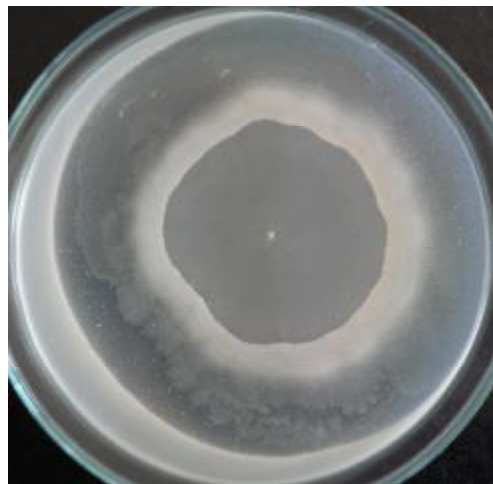
Şekil 4.2. *Bacillus* sp. SR-1 suşunun *Candida* sp. üzerine aktivitesi



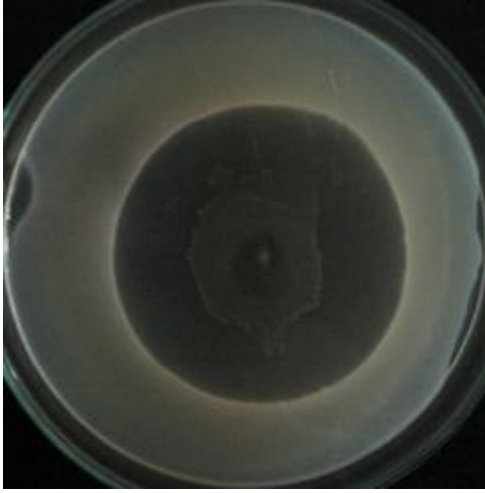
Şekil 4.3. *Bacillus* sp. SR-2 suşunun *Candida* sp. üzerine aktivitesi



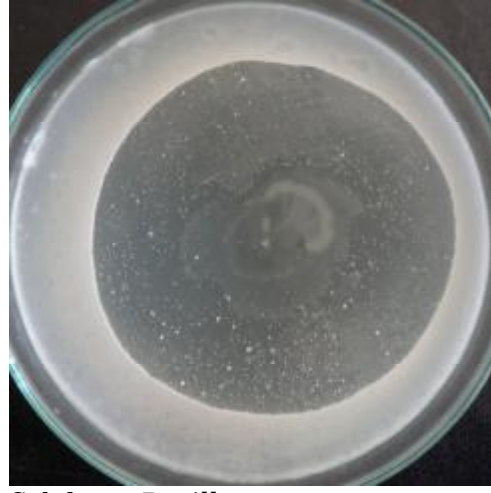
Şekil 4.4. *Bacillus* sp. SR-3 suşunun *Candida* sp. üzerine aktivitesi



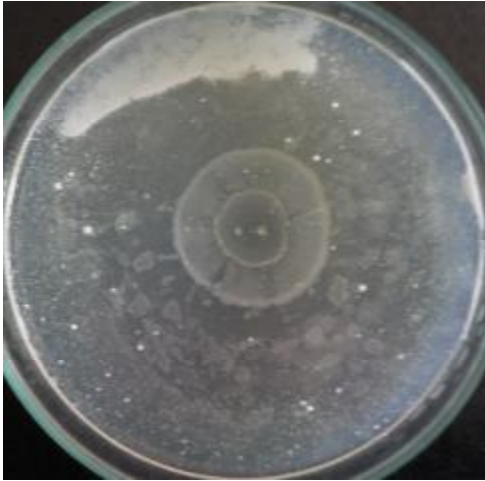
Şekil 4.5. *Bacillus* sp. SR-4 suşunun *Candida* sp. üzerine aktivitesi



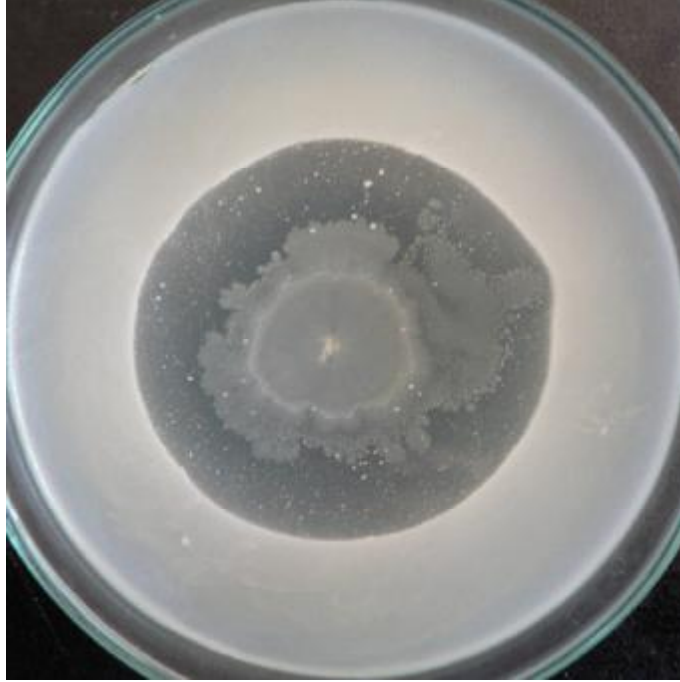
Şekil 4.6. *Bacillus* sp. K2A suşunun
Candida sp. üzerine aktivitesi



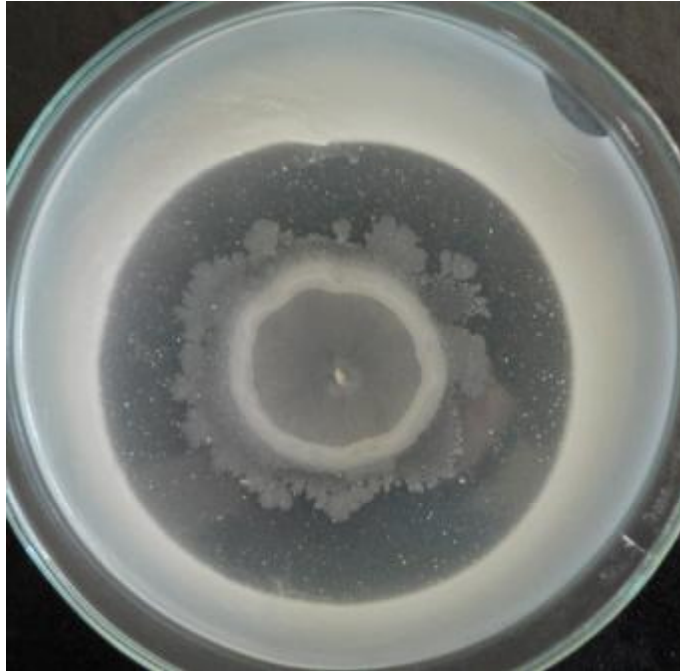
Şekil 4.7. *Bacillus* sp. K4D suşunun
Candida sp. üzerine aktivitesi



Şekil 4.8. *Bacillus* sp. K5A suşunun
Candida sp. üzerine aktivitesi



şekil 4.9. *Bacillus* sp. AL-1 suşunun *Candida* sp. uzerine aktivitesi

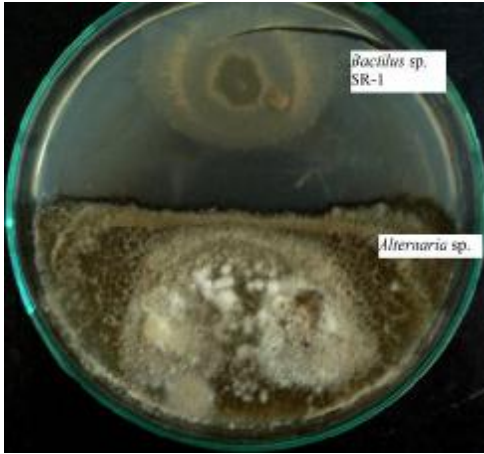


şekil 4.10. *Bacillus* sp. DN-1 suşunun *Candida* sp. uzerine aktivitesi

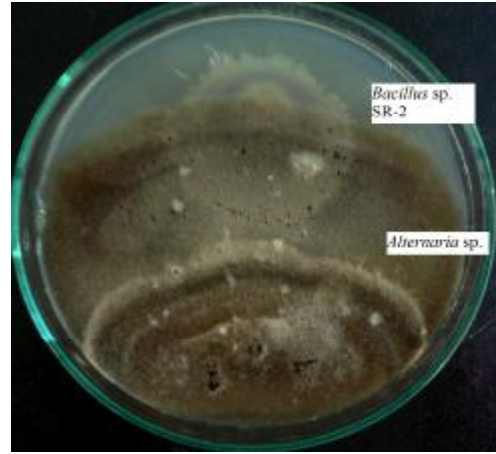
4.1.3.2. *Bacillus* sp. Suşlarının Misel Gelişimi Üzerine Antifungal Aktiviteleri

Filamentöz funguslar olan *Alternaria* sp. *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. *Trametes versicolor* ile *Bacillus* sp. suşlarının PDA besiyerine karşılıklı ekimleri yapılarak aktiviteleri gösterilmiştir.

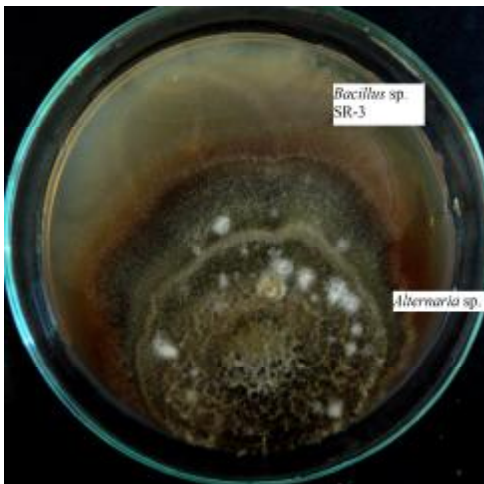
4.1.3.2.(1). *Bacillus* sp. Suşlarının *Alternaria* sp. Misel Gelişimi Üzerine Antifungal Aktiviteleri



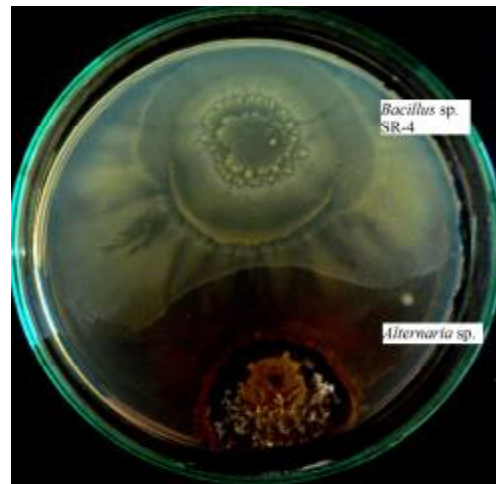
Şekil 4.11. *Bacillus* sp.SR-1' in *Alternaria* sp. üzerine etkisi



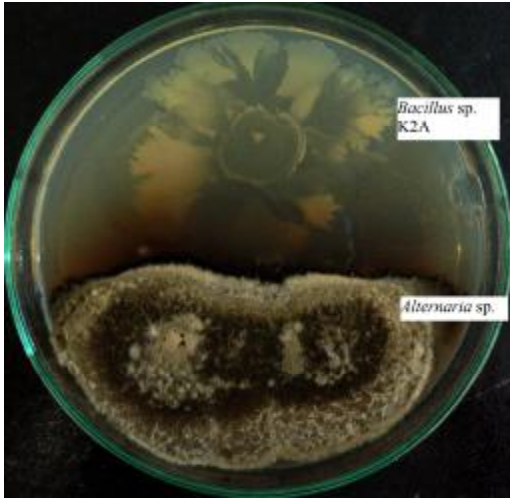
Şekil 4.12. *Bacillus* sp.SR-2' nin *Alternaria* sp. üzerine etkisi



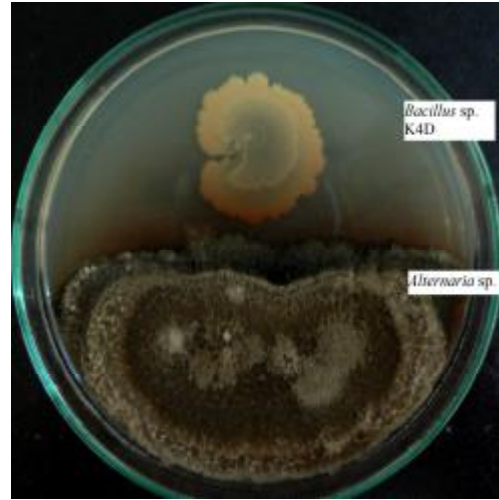
Şekil 4.13. *Bacillus* sp.SR-3' ün *Alternaria* sp. üzerine etkisi



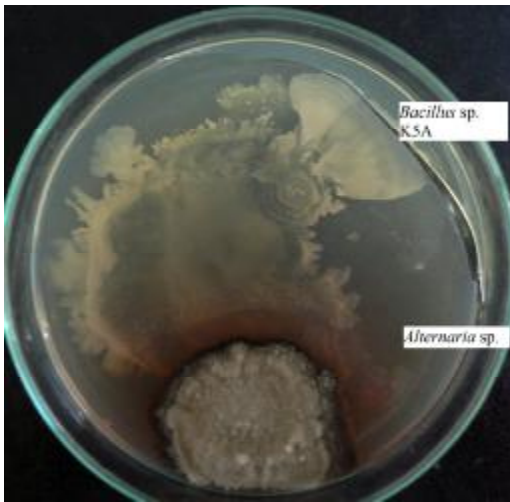
Şekil 4.14. *Bacillus* sp.SR-4' ün *Alternaria* sp. üzerine etkisi



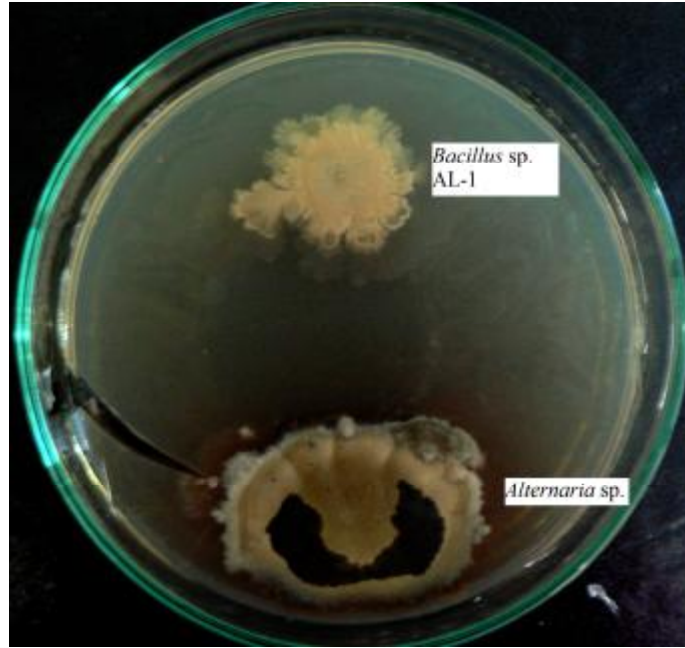
Şekil 4.15. *Bacillus* sp.K2A' m
Alternaria sp. üzerine etkisi



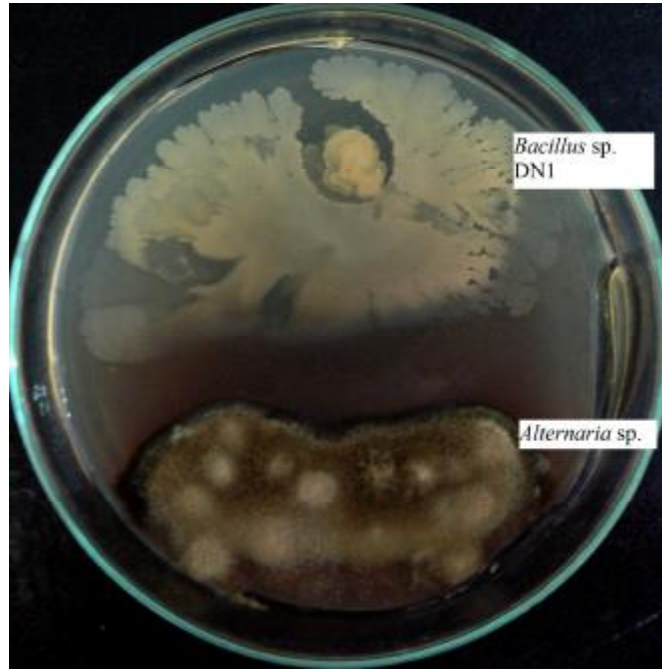
Şekil 4.16. *Bacillus* sp.K4D' nin
Alternaria sp. üzerine etkisi



Şekil 4.17. *Bacillus* sp.K5A' m
Alternaria sp. üzerine etkisi

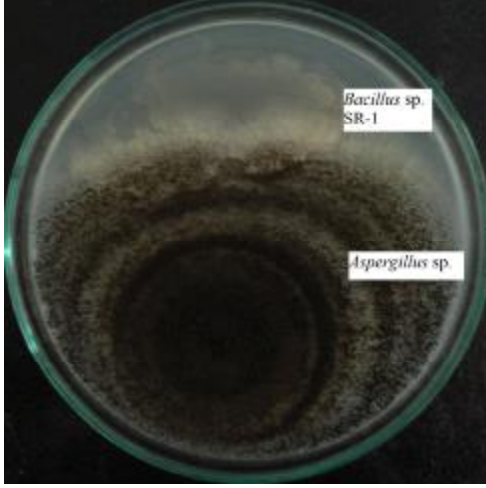


Şekil 4.18. *Bacillus* sp. AL-1' in *Alternaria* sp. misel gelişimi üzerine etkisi

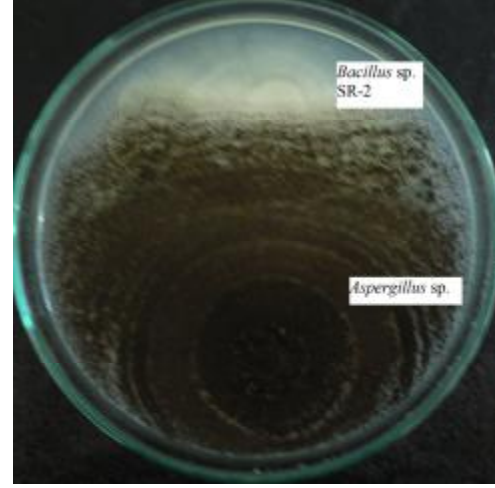


Şekil 4.19. *Bacillus* sp. DN-1' in *Alternaria* sp. misel gelişimi üzerine etkisi

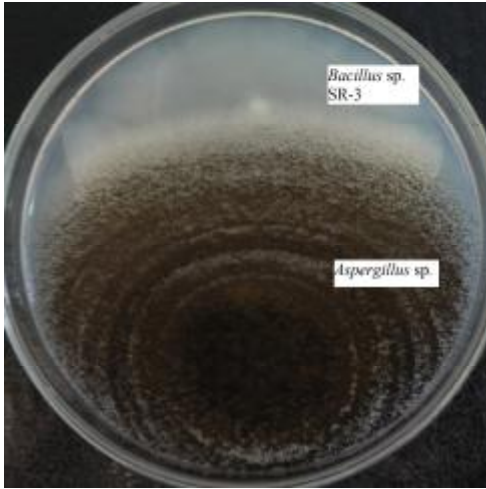
4.1.3.2.(2). *Bacillus* sp. Suşlarının *Aspergillus* sp. Misel Gelişimi Üzerine Antifungal Aktiviteleri



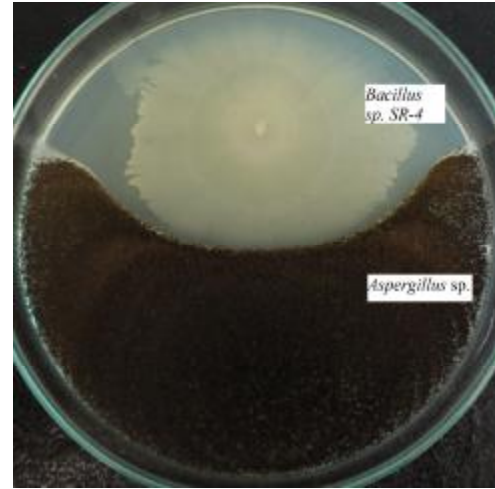
Şekil 4.20. *Bacillus* sp.SR-1 suşunun *Aspergillus* sp. üzerine etkisi



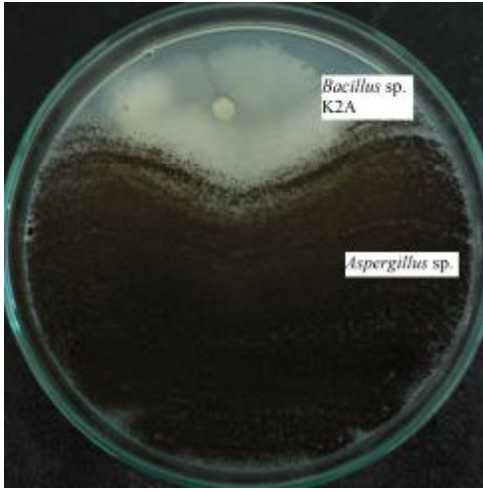
Şekil 4.21. *Bacillus* sp.SR-2 suşunun *Aspergillus* sp. üzerine etkisi



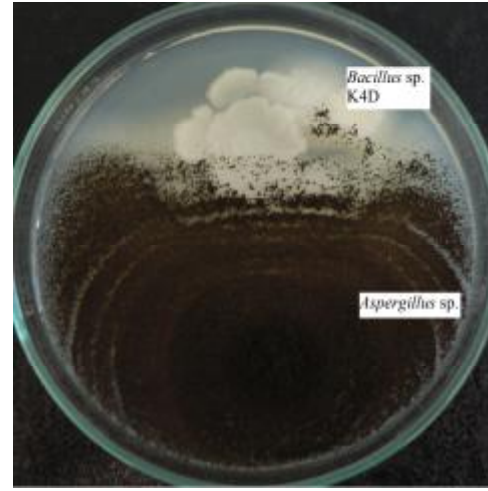
Şekil 4.22. *Bacillus* sp.SR-3 suşunun *Aspergillus* sp. üzerine etkisi



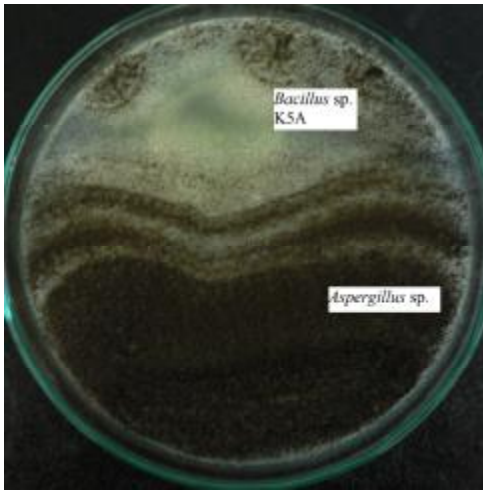
Şekil 4.23. *Bacillus* sp.SR-4 suşunun *Aspergillus* sp. üzerine etkisi



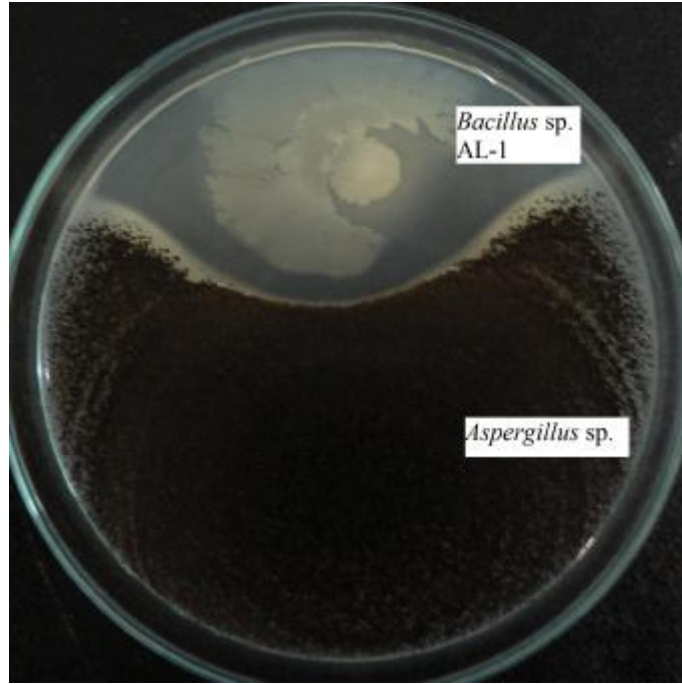
Şekil 4.24. *Bacillus* sp.K2A suşunun *Aspergillus* sp. üzerine etkisi



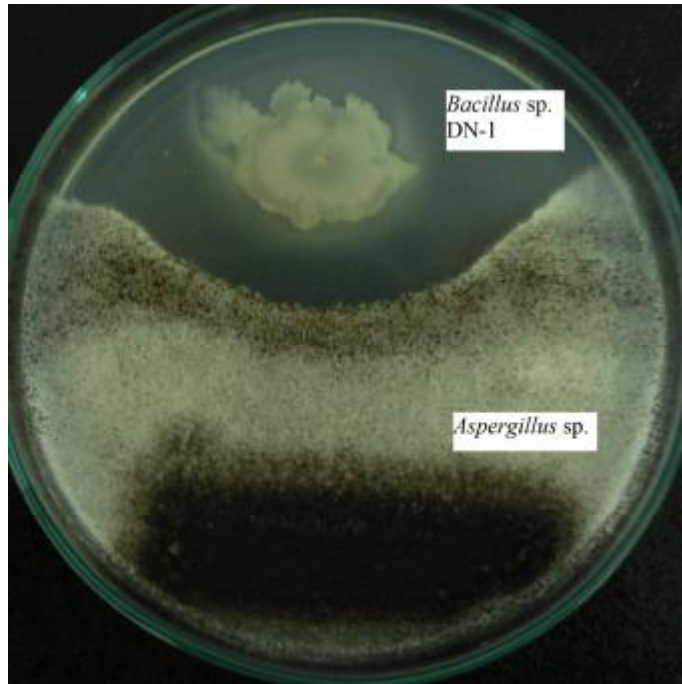
Şekil 4.25. *Bacillus* sp.K4D suşunun *Aspergillus* sp. üzerine etkisi



Şekil 4.26. *Bacillus* sp.K5A suşunun *Aspergillus* sp. üzerine etkisi

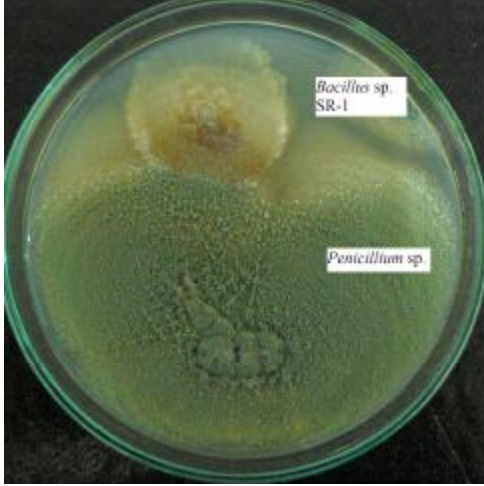


Şekil 4.27. *Bacillus* sp.AL-1 suşunun *Aspergillus* sp. üzerine etkisi

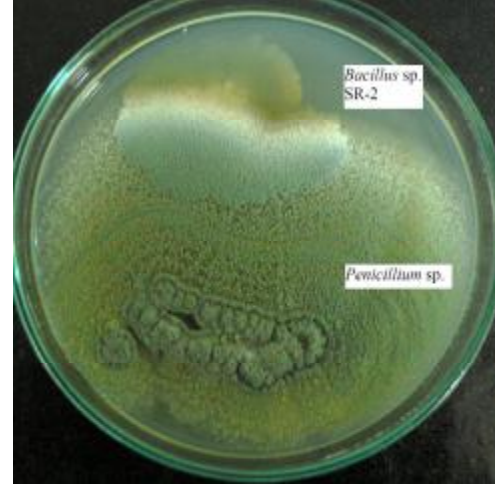


Şekil 4.28. *Bacillus* sp.DN-1 suşunun *Aspergillus* sp. üzerine etkisi

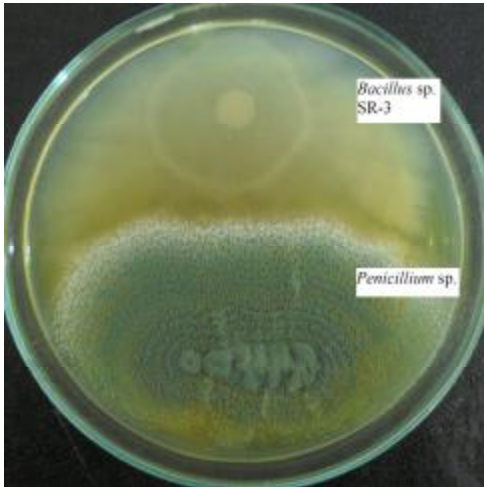
4.1.3.2.(3) *Bacillus* sp. Suşlarının *Penicillium* sp. Misel Gelişimi Üzerine Antifungal Aktiviteleri



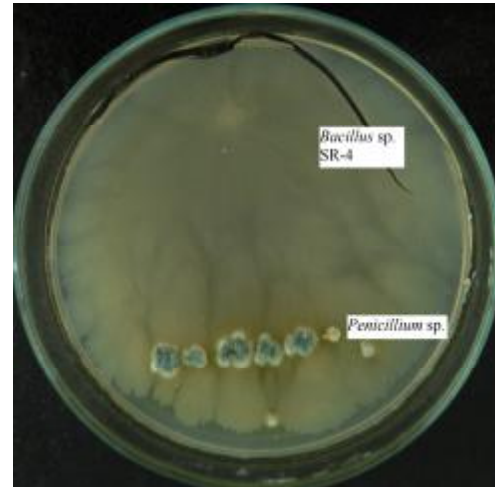
Şekil 4.29. *Bacillus* sp.SR-1 suşunun *Penicillium* sp. üzerine etkisi



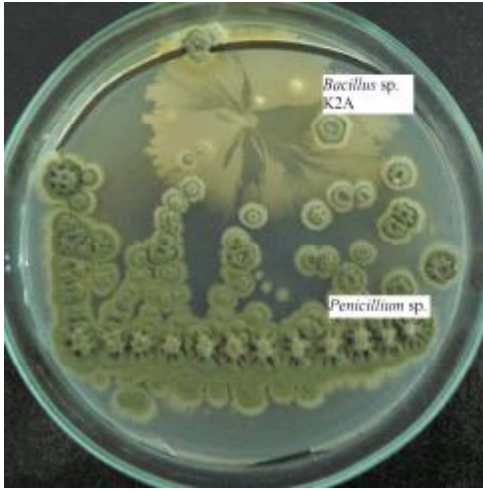
Şekil 4.30. *Bacillus* sp.SR-2 suşunun *Penicillium* sp. üzerine etkisi



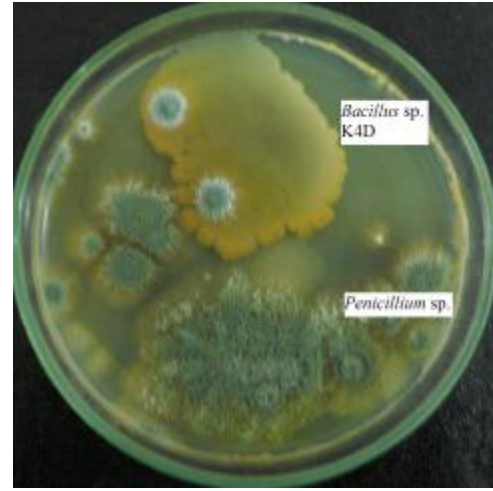
Şekil 4.31. *Bacillus* sp.SR-3 suşunun *Penicillium* sp. üzerine etkisi



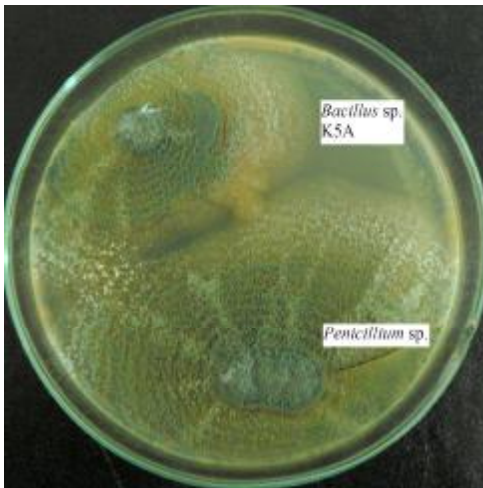
Şekil 4.32. *Bacillus* sp.SR-4 suşunun *Penicillium* sp. üzerine etkisi



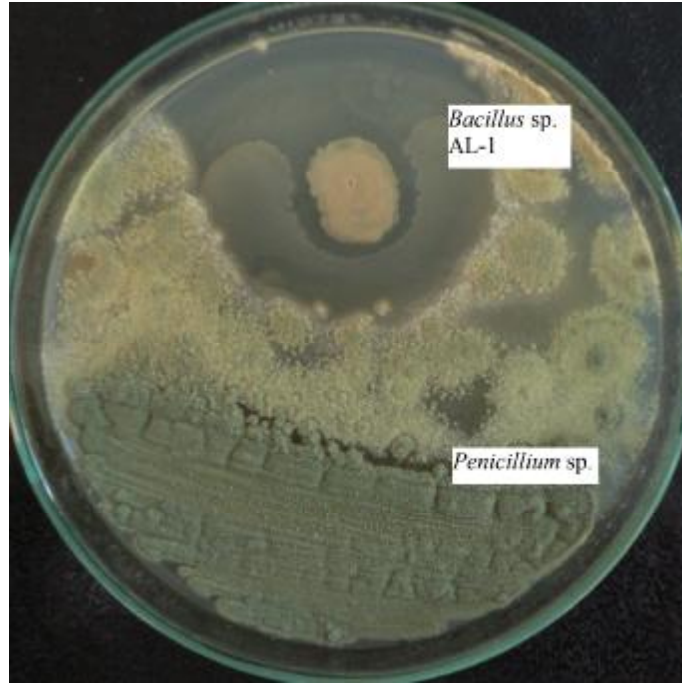
Şekil 4.33. *Bacillus* sp.K2A suşunun *Penicillium* sp. üzerine etkisi



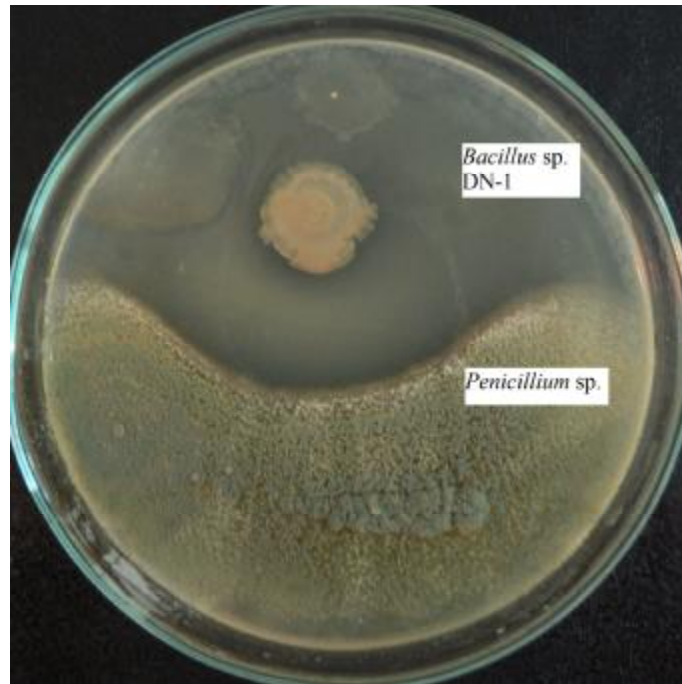
Şekil 4.34. *Bacillus* sp.K4D suşunun *Penicillium* sp. üzerine etkisi



Şekil 4.35. *Bacillus* sp.K5A suşunun *Penicillium* sp. üzerine etkisi

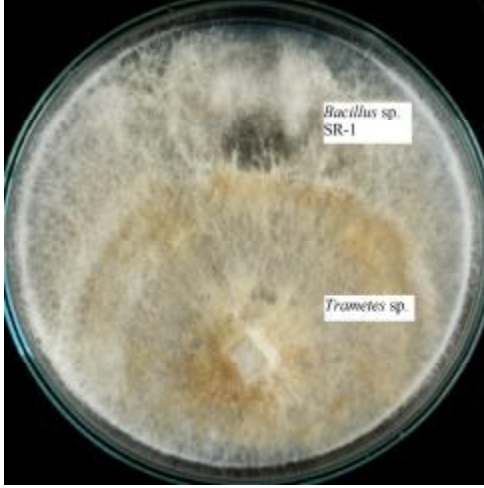


Şekil 4.36. *Bacillus* sp.AL-1 suşunun *Penicillium* sp. üzerine etkisi

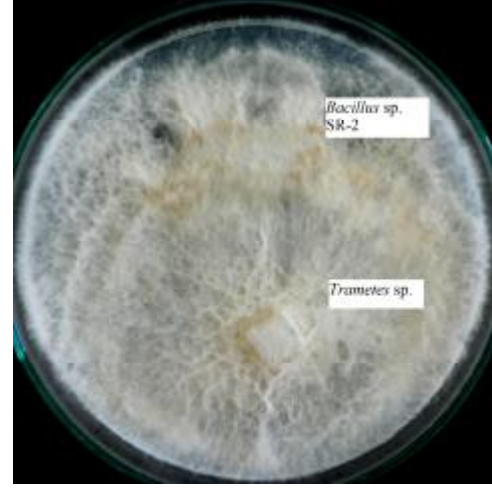


Şekil 4.37. *Bacillus* sp.DN-1 suşunun *Penicillium* sp. üzerine etkisi

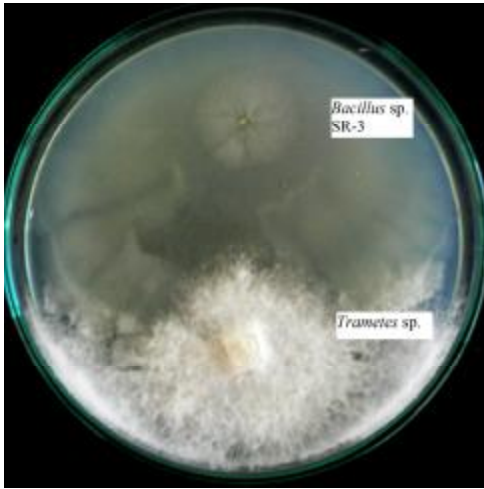
4.1.3.2.(4) *Bacillus* sp. Suşlarının *Trametes versicolor* Misel Gelişimi Üzerine Antifungal Aktiviteleri



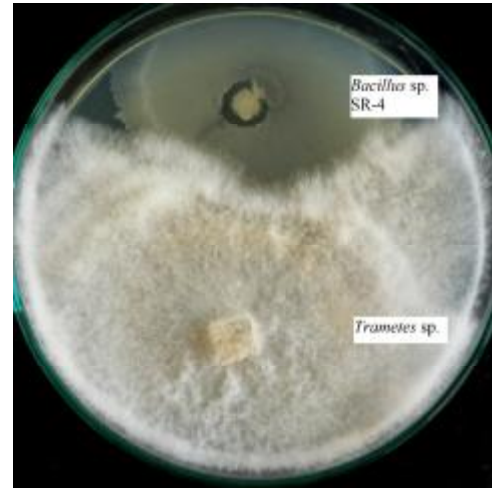
Şekil 4.38. *Bacillus* sp.SR-1 suşunun *Trametes versicolor* üzerine etkisi



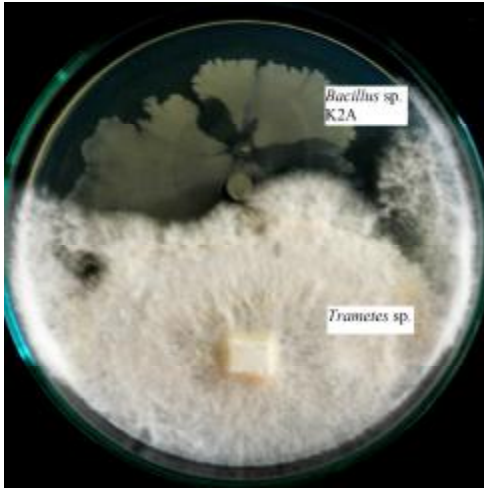
Şekil 4.39. *Bacillus* sp.SR-2 suşunun *Trametes versicolor* üzerine etkisi



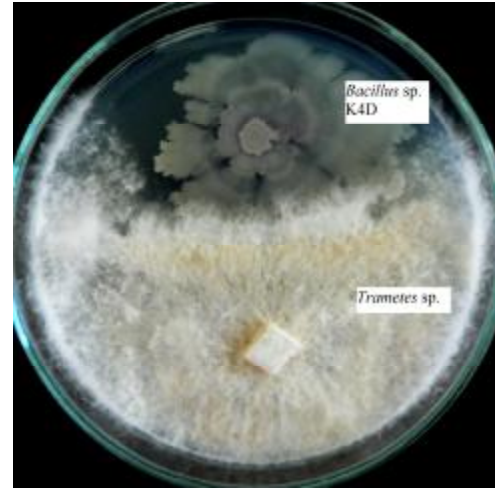
Şekil 4.40. *Bacillus* sp.SR-3 suşunun *Trametes versicolor* üzerine etkisi



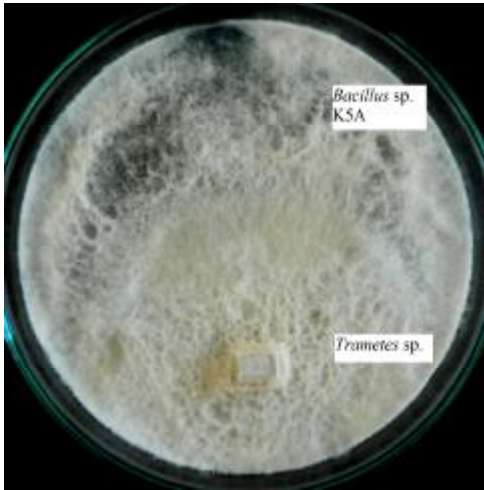
Şekil 4.41. *Bacillus* sp.SR-4 suşunun *Trametes versicolor* üzerine etkisi



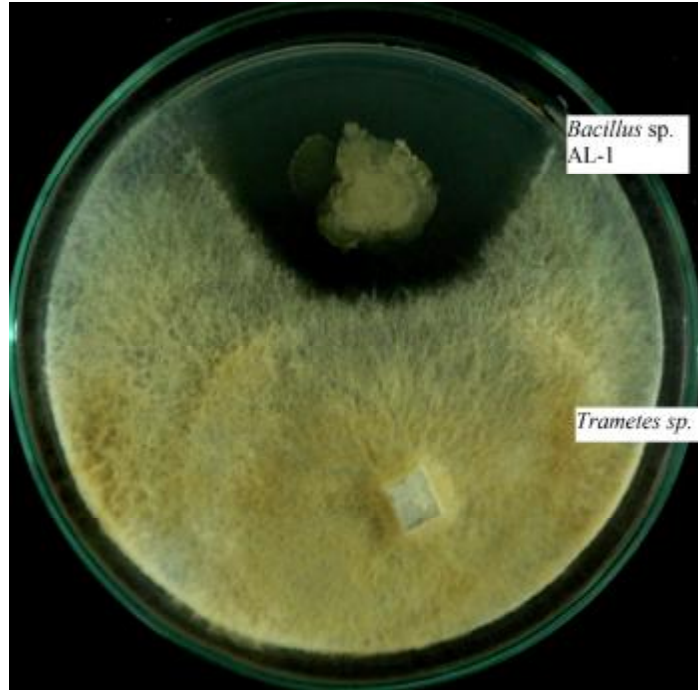
Şekil 4.42. *Bacillus sp.*K2A suşunun *Trametes versicolor* üzerine etkisi



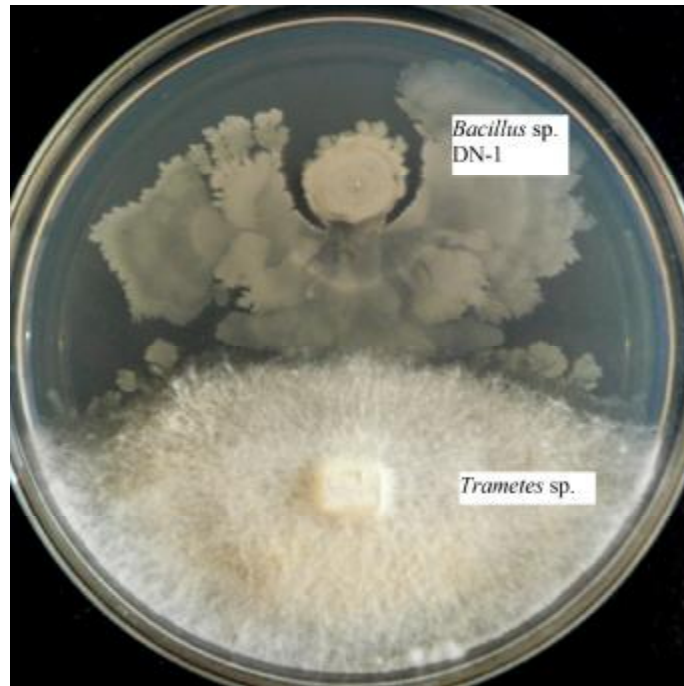
Şekil 4.43. *Bacillus sp.*K4D suşunun *Trametes versicolor* üzerine etkisi



Şekil 4.44. *Bacillus sp.*K5A suşunun *Trametes versicolor* üzerine etkisi



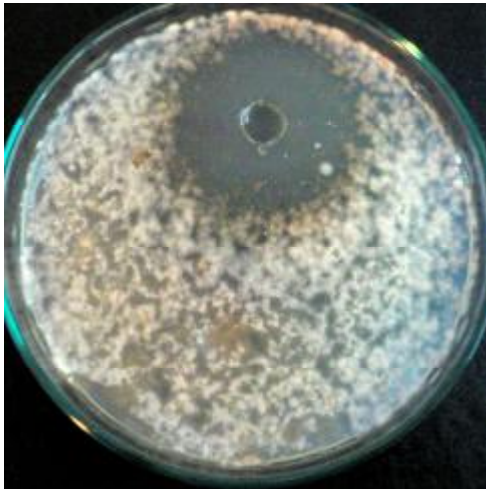
Şekil 4.45. *Bacillus sp. AL-1* suşunun *Trametes versicolor* üzerine etkisi



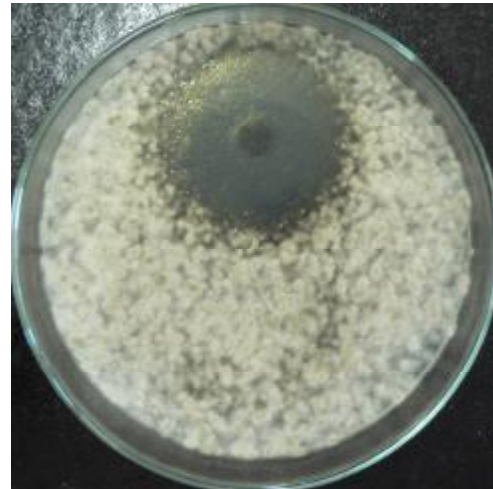
Şekil 4.46. *Bacillus sp. DN-1* suşunun *Trametes versicolor* üzerine etkisi

4.2.3. *Bacillus* sp. Suşlarının Küf Sporu Çimlenmesi Üzerine Aktiviteleri

Topraktan izole edilen *Bacillus* sp. suşları arasından antibakteriyel etkinliklerine göre seçilen 9 farklı suşun antifungal aktivitelerine filamentöz test funguslarının misel gelişimi ve bir maya olan *Candida* sp. gelişimi üzerine antifungal aktiviteleri yukarıda gösterilmiştir. *Bacillus* sp. AL-1 ve DN-1 suşlarının diğerlerine kıyasla çok daha güçlü ve geniş spektrumlu antifungal etkinlik göstermesinden dolayı bu suşların “ Fermentasyon Besiyeri” nde inkübasyonundan elde edilen süpernatant konsantresinin küf sporu çimlenmesi üzerine etkileri de kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak aşağıda gösterilmiştir. Diğer deneyler gibi spor çimlenmesi inhibisyonu deneyi de 3 kez yapılmış ve zon çaplarının ortalama değeri kullanılarak Şekil 4.53.deki grafik elde edilmiştir. AL-1 ve DN-1 suşları da kendi aralarında karşılaştırılacak olursa en etkili sonucun AL-1 ile sağlandığı söylenebilir.



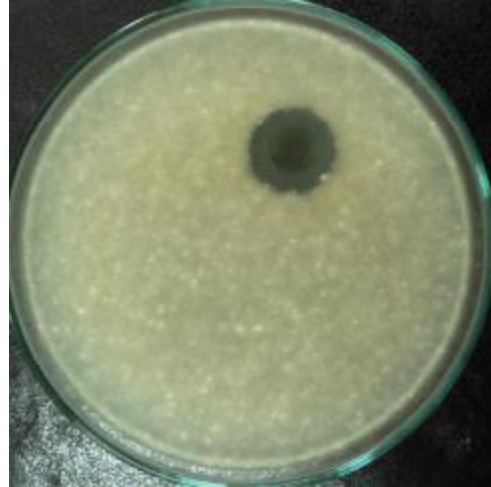
Şekil 4.47. *Bacillus* sp.AL-1 suşunun *Alternaria* sp. spor çimlenmesi inhibisyonu



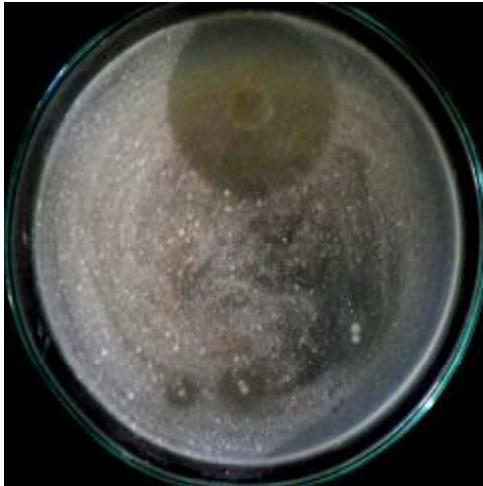
Şekil 4.48. *Bacillus* sp.DN-1 suşunun *Alternaria* sp. spor çimlenmesi inhibisyonu



şekil 4.49. *Bacillus* sp.AL-1 suşunun
Aspergillus sp. spor
çimlenmesi inhibisyonu



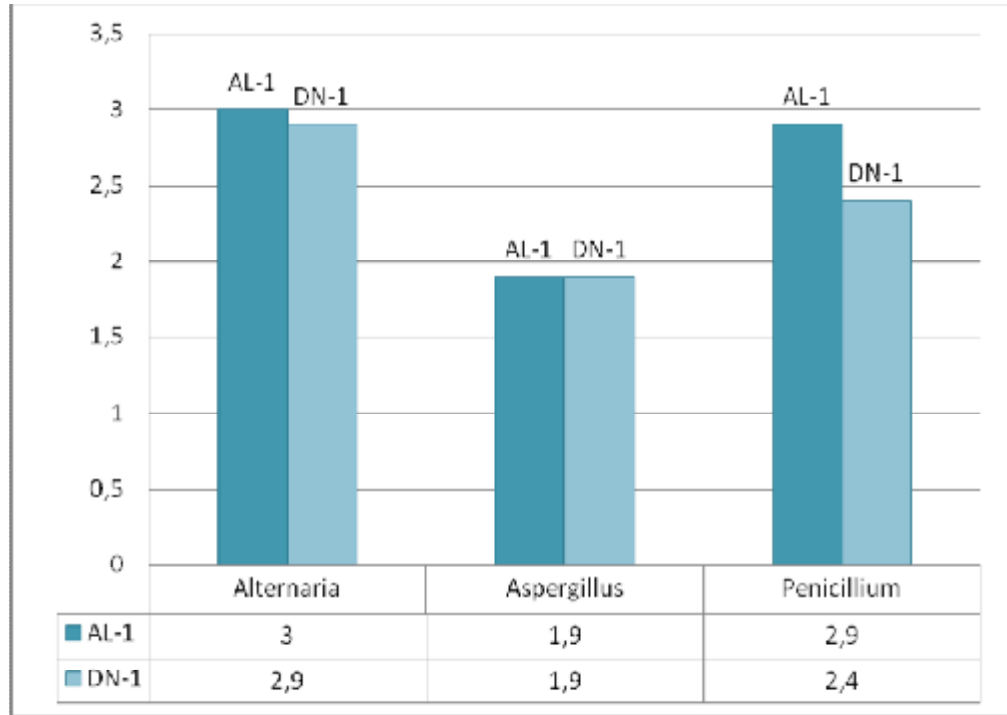
şekil 4.50. *Bacillus* sp.DN-1 suşunun
Aspergillus sp. spor
çimlenmesi inhibisyonu



şekil 4.51. *Bacillus* sp.AL-1 suşunun
Penicillium sp. spor
çimlenmesi inhibisyonu



şekil 4.52. *Bacillus* sp.DN-1 suşunun
Penicillium sp. spor
çimlenmesi inhibisyonu



Şekil.4.53. *Bacillus* sp. AL-1 ve DN-1 suşlarının spor çimlenmesi inhibisyon zon çaplarının (cm) karşılaştırılması

4.2. Tartışma

Bacillus cinsi; içerisinde yer alan bir çok türün geniş spektrumlu antibiyotik üretmeleri, spor oluşturmalarından dolayı ticari formülasyonlarının kolaylığı ve *Bacillus subtilis* gibi hiçbir patojenite göstermeyen türlerin bulunması nedeniyle “Biyokontrol” çalışmalarında özellikle son 10 yıl içerisinde çok geniş olarak çalışılan bir cinstir (Cawoy ve ark.2011). Çizelge 1.3’ de gösterildiği üzere; alan çalışmaları yapılmış olan bir çok suş ticari olarak da tarımda biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Ancak Şekil 1.1.’ de de gösterilmeye çalışıldığı üzere dünya genelinde biyokontrol ajanlarının piyasa payı sentetik pestisidlere oranla çok düşük miktardadır. Dünyada ve ülkemizde bilinçli tarım çalışmaları yaygın olmadığından kimyasal pestisidlere oranla kullanımı da çok düşük düzeyde kalmaktadır. (DPT, 2006). Ayrıca çok uzun yıllar Avrupa ve ABD ülkelerinde insan sağlığına zararlı olduğu gerekçesiyle ülkemizdeki yasal mevzuatların yetersizliği nedeniyle bu sentetik pestisidlerin ithalatı yapılarak, tarımda bayii önerileri ile bilinçsizce kullanılmış ve kullanılmaya devam etmektedir. Hatta bu kullanımların neticesi olarak

ihracat kriterlerine uymadığı gerekçesiyle tarım ürünlerinin ihracatları yapılamamakta ve dolayısıyla ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Durmuşoğlu ve ark, 2010).

Birçok biyokontrol çalışmasında gösterildiği üzere *Bacillus* sp. suşlarının geniş spektrumlu antifungal aktivitelerinin olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark.,2003, Liu ve ark.,2007, Wang ve ark.,2012). Laboratuvarımızda izole edilen özellikle DN-1 ve AL-1 suşlarının farklı mantar cinsine yüksek antagonizma gösterdiği tespit edilmiş ve geniş spektruma sahip olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Biyokontrol çalışmaları patojen türler üzerinde yapılmaktadır. *Candida* sp, insan patojeni ve gıda bozulma etkeni, *Aspergillus*, *Alternaria* ve *Penicillium* ise hem gıdalarda bozulma etkeni hem de hasat öncesi tarım alanlarının ve hasat sonrası ürün depolarının patojenidir. Dolayısıyla bu türlerin biyokontrolü büyük önem arz etmektedir. Ancak çalışmamızda tıbbi bir mantar olan *Trametes versicolor* üzerine de antifungal aktivite denemeleri yapılmıştır. Aslında önemli basidiomycetes gruplarının en başarılı temsilcilerinden biri olan *Trametes versicolor* ile seçtiğimiz antifungal etkili *Bacillus* suşlarının karşılıklı etkileşimlerini ortaya koymakta *Ganoderma* ve *Pleurotus* steril substratlarda kültürü yapılabilen mantar gruplarının meyva geliştirme ortamlarında veya genellikle tahıl spawnı şeklinde hazırlanan gelişme aşamalarında *Trichoderma* ve *Verticillium* gibi ortakçı veya parazit mantarlara karşı korunması amacıyla bu *Bacillus* ürünlerinin ortama katılması ile gerek ürün kalitesi gerekse ürün düzeyinde pozitif bir gelişme sağlanması hedeflenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Adana ili topraklarından elde edilen yaklaşık 50 *Bacillus* sp. suşu içerisinde seçilen 9 farklı suşun *Candida* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. ve *Trametes versicolor* mantarları üzerine antifungal aktiviteleri gösterilmiştir. Bu 9 suş içerisinde ise *Bacillus* sp. AL-1 ve *Bacillus* sp. DN-1 suşlarının tüm mantarlar üzerinde yüksek düzeyde etkinliklerinin bulunduğu tespit edilmiştir. *Bacillus* sp. AL-1 ve *Bacillus* sp. DN-1 suşlarının *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. test organizmalarının spor germinasyonu üzerine de yüksek düzeyde etkinliği olduğu gösterilmiştir.

Bacillus sp. AL-1 ve *Bacillus* sp. DN-1 suşlarının çalışmamızda gösterdiğimiz üzere, geniş spektrumlu antifungal etkinliği göz önünde bulundurularak tarımda kullanılabilecek bir biyokontrol ajanı potansiyeli olduğu söylenebilir. Ancak biyokontrol ajanı olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi için saha denemeleri, ticari formülasyon kriterleri, patojenite durumu, ortam şartlarının değişimine gösterecekleri davranışlar gibi birçok parametrenin belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca bu suşların biyokontrolde avantaj sağlayacak diğer mekanizmalara ne ölçüde sahip olduğu ile ilgili de çalışmalar yapılması yararlı olacaktır. Ek olarak; sözkonusu suşların etki spektrumunun genişliği konusunda patojenik diğer funguslar üzerine de antifungal etkinliği çalışmaları yapılabilir.

Çalışmamızda yer alan tüm *Bacillus* suşlarının hemolitik aktivite göstermesi suretiyle Sürfaktin ürettikleri de gösterilmiştir. Bir biyosürfektan olan Sürfaktin üretimi *Bacillus* türlerinin biyofilm oluşturmalarını sağlayarak mikroçevrelerinde kolonizasyonlarını sağlaması açısından önemli bir kriterdir (Rahman ve Ano, 2009). Ayrıca Sürfaktin *Bacillus* sp. suşlarının ürettiği birçok antibiyotiğe sinerjistik etki göstermesi nedeniyle de önemlidir.

Bacillus sp. AL-1 ve *Bacillus* sp. DN-1 suşlarının geniş spektrumlu güçlü antifungal aktivitesinin, çizelge1.3.de gösterilen ticari suşlarla aktiviteleri karşılaştırılarak bu suşların değerlendirilmesi de düşünülmelidir.

Dünyanın en zengin gen kaynaklarına sahip coğrafyalarından olan ülkemizdeki biyolojik kaynakların değerlendirilmesi, hem ekonomik değeri bulunan

hem de daha verimli ve etkin endüstriyel suş eldesi sağlayacaktır. Birçok çalışmada zirai kapsamda biyokontrol etkinliği tespit edilen bakteriyel suşların patojenin konağı olan bitkilerin rizosfer tabakasından ya da yüzeysel dokularından izole edildikleri görülmektedir. Dolayısıyla ülkemizde biyokontrol çalışmalarına kaynak olabilecek daha fazla sayıda suş eldesi çok farklı çevrelerden elde edilerek mümkün olabilir.

KAYNAKLAR

- AĞAR S., AYDINOĞLU H., TEMEL O., İKİZÜNAL K., ECE H., 1991, Pestisit Kullanımının Tarihçesi, Bugünü ve Geleceği, Türk Entomoloji Dergisi, 15:4, 247-256
- ANONYMOUS, 1978. Mikrobiologisches Handbuch. E.Merck, Darmstadt, 438s.
- AYGAN A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği, Ç. Ü. Fen Edebiyat Fakültesi, Adana, Doktora tezi, 186s.
- AYGAN A., ARIKAN B., KORKMAZ H., DİNÇER S., ÇOLAK Ö., 2008, Highly thermostable and alkaline α -Amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68, Brazilian Journal of Microbiology 39:547-553
- BAYSAL Ö., ÇALIŞKAN M., YEŞİLOVA Ö., 2008, An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, Physiological and Molecular Plant Pathology 73 (2008) 25-32
- BORISOVA S.A., CIRCELLO B.T., ZHANG J.K., VAN DER DONK W.A., METCALF W.W. 2010, Biosynthesis of rhizocticins, antifungal phosphonate oligopeptides produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Chem Biol.* 17(1), 1-22
- BOTTONE B.J., PELUSO R.W., 2003, Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: preliminary report, Journal of Medical Microbiology, 52, 69– 74
- BROGGINI G.A.L., DUFFY B., HOLLIGER E., SCHARER H.-J., GESSLER C., PATOCCHI A., 2005, Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro) in a Swiss apple orchard, European Journal of Plant Pathology (2005) 111: 93-100
- 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
- ÇETİN, E.T., 1968. Pratik Mikrobiyoloji. 2.baskı, İstanbul, 645s.

- CHEN Y., FANG Y., CHAI Y., LIU H., KOLTER R., LOSICK R., GUO J., 2012, Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation, Society for Applied Microbiology, 1-17
- CHITARRA G.S., BREEUWER P., NOUT M.J.R., VAN AELST A.C., ROMBOUTS F.M., ABEE T., 2003, An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores, Journal of Applied Microbiology 94, 159-166
- CHUNG S., KONG H., BUYER J.S., LAKSHMAN D.K., LYDON J., KIM S. ROBERTS D.P., 2008, Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper, Applied Microbial And Cell Physiology, (80) 115-123
- COŞKUNTUNA A., YONSEN Ş., ÖZER N., DEMİR M. ATEŞ D., 2011, Marulda Kurşuni Küf Hastalığının Örtüaltı Koşullarında Biyolojik Mücadelesi, Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, s 484
- CUI T.G., CHAI H.Y., JIANG L.X., 2012, Isolation and Partial Characterization of an Antifungal Protein Produced by *Bacillus licheniformis* BS-3, Molecules, (17), 7336-7347
- Devlet Planlama Teşkilatı Müsteşarlığı, 9. Kalkınma Planı (2007-2013) Gıda Güvenliği, Bitki ve Hayvan Sağlığı Özel İhtisas Komisyonu (2006)
- DURMUŞOĞLU E., TIRYAKI O., CANHİLAL R., Türkiyede pestisit kullanımı, kalıntı ve dayanıklılık sorunları, Türkiye Ziraat Mühendisliği 7. Teknik Kongresi, 11-15 Ocak 2010, Ankara. Bildiriler Kitabı 2, 589-607.
- FERNANDO, W. G. D., S. NAKKEERAN, S., ZHANG, Y., SAVCHUK, S., 2007, Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals, Crop Protection 26:100– 107
- FICKERS P., 2012, Antibiotic Compounds from *Bacillus*: Why are they so Amazing ?, American Journal of Biochemistry and Biotechnology 8 (1):40-46
- GEISER D.M., DORNER J.W., HORN B.W., TAYLOR J.W., 2000, The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *A.flavus* and *A.oryzae*. Fungal Genetics and Biol.31:1-11.

- GROVER M., NAIN L., SAXENA A.K., 2009, Comparision between *Bacillus subtilis* RP24 and its antibiotic-defective mutants, World J Microbiol Biotechnol 25:1329-1335
- 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, Curr Microbiol (2010) 60:99-106
- GULLINO M. L., KUIJPERS L. A. M., 1994, Social and politicial implication of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. Annu. Rev. Phytopath., 32: 559-579.
- GÜZELDAĞ G., 2007, Polyporaceae türlerinde (*Ganoderma* spp.,ve *Trametes* spp.) üretim ve biyoteknolojik optimizasyon olanaklarının araştırılması, Ç. Ü. Fen Edebiyet Fakültesi, Adana, Doktora tezi, 134s.
- HUANG C., JHA A., SWEANY R., DEROBERTIS C., DAMANN K.E. JR, 2011, Intraspesific Aflatoxin Inhibition in *Aspergillus flavus* Is Thigmoregulated, Independent of Vegetative Compatibility Group and Is Strain Dependent, PLoS ONE 6(8)
- INTANA W., YENJIT P., SUWANNO T., SATTASAKULCHAI S., SUWANNO M., CHAMSWARNG C., 2008 Efficacy of Antifungal Metabolites of *Bacillus* spp. For Controlling Tomato Damping-off Caused by *Pythium aphanidermatum*, Walailak J Sci & Tech. 5 (1) 29-38
- JUNG, KYOUNG H., KIM S. D., 2005, An antifungal antibiotic purified from *Bacillus megaterium* KL39, a biocontrol agent of red-pepper *Phytophthora*-Blight Disease, J. Microbiol. Biotechnol.15(5), 1001-1010
- KILDEA S., RANSBOTYN V.,KHAN M.R., FAGAN B., LEONARD G., MULLINS E., DOOHAN F.M., 2008, *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat, Biological Control (47) 37– 45
- KIM H., PARK J., CHOI S., CHOI K., LEE G., BAN S., LEE C., KIM C., 2003, Isolation and Characterization of *Bacillus* Strains for Biological Control, The Journal of Microbiology, 196-201

- KIM H., SANG M.K., MYUNG I., CHUN S., KIM K.D., 2009, Characterization of *Bacillus luciferensis* strain KJ2C12 from pepper root, a biocontrol agent of phytophthora blight of pepper, Plant Pathology Journal, 25(1), 62-69
- KIM P., RYU J., KIM Y.H., CHI Y.T., 2009, Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*, Journal of Microbiology and Biotechnology (20), 138-145
- KUMAR A., SAINI P., SHRIVASTAVA J.N., Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*, 2009, Indian Journal of Experimental Biology Vol 47, 57-62
- LI L., MA J., LI Y., WANG Z., GAO T., WANG Q., 2012, Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt, Crop Protection 35 (2012) 29-35
- LIN H.F., CHEN T.H., LIU S.D., 2011, The antifungal mechanism of *Bacillus subtilis* against *Pestalotiopsis eugeniae* and its development for commercial applications against wax apple infection, African Journal of Microbiology 5(14) : 1723-1728
- LIU Y., CHEN Z., LIU Y., WANG X., LUO C., NIE Y., WANG K., 2011, Enhancing bioefficacy of *Bacillus subtilis* with sodium bicarbonate for the control of ring rot in pear during storage, Biological Control 57 (2011) 110-117
- LIU Y., CHEN Z., NG T.B., ZHANG J., ZHOU M., SONG F., LU F., LIU Y., 2007, Bacisubin, a antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916, Peptides 28 (2007) 553-559
- MALDONADO M. C., CORONA J., GORDILLO M.A., NAVARRO A. R., 2009, Isolation and partial characterization of antifungal metabolites produced by *Bacillus* sp. IBA 33, Curr Microbiol (2009) 59:646-650
- MUHAMMAD S.A., AHMAD S., HAMEED A., 2009, Antibiotic Production By Thermophilic *Bacillus Specie* Sat-4, Pak. J. Pharm. Sci., 22(3), 339-345

- NIHORIMBERE V., ONGENA M., CAWOY H., BROSTAUX Y., KAKANA P., JOURDAN E., THONART P., 2010, Beneficial effects of *Bacillus subtilis* on field-grown tomato in Burundi: Reduction of local *Fusarium* disease and growth promotion, African Journal of Microbiology Research Vol 4(11), 1135-1142
- ONGENA M., JACQUES P., 2007, *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol, Trends in Microbiology Vol.16 No.3, 115-125
- PAL K.K., GARDENER B.M., 2006, Biological Control of Plant Pathogens, The Plant Health Instructor, 1-25
- PERKINS, J.H., 1969, Morphogenesis in *Schizophyllum commune*. I. Effects of whitelight. Plant Physiology, 44:1706-1711
- REBIB H., HEDI A., ROUSSET M., BOUDABOUS A., LIMAM F., SADFI-ZOUAOUI N., 2012, Biological control of Fusarium foot rot of wheat using fengycin-producing *Bacillus subtilis* isolated from salty soil, African Journal of Biotechnology, 11(34), 8464-8475
- ROMEIRO R.S., FILHO R.L., MACAGNAN D., GARCIA F.A.O., SILVA H.S.A., 2010, Evidence that the biocontrol agent *Bacillus cereus* synthesizes protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to *Corynespora cassiicola*, Tropical Plant Pathology, vol. 35, 1, 011-015
- SILO-SUH L.A., STABB E.V., RAFFEL S.J., HANDELSMAN J., 1998, Target Range of Zwittermicin A, an Aminopolyol Antibiotic from *Bacillus cereus*, Current Microbiology (37), 6-11
- SRIRAM M.I., KALISHWARALAL K., DEEPAK V., GRACEROSEPAT R., SRISAKTHI K., GURUNATHAN S., 2011, Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 85 (2), 174-181
- THASANA N., PRAPAGDEE B., RANGKADILOK N., SALLABHAN R., AYE S.L., RUCHIRAWAT S., LOPRASERT S., 2010, *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtelene A, a new lipopeptide antibiotic possessing unusual C15 unsaturated β -amino acid, FEBS Letters 584 (2010), 3209-3214

- WANG J., ZONG Z., SHANG W., QI W. and WANG H., 2012, Activity against *Botrytis cinerea* of *Bacillus amyloliquefaciens* IMAUB1034 isolated from naturally fermented congee, Journal of Food, Agriculture & Environment, 534-542
- WEBSTER J., WEBER R., 2007, Introduction to Fungi, Cambridge University Press, 841s.
- YÁNEZ-MENDIZÁBAL V., ZERIOUH H., VINAS I., TORRES R., USALL J., VICENTE A., PÉREZ-GARCÍA A., TEIXIDÓ N., 2012, Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 based on production of fengycin-like lipopeptides, Eur J Plant Pathol (2012) 132:609-619
- YANG D., WANG B., WANG J., CHEN Y., ZHOU M., 2009, Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and *Sclerotinia* stem rot of rape, Elsevier, 61-65
- YİĞİT F., BAYSAL Ö., 2011, *Bacillus subtilis* ile Bor, Kalsiyum, Potasyum ve Mankozep+metalaxyl' in Farklı Kombinasyonlarının Domateste Geç Yanıklık (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) Hastalığının Çıkışı Üzerine Etkisi, Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, s 482
- 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*, Arch. Biol. Sci. Belgrade, 62(3), 611-623

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Adana Kozan' da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kozan' da tamamladı. 2005 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü' nde lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında mezun oldu ve aynı yıl Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalının Moleküler Biyoloji alanında Yüksek Lisans programına başladı.