

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TOPRAKTAN *PSEUDOMONAS* SPP. İZOLASYONU VE ANTAGONİSTİK
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

İnci GÜLER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2010**

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem Küçük danışmanlığında, İnci Güler'in hazırladığı "Topraktan *Pseudomonas* spp. İzolasyonu ve Antagonistik Etkinliklerinin Belirlenmesi" konulu bu çalışma 15/01/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Çiğdem KÜÇÜK

Üye : Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Üye : Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet CİCİ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 902

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.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. <i>Pseudomonas</i> spp.....	7
2.2. <i>Pseudomonas</i> spp. Mikroorganizmalarının Etki Mekanizmaları.....	11
2.2.1. Antibiosis.....	11
2.2.2. Mikoparazitizm.....	12
2.2.3. <i>Pseudomonas</i> spp.'nin yer ve besinler (C, N, mikroelement) içini rekabeti.....	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Kullanılan mikroorganizmalar ve toprak örnekleri.....	15
3.1.2. Kullanılan fungal patojenler.....	16
3.1.3. Kullanılan mikroorganizmaların gelişimi için besiyerleri.....	17
3.1.4. Kullanılan mikroorganizmaların gelişme ortamı.....	17
3.1.5. Kullanılan çözeltiler.....	17
3.1.6. İzolatların fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	17
3.1.6.1. İzolatların farklı sıcaklık ve farklı tuz konsantrasyonlarında kullanılan ortam.....	17
3.1.6.2. Kullanılan levan üretim ortamı.....	17
3.1.6.3. Karbonhidrat testi için kullanılan ortam.....	18
3.1.6.4. Sitrat testi için kullanılan ortam.....	18
3.1.6.5. Enzimatik aktivite için kullanılan besiyerleri.....	18
3.2. Yöntem.....	19
3.2.1. Toprak örneklerinden <i>Pseudomonas</i> spp. izolasyonu.....	19
3.2.2. Toprak pH'nın ölçümü.....	19
3.2.3. Mac Farland metodu.....	19
3.3. Bakterilerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi.....	20
3.3.1. Gram boyama.....	20
3.3.2. Hareketlilik.....	20
3.3.3. Floresan özellik.....	21
3.3.4. Katalaz.....	21
3.3.5. Oksidaz.....	21
3.4. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	21
3.4.1. İzolatların farklı sıcaklık derecelerine toleranslılıkları.....	21
3.4.2. İzolatların farklı konsantrasyonlardaki tuza toleranslılıkları.....	22
3.4.3. Nitrat redüksiyonu.....	22
3.4.4. Levan üretimi.....	22
3.4.5. Karbonhidrat testleri.....	22
3.4.6. Sitrat analizi.....	23
3.4.7. Antibiyotik dirençlilik testi.....	23
3.5. Antagonistik Aktivite.....	23
3.6. Enzimatik Aktivite.....	24
3.6.1. Amilaz aktivitesi (Nişastanın hidrolizi).....	24
3.6.2. Jelatin hidrolizi.....	24
3.6.3. Fosfataz aktivitesi.....	25
3.6.4. Üreaz aktivite.....	25
3.6.5. Lipaz aktivite (Tween 80 hidrolizi).....	25
3.6.6. Kitinaz aktivite.....	26

3.6.7. Arjinin dehidroleaz	26
3.6.8. Proteaz aktivite.....	26
3.6.9. Sellülaz aktivitesi.....	26
3.6.10. İstatistik analiz.....	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	28
4.1. Rizosfer Toprak Örneklerinden <i>Pseudomonas</i> spp.'nin İzolasyonu	28
4.2. <i>Pseudomonas</i> spp.'nin Bazı Morfolojik Özellikleri	28
4.2.1. Gram reaksiyonları.....	28
4.2.2. Floresan özellik.....	30
4.2.3. Hareketlilik.....	31
4.2.4. Levan analizi.....	31
4.2.5. Sitrat analizi.....	33
4.2.6. Nitrat redüksiyonu.....	34
4.2.7. Oksidaz testi.....	35
4.2.8. Katalaz testi.....	35
4.4. <i>Pseudomonas</i> spp. İzolatlarının Farklı Sıcaklık ve Tuza Toleranslıkları.....	36
4.5. <i>Pseudomonas</i> spp. İzolatlarının Farklı Karbon Kaynaklarındaki Gelişimleri.....	39
4.6. <i>Pseudomonas</i> spp. İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları.....	43
4.7. <i>Pseudomonas</i> spp. İzolatlarının Antagonist Aktiviteleri.....	48
4.8. <i>Pseudomonas</i> spp. İzolatlarının Enzim Aktiviteleri.....	59
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	67
5.1. Sonuçlar.....	67
5.2. Öneriler.....	68
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	77
EKLER.....	78
EK 1 Kullanılan Mikroorganizmaların Gelişimi için Besiyerleri.....	78
EK 2 Kullanılan Mikroorganizmaların Gelişme ortamı.....	81
EK 3 Kullanılan Çözeltiler.....	82
EK 4 İzolatların Farklı Sıcaklık ve Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Kullanılan Ortam.....	84
EK 5 Kullanılan levan üretim ortamı.....	85
EK 6 Karbonhidrat testi için kullanılan ortam.....	86
EK 7 Sitrat testi için kullanılan ortam.....	87
EK 8 Enzimatik aktivite için kullanılan besiyerleri.....	88
ÖZET.....	93
SUMMARY.....	94

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

TOPRAKTAN *PSEUDOMONAS* SPP. İZOLASYONU VE ANTAGONİSTİK ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

İnci GÜLER

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Çiğdem KÜÇÜK
Yıl: 2010, Sayfa: 94

Bu araştırmada, Şanlıurfa ve çevresinde tarım yapılan alanlarından 47 tane *Pseudomonas* spp. bakterisi izole edilmiştir. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal aktiviteleri incelenmiştir. Bitkilerde hastalıklara neden olan fungal patojenlerden *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium chlamyosporum*, *Alternaria alternata*, *Drechslera sorokiniana*, *Ascochyta rabiei*'ye karşı izolatların antagonistik aktiviteleri *in vitro* koşullarda belirlenmiştir. Deneyler 3 paralelli olarak yürütülmüştür. Çalışma sonunda izole edilen 47 izolatın yapıları biyokimyasal gram negatif olduğu ve *Pseudomonas* spp.'nin özelliklerini gösterdiği belirlenmiştir. İzolatlardan B1, B5, B8, B16, N14, D11, BA2'nin sellüloz ve arjinin dehidrolaz aktivitesine sahip olduğu, N14 ve BA2'nin üreaz, sellüloz, arjinin dehidrolaz ve kitinaz ürettikleri bulunmuştur. Çalışmada test edilen bitki patojenlerine karşı *Pseudomonas* B1 izolatının %60.75, *Pseudomonas* B8 izolatının %58, *Pseudomonas* B2 izolatının %50.37'lik oranla etkili olduğu istatistiki olarak önemli bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELEER: *Pseudomonas* spp., izolasyon, antagonistik aktivite, enzim aktivitesi

ABSTRACT

MSc Thesis

ISOLATION OF *PSEUDOMONAS* SPP. FROM SOIL and DETERMINATED OF ANTAGONISTIC ACTIVITIES

İnci GÜLER

Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Çiğdem KÜÇÜK

Year: 2010, Page: 94

In this research, 47 *Pseudomonas* sp. bacteria were isolated in rhizosphere which were cultivated in Şanlıurfa and around. The physiological, morphological and biochemical activities of these isolates were researched, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium moniliforme*, *F. chlamyosporum*, *Alternaria alternata*, *Drechslera sorokiniana* and *Ascochyta rabiei*, which were led to diseases in agriculture crops. The antagonistic activities of the isolates were displayed *in vitro* conditions towards fungal pathogens which were led to diseases. Experiments were carried out in three parallels. At the end of the research, 47 isolates isolated were determined as gram negative and it was researched that they have the characteristics of *Pseudomonas* sp. That *Pseudomonas* B1, B5, B8, B16, N14, D11, BA2 from our isolates had cellulase and arginine dehydrolase activities and that *Pseudomonas* N14 and BA2 produced urease, cellulase, arginine dehydrolase and chitinase were found. Consequently, in the research, 60.75% of the *Pseudomonas* B1 isolate, 58 % of the *Pseudomonas* B8 isolate, 50.37 % of the *Pseudomonas* B2 isolate were found statistically as important against tested plant pathogens.

KEY WORDS: *Pseudomonas* sp., isolation, antagonistic activity, enzyme activity

TEŞEKKÜR

Bana bu araştırma konusunu veren Yüksek Lisans programı süresince teknik konularda yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarım sırasında desteğini aldığım saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Çiğdem KÜÇÜK'e teőekkürlerimi sunarım. Yardımlarını esirgemeyen Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Nihat DİLSİZ'e, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanı Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR'e, istatistik analizlerinde Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Yrd. Doç. Dr. Zeki DOęAN'a, ayrıca teknik konuda bana destek olan merkezi laboratuvar personeline, kimya bölümü öğretim üyelerine ve diğer değerli hocalarıma sonsuz minnet ve Őukranlarımı sunar, teşekkür ederim.

Ayrıca tez dönemim boyunca her zaman yanımda olan bana destek olan aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 4.1. <i>Pseudomonas</i> B15 izolatının mikroskop altında görünümü.....	29
Şekil 4.2. <i>Pseudomonas</i> N14 izolatının petri kutusunda görünümü.....	29
Şekil 4.3. <i>Pseudomonas</i> spp. B1, B2, B3, B4 'ün 254 nm' de görünümü; B1 ve B2 mavi, B3 sarı yeşil, B4 renksiz.....	30
Şekil 4.4. <i>Pseudomonas</i> D10, B25, BA13, D4 izolatlarının sitrat analiz sonucu; B25, D4 sitratı kullanabilen, D10 ve BA13 sitratı kullanamayan	34
Şekil 4.5. <i>Pseudomonas</i> B6, B8 ve B1 izolatlarının katalaz test sonucu; B6, B8, B1 katalaz pozitif	35
Şekil 4.6. <i>Pseudomonas</i> D10, B22, B24, D1, B17, B23, B19 ve N14 izolatlarının ampisiline dirençlilikleri. B17 duyarlı; B23, B17, D1, B24, B22, D10, N14 dirençli.....	44
Şekil 4.7. <i>Pseudomonas</i> B22, B14, B9, B23, B4, B7, B21, B8 izolatlarının 250 µg/ml dozdaki kloromfenikole dirençlilikleri.....	45
Şekil 4.8. <i>Pseudomonas</i> B20, D4, N11, B2, BA13, B10, M2, BA23 izolatlarının 250 µg/ml'lik dozda sikloheksimide dirençlilikleri. B10, B20, D4, B2 dirençli; N11, BA23, M2, BA13 duyarlı.....	46
Şekil 4.9. <i>Pseudomonas</i> N11 ve BA19'un <i>F. solani</i> 'ye karşı görünümü.....	48
Şekil 4.10. <i>Pseudomonas</i> B23 ve D6 izolatlarının <i>A. rabiei</i> ile etkileşimi.....	49
Şekil 4.11. <i>Pseudomonas</i> B14 ve D3'ün <i>F. accuminatum</i> 'a etkisi.....	50
Şekil 4.12. <i>Pseudomonas</i> B2 ve D4, <i>Pseudomonas</i> D6, B23 İzolatlarının <i>F. culmorum</i> 'a karşı görünümü	51
Şekil 4.13. İzolatların fungal patojenlere karşı %RI değerleri.....	52
Şekil 4.14. <i>Pseudomonas</i> B17, BA2, N13, D8 izolatlarının amilaz aktivitesi.....	60
Şekil 4.15. <i>Pseudomonas</i> N14, M2, B22 ve B5 izolatlarının selülaz aktivitesi.....	63
Şekil 4.16. <i>Pseudomonas</i> B16, B1, B5 ve B8 izolatlarının kitinaz aktivitesi.....	64
Şekil 4.17. <i>Pseudomonas</i> M2, N11, N13 ve N14 izolatlarının kitinaz aktivitesi.....	64
Şekil 4.18. <i>Pseudomonas</i> D5 üreaz aktivitesinin kontrol grubuyla birlikte görünümü.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. Fungal bitki patojenlerine karşı biyolojik mücadele için toprak kökenli antagonist <i>Pseudomonas</i> spp. türleri...	3
Çizelge 3.1. <i>Pseudomonas</i> spp. 'nin izole edildiği ve örneklerin alındığı yerler.....	15
Çizelge 3.2. Mac Farland metodu.....	19
Çizelge 4.1. Farklı toprak örneklerinden izole edilen, farklı besiyerlerinden gelişme gösteren <i>Pseudomonas</i> spp. izolatları.....	28
Çizelge 4.2. İzolatların morfolojik özellikleri.....	32
Çizelge 4.3. İzolatların farklı sıcaklık ve tuza toleranslıkları.....	38
Çizelge 4.4. İzolatların farklı karbon kaynaklarındaki gelişimleri.....	41
Çizelge 4.5. İzolatların antibiyotik konsantrasyonlarına etkisindeki % oranları.....	47
Çizelge 4.6. Varyans analiz tablosu.....	53
Çizelge 4.7. İzolatların Duncan testine göre etkinlikleri.....	53
Çizelge 4.8. İzolatların farklı fungal patojenlere karşı % engellemesi.....	54
Çizelge 4.9. İzolatların Duncan testine göre bitki patojenlerine etkinlikleri.....	56
Çizelge 4.10. İzolatların inhibisyon zonları.....	57
Çizelge 4.11. <i>Pseudomonas</i> spp. izolatlarının enzim aktiviteleri.....	62

SİMGELER DİZİNİ

Ca	: Kalsiyum
cm	: Santimetre
ml	: Mililitre
L	: Litre
FeSO ₄	: Demir sülfat
gr	: Gram
H ₂ O	: Su
K ₂ SO ₄	: Potasyum sülfat
KCl	: Potasyum klorür
mm	: Milimetre
PDA	: Patates Dekstrozo Agar
pH	: Toprak reaksiyonunun ifadesi
TSA	: Tryptic Soy Agar
PIA	: Pseudomonas İzolasyon Agar
GPA	: Gliserin Pepton Agar
KB	: King's B Ortamı
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
NaCl	: Sodyum klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
KNO ₃	: Potasyum nitrat
NH ₄ H ₂ PO ₄	: Amonyum fosfat
(NH ₄) ₂ SO ₄	: diAmonyum sülfat
Mn SO ₄	: Mangan sülfat
Fe SO ₄	: Demir sülfat
KI	: Potasyum iyodür
NaOH	: Sodyum hidroksit
M	: Molarite
R	: Patojen fungusun bakterisiz taraftaki gelişimi
r	: Patojen fungusun bakteriye doğru olan gelişimi
%RI	: İnhibisyon oranı

1. GİRİŞ

Günümüzde bitkisel ürünlerin yaklaşık %30'u hastalık ve zararlılar tarafından yok edilmektedir. Bu zararların büyük kısmını mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Bitki hastalıklarına karşı kimyasal mücadele ile ortaya çıkmış olan dirençlilikten dolayı, gelişmiş ülkelerde alternatif yöntem olarak biyolojik mücadele çalışmaları önem kazanmıştır (Ahmad ve ark., 2008). Hastalık etmenlerinin tanısında, hastalıklarla savaşmada serolojik yöntemler, gen teknolojileri ve bağışıklık mekanizmaları üzerindeki yoğun çalışmalar bitki hastalıkları bilimine yeni bir boyut kazandırmıştır. Toprak kökenli hastalık etmenleri ile mücadele oldukça zor olup, bu grup üyelerine karşı fungusit uygulamaları ile istenilen etki de elde edilememiştir (Vessey, 2003).

Son yıllarda, çevre ile dost ve uzun süre etkili olacak bir mücadele yöntemi olan biyolojik mücadele ön plana çıkmıştır (Avis ve ark., 2008). Bitki patojenlerine karşı mücadele yöntemlerinin yetersiz kalması ve çevre sağlığı konusunda hassasiyetin artması, araştırmacıları ekolojik tarım çerçevesinde, biyolojik mücadele alanında çalışmaya ve biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılacak mikroorganizmaları bulmaya yöneltmiştir (Delen ve Tosun, 1997). Biyolojik mücadele etmeni olarak toprak bakterilerinden *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Azotobacter* spp., *Azospirillum*, *Pantoea* ve *Entereobacter* spp.'nin kullanımı son yıllarda önem kazanmıştır (Egamberdiyeva, 2005; Avis ve ark., 2008). Rizosferde bulunan *Pseudomonas* spp. bakterileri biyolojik mücadelede kullanıldığı gibi ayrıca bitki gelişimini teşvik edici bakteriler (PGPR) olarak ta bilinmektedirler. Bitki gelişimine direk yada dolaylı olarak etki gösterirler (Kloepper ve ark., 1989). Yapılan bir çalışmada Fluorescent *Pseudomonas* izolatların antifungal bileşikler üretilip patojen gelişmesini inhibe etmeleri ile biyokontrol sağlandığı belirlenmiştir (Haas ve ark., 1991). Biyokontrol etmeni olarak kullanılan bu mikroorganizmalar sadece toprak kökenli fungal patojenlere karşı değil aynı zamanda bitkiyle etkileşimli olup, ürünün gelişimini arttırıp ve rekabetçi özelliğiyle rizosferde uygun koşulların oluşmasını sağlarlar (Kloepper ve ark., 1989). Biyokontrol etmeni

olarak *Pseudomonas* sp. çalışmaları ilk olarak 1970'li yıllarda Berkeley tarafından Kaliforniya'da başlamıştır.

Pseudomonas bakterilerinin antibiyotik üretimleri incelenmiş ve toprak kökenli fungal patojenlere karşı etkili olduğu saptanmıştır. *Pseudomonas* spp. aerobik, gram negatif olup, tarımsal topraklarda yaygın olarak bulunan ve toprak kök yüzeyine adapte olmuş mikroorganizmalardır (Cook ve Baker, 1983).

Doğal veya modifiye edilen mikroorganizmalar yada bu organizmalar tarafından üretilen metabolitler kullanılarak istenmeyen zararlı organizmaların etkisinin azaltılması veya populasyonlarının baskı altına alınması olan biyolojik mücadele (Weller 1988; Jayaswal ve ark., 1990; Thomashow ve Weller, 1995; Oedjijono ve ark., 1993; Avis ve ark., 2008) çalışmalarında *Pseudomonas* bakterileri geniş kullanım alanına sahip oldukları gibi bitki gelişimini etkileyen etmenler olarakta kullanılmaktadır (Kloepper ve ark., 1980). Toprakta yaygın olarak bulunurlar. Çevrede toprak kök yüzeylerinde hızlı şekilde kolonize olma yeteneğindedirler. *In vitro*'da hızlı bir şekilde gelişme yeteğine sahiptirler. Bu mikroorganizmalar bitki için gerekli olan antibiyotik, siderefor, uçucu bileşikler gibi biyoaktif metabolitler üreterek diğer zararlı mikroorganizmalarla rekabete girerler. Sahip oldukları enzimlerle ve ürettikleri antibiyotik benzeri bileşiklerle toprakta bulunan bazı fitopatojenleri baskı altına alma yeteneğine sahip oldukları bildirilmiştir (Whipps, 2001; Vivekananthan, 2004).

Bitkinin kök bölgesinde hızla kolonize olan, bitkide sistemik direnci tetikleyen uçucu yada uçucu olmayan antifungal antibiyotik üretimleri incelenmiştir (Haas ve Keel, 2003). Yapılan çalışmalarda *Pseudomonas* spp.'nin fenazin-1-karboksilik asit (PCA), 2,4 diasetilfloroglukinol (DAPG), pirolnitrin (Pn), piyoluterin (Plt) gibi antibiyotik ürettikleri belirlenmiştir (Fravel, 1988; Thomashow ve Weller, 1988). Günümüzde de modern tarımsal uygulamalarda bu bakteri biyokontrol etmeni olarak uygulanmaktadır (Haas ve Defago, 2005; Guo ve ark., 2004). *Pseudomonas* spp. bakterilerinin çeşitli bitkilerde farklı fungal patojenlere karşı olan etkinlikleri Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Fungal bitki patojenlerine karşı biyolojik mücadele için toprak kökenli antagonist *Pseudomonas* türleri (Whipps, 2001).

<i>Pseudomonas</i> türleri	Fungal Patojen	Bitki
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis- lycopersici</i>	Domates
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> AB244	<i>Pythium ultimum</i>	Domates
<i>P. aureofaciens</i> 63-28	<i>P. aphanidermatum</i>	Hıyar
<i>Pseudomonas chlororapsis</i> MA342	<i>Drechslera graminea</i>	Arpa
	<i>D. teres</i>	Arpa
	<i>D. avenae</i>	Yulaf
	<i>Ustilogo avenae</i>	Yulaf
	<i>U. hordei</i>	Arpa
	<i>Tilletia caries</i>	Buğday
<i>P. chlororapsis</i> PCL 1391	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp.	Domates
<i>Pseudomonas corrugata</i> 13	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Hıyar
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	Turp
<i>P. fluorescens</i> Q8rl-96	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Buğday
<i>P. fluorescens</i> BTP7	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Hıyar
<i>P. fluorescens</i> VO61	<i>Rhizoctani solani</i>	Pirinç
<i>P. putida</i> BTP1	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Hıyar

Pseudomonas spp.'nin domateste görülen *Fusarium oxysporum*'a; *Pseudomonas aureofaciens*'in domateste hastalık yapan *Pythium ultimum*'a; *Pseudomonas aureofaciens*'in hıyarda *Pythium aphanidermatum*'a; *Pseudomonas chlororapsis*'in arpada kök çürüklüğüne neden olan *Drechslera graminea* ve *D. teres* 'e, yulafta ise *D. avenae* ve *Ustilogo avenae*'ye, arpada *U. hordei* ve buğdayda *Tilletia caries*'e, domateste solgunluk oluşturan *Fusarium oxysporum*'a; *Pseudomonas corrugata*'nın hıyarda *Pythium aphanidermatum*'a; *Pseudomonas fluorescens*'in turpta *Fusarium oxysporum*'a, buğdayda *Gaeumannomyces graminis*'e, hıyarda *Pythium aphanidermatum*'a, pirinçte kök çürüklüğüne neden olan *Rhizoctani*

solani'ye; *Pseudomonas putida*'nın ise hıyarda da *Pythium aphanidermatum*'a karşı etkili oldukları belirlenmiştir (Whipps, 2001).

Kimyasal ilaç kullanımı yerine; çevreyi kirletmeyen ve çevreyle dost olan antagonistik mikroorganizmaların doğrudan veya dolaylı olarak kullanımı gerekmektedir. Biyolojik mücadelede kullanılacak başarılı antagonist mikroorganizmaların endüstriyel olarak; fazla pahalı olmayan kepek, talaş, buğday samanı, linyit granülleri, mısır unu, kum kültürü, peat gibi substratların üzerinde hızla fermantasyonu sağlanmalı, kolayca üretilebilmeli, patojen mikroorganizmalara öldürücü hızı yüksek olmalı, doğal şartlarda kararlı olmalı, kullanım zamanına kadar kararlı kalmalı, ekonomik olmalı, insanlar ve diğer organizmalar için tehlikesiz olması gerekmektedir (Fravel, 2005).

Biyolojik mücadele toprakta mikrobiyal dengenin sağlanması açısından önemlidir (Vessey, 2003). Biyolojik mücadelenin en önemli yararı hastalıkları kontrol altına alırken, çevreye herhangi olumsuz etkisinin olmamasıdır (Kloepper, 1991).

Biyolojik mücadele etmeni olarak geniş bir kullanıma sahip olan *Pseudomonas* spp. bakterileri antibiosis, mikroparazitizm, yer ve besin için rekabet gibi etki mekanizmalarına sahip olduklarından fungal patojenlerin toprakta bulunan popülasyonunu sınırlandırdığı ve bu patojenlerin neden oldukları hastalıkları azalttıkları yapılan çalışmalarda incelenmiştir (Haas ve Defago, 2005; Fravel, 1988).

Tarım yapılan alanlarda sık görünen bitki gelişimini önleyen, ürünlerde hasara yol açan belirli fungal patojenlere karşı *in vitro* koşullarda, Şanlıurfa ve çevresinde tarımı yapılan alanların kök bölgesinden biyokontrol etmeni olan *Pseudomonas* spp. bakterilerinin izolasyonunu yapmak, toprak kökenli bazı fungal bitki patojenlerinin gelişimleri üzerine antagonistik etkilerinin belirlenmesi ile bu patojenlerin neden olduğu zararı minimuma indirmek için bir çalışma amaçlanmıştır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Howell ve Stipanovic (1980), *Pseudomonas fluorescens*'in bir izolatının pamukta *Pythium ultimum*'un neden olduğu çökerten hastalığını engellediği, yapılan genetik çalışmalarda *P. fluorescens* tarafından salgılanan Oomycin A adında bir antibiyotik bu etkileşimde önemli rol oynadığını incelemiştir.

Linberg ve Granhall, (1984); Jayaswal ve ark., (1993); Pandey ve ark., (2001), tarafından yapılan sera çalışmalarında, *Pseudomonas putida*'nın mısır ve buğdayda sırasıyla *Fusarium oxysporum* solgunluğu ve *Gaeumannomyces graminis*'in gelişimini engellediklerini ve böylece bitkilerin hastalanmadığını belirlemiştir. Ayrıca aynı araştırmacılar, siderofor üreten fluorescent *Pseudomonas* izolatlarının domates ve kavunda *Fusarium oxysporum*'un neden olduğu solgunlukları engelleyici etkisini iki yıllık tarla denemesinde araştırmışlardır. Seçilen 7 izolatın kavun ve karpuz tohumlarına uygulanmasıyla hastalık şiddetinin kontrollere göre sırasıyla, %84 ve % 43 oranında azaldığını bildirmişlerdir.

Fravel (1988); Bangera ve Thomashow (1996); Louws ve ark., (2001), tarafından yapılan çalışmalarda *Pseudomonas fluorescens* CHAO izolatının, hıyar ve mısırdaki *P. ultimum*'un neden olduğu çökerten hastalığını izolatların ürettikleri piyoluteorin ve 2,4-diasetilfloroglukinol gibi iki metabolit ile engellediği kanıtlanmıştır.

Fravel (1988); Bangera ve Thomashow (1996) yaptıkları çalışmalarda *Pseudomonas* izolatları tarafından üretilen 2,4-diasetil-floroglusinol'un *Pythium* türlerinin gelişmesini inhibe ettiklerini saptamışlardır.

Jayaswal ve ark. (1993), *Pseudomonas* spp. tarafından üretilen piyoluteorin'in *Alternaria* spp., *Fusarium* spp, *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola* ve *Verticillium* türlerini inhibe ettiğini yaptıkları çalışmada belirlemiştir.

Pseudomonas cinsi izolatlarının glukoz, fruktoz, galaktoz ve L-arabinozu karbon kaynağı olarak kullandıkları bildirilmiştir (Holt ve ark., 1994).

Nielsen ve Sorensen (1997), *Pseudomonas* cinsi bakterilerin bir çok türü tarafından proteolitik enzimlerin üretildiğini, bu enzimlerin hücre içine yerleşmiş, hücre duvarı ile ilişkili (periplazmik) veya ortama salınmış (ekstrasellüler) şekillerde olabileceğini bildirmişlerdir. Chen ve ark. (2000), üretilen proteolitik enzimlerin kazein, jelatin, kollojen ve fibrin gibi substratları indirgeyici özelliklere sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Lugtenberg ve ark. (1999); Kloepper ve ark., (1989), Costa ve ark.(2006), *Pseudomonas* cinsine ait türlerin bitkilerin kök bölgesinde (rizosfer) antagonistik etkilerini incelemişlerdir.

Chen ve ark. (2000), antagonist etkileşimlerde *Pseudomonas* cinsi bakterilerin üretilen kitinaz enziminin rolünü araştırmışlardır. İzolatlar tarafından üretilen kitinazın patojen fungal hücre duvarlarını parçalayarak, patojenlerin gelişimini önlediğini rapor etmişlerdir.

Whipps (2001), selülozdan sonra doğada en fazla bulunan bir polimer olan kitinin bitki patojen fungusların hücre duvarını oluşturan ana bileşen olduğunu bildirmiştir. Vivekananthan ve ark. (2004); Nagraj Kumar ve ark. (2004) ise, *Pseudomonas* izolatlarınca salgılanan kitinaz enziminin bitki patojenik fungusların hücre duvarını parçalayabildiği, bu enzimin *Pseudomonas*'ların biyokontrol etkinliğinde önemli rol oynadığını tespit etmişlerdir.

Pseudomonas cinsinin üyeleri 2 gruba ayrılmıştır (Holt ve ark., 1994). Birinci grup; bazı ortamlarda pigment üretenler, ikinci grup ise polibetahidroksibütirat asit depolayıp, pigment üretmeyenler olarak tanımlamışlardır (Holt ve ark., 1994).

Bu bakterilerin ürettikleri antiyobiyotik benzeri bakteriyosin ve fenozinin ile patojenik mikroorganizmaların gelişimlerini inhibe ettiklerini Vessey, (2003); Hariprasad ve Nijanjana, (2008); antiyobiyotik ve sideroforun, Hafeez ve ark., (2006) ve Whipps (2001); hidrojen siyanitin, Ahmad ve ark. (2008) bitki gelişimini teşvik ettiğini bildirilmişlerdir.

Hafeez ve ark. (2006); Elad ve Baker, (1985), *Pseudomonas* bakterilerinin piyoverdin ve pseudobaktin olarak adlandırılan renk maddesini ürettikleri, bu renk maddelerinin Fe^{+3} iyonuna bağlandığını ve demirin bakteri hücresi içinde bitkilerin alabileceği Fe^{+2} formuna dönüştürdüklerini saptamışlardır.

Egamberdieva ve ark. (2008), oksin, sitokin gibi bitki hormonlarının *Pseudomonas* bakterileri tarafından üretilerek bitki gelişimini teşvik ettiğini rapor etmişlerdir.

Ahmad ve ark. (2008), Fravel (1988) ve Andrade ve ark. (1994) tarafından *Pseudomonas* bakterilerinin hem topraktaki bitki patojenleriyle karbon kaynakları ve yer için rekabete girip hem de patojenlerin gelişimlerini inhibe ederek bitkilerin hastalanma oranlarını azalttıklarını yaptıkları çalışmalarında saptamışlardır.

2.1. *Pseudomonas* spp.

Pseudomonaceae familyası rRNA'nın 16S baz yapısı dikkate alınarak *Pseudomonas*, *Azomonas*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mezophilobacter*, *Rhizobacter* ve *Rugamonas* cinslerini içermektedir (Holt ve ark., 1994; Raaijmaker ve Weller, 2001).

Pseudomonas spp. topraklarda yaygın olarak bulunan gram negatif (-) ve aerobik bakterilerdir. *Pseudomonas* hücreleri polar kamçılara sahiptirler. Bazı türlerde subpolar kamçı da bulunmaktadır.

P. fluorescens, *P. chlororaphis* ve *P. putida* gibi bazı türlerinde pilus gözlenirken bazı türlerinde pilusa rastlanılmamıştır (Holt ve ark., 1994). *Pseudomonas*'lar genellikle 0.5-1.0 veya 1.5-5.0 µm çapında olup çeşitli karbon kaynaklarında ve düşük azot ortamında gelişebilmektedirler (Holt ve ark., 1994).

Pseudomonas bakterilerinin fosfor, demir ve azota olan istekleri farklılık göstermektedir. En iyi gelişme gösterdikleri sıcaklık 28 °C olarak belirlenmiştir. Oksidaz testlerinde değişik reaksiyon vermekle birlikte katalaz testleri pozitif olarak belirlenmiştir. Floresan *Pseudomonas*'lar piyoverdin pigmenti üretmeleriyle pigmentli yapıya sahip oldukları gibi floresan olmayan türlerde de pigmentsiz yapı gösterirler (Holt ve ark., 1994). *Pseudomonas* türlerinin çoğu glukoz, fruktoz, galaktoz ve L-arabinozu gelişimleri için kullanılmaktadırlar (Guo ve ark., 2007).

Pseudomonas bakterilerinin azotu indirgeyemedikleri, ancak bazı patojenik olmayan türlerinin nitratı oksijen yerine son elektron alıcısı gibi kullandıkları açıklanmıştır (Guo ve ark., 2005). *Pseudomonas* bakterileri poli-β-hidroksibütarat (PHB) granüllerine sahiptir. PHB granüllerini geliştikleri ortamlarda besin eksikliği olduğunda kullanarak, yaşamlarının devamlılığını sağladıkları saptanmıştır (Thomashow ve Weller, 1995). Çeşitli karbon kaynakları içeren azotun yetersiz olduğu ortamlarda endosellüler granüllerde biriken poli-β-hidroksibütarat granülleri *Pseudomonas* cinsine ait üyeleri birbirinden ayırt etmede kullanılmaktadır (Holt ve ark., 1994). *Pseudomonas*'ların floresan üyeleri glukonat, alkan, alkenler gibi karbon kaynaklarında geliştirildiklerinde C₆-C₁₂ zincir ortasındaki manomerlerden oluşan polihidroksialkanatları oluşturabilmektedir (Holt ve ark., 1994). Polihidroksialkanotların hidrolizinde *Pseudomonas* izolatlarının bazılarında lipaz aktivitesinin etkili olduğu rapor edilmiştir (Vivekananthan ve ark., 2004).

Pseudomonas bakterilerinin besin istekleri, serolojik analizler, plasmid profilleri, faj profilleri, protein profilleri, yağ asiti profilleri, nükleik asit problemleri, antibiyotiklere dirençlilikleri gibi testler tanımlamalarında kullanılmaktadır (Guo ve ark., 2007).

Pseudomonas bakterilerinin içerdikleri lipoprotein yapıları da tanımlanmalarında kullanılmıştır (Holt ve ark., 1994). Lipopolisakkaritin iç kısmında hidrokarbon zinciriyle akışkanlık veren özel bir lipid (LPS)'den oluşur. Lipopolisakkarit, hücreye spesifik bir antijenik kimlik kazandırır. Bakterilerin dış membran antibiyotikler gibi zararlı şeylere karşı bir bariyer özelliğine sahip olduğu açıklanmıştır (Holt ve ark., 1994; Thomashow ve ark., 1996).

Bitki gelişiminde etkili olan, biyokimyasal özelliklere sahip olup olmadıkları göz önünde bulundurularak patojenleri baskılamadaki rolleri incelenmiştir. *Pseudomonas* spp. ve floresan *Pseudomonas* izolatları toprak kökenli bitki patojenlerine karşı besin kaynakları için rekabet, antibiyotik (2-4-diasetilfloroglukinol-DAPG, fenozin-1-karboksilik asid-PCA-pirolnitritin) sentezleme ve patojen mikroorganizmaların hücre duvarını parçalayan enzim üretimi, (sellüloz, proteaz, glukanaz, kitinaz) gibi konukçu bitki patojenlerine karşı sistemik direnci uyaran (ISR) gibi çeşitli özelliklere sahip mekanizmalarıyla toprak kökenli bitki patojenlerini baskı altına almışlardır (Walsh ve ark., 2001, Homma ve ark., 1989, Klein Gunneiweck ve ark., 1998).

Biyokontrol etmeni olarak bitkileri büyümeye teşvik edici özelliğe sahiptirler. Bitkinin kök ve tohum yüzeyinden izole edilip *in vitro*'da hızlı gelişme yeteği gösterirler (Walsh ve ark., 2001; Dunne ve ark., 1996). Biyolojik mücadele, hastalıklara neden olan patojen mikroorganizmalara karşı canlı bir mikroorganizmanın kullanılması olarak tanımlanmıştır (Bora ve Özaktan, 1998; Glick ve ark., 1995).

Biyolojik mücadelede kullanılan organizmalar, zararlı mikroorganizmaları (patojenleri) antibiyotik salgılayarak, onlarla besin veya yer için rekabet ederek veya onlar üzerinde hiperparazit yaşayarak baskı altına alırlar (Cook ve Baker, 1983; Dowlin ve O'Gora, 1994). Biyokontrol çalışmalarında *Pseudomonas* sp. bakterileri yaygın olarak kullanılmaktadır (Egamberdieva ve ark., 2008; Ahmad ve ark., 2008; Jayaswal ve ark., 1993; Keel ve ark., 1992; Guo ve ark., 2005).

P. fluorescens ve *P. Putida*'nın bazı izolatlarının bitki gelişmesini teşvik ettirerek, ürünlerde verimliliği arttırdığı yapılan çalışmalarda incelenmiştir (Picard ve ark., 2000; Thomashow, 1996). Kloepper ve ark. (1980), *Pseudomonas* spp. tarafından bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) olarak adlandırılmıştır. Yararlı etkileriyle bilinen bu toprak bakterileri fitopatogenik funguslara karşı antagonist olarak birçok çalışmada da kullanılmıştır (Kloepper ve ark., 1989; Weller, 1988).

Toprak kökenli bitki patojenlerine karşı biyolojik etmen olarak kabul edilip bitki sağlığı açısından önemli role sahiptirler. Toprak verimliliğini de arttırmalarından dolayı kök yüzeyinde etkili bir etmen olarak kullanılmaktadırlar (Weller, 1988; Raaijmakers ve ark., 1997; Picard ve ark., 2000; Begsma-Vlami ve ark., 2005).

Pseudomonas spp.'lerin kökte hızlı bir şekilde kolonize olanlarının biyolojik kontrolde başarılı olduğu rapor edilmiştir (Keel ve ark., 1992; Lugtenberg ve ark., 2001, Raaijmaker ve Weller, 2001).

Tarımsal kimyasalların yerine alternatif olarak kullanılan *Pseudomonas* bakterileri kök bölgesinde kolonize olarak kök yüzeyinde siderofor ya da antibiyotik üretme özellikleriyle biyokontrol etki göstermişleridir (Leong, 1986, Tomashow ve ark., 1990; Sneh, 1984)).

Pseudomonas spp. bakterilerinin fungal patojenlerin bulunduğu bölgede hidrojen siyanid üretilmeleriyle bitki patojenlerinin gelişimini bastırarak, hastalıkları kontrol altına aldıklarını belirtmişlerdir (Voisard ve ark., 1989; Muleta, 2007).

2.2. *Pseudomonas* spp. Mikroorganizmalarının Etki Mekanizmaları

Biyokontrolde kullanılan mikroorganizmaların etki mekanizmaları; patojen mikroorganizmaları antibiyotik salgılayarak, onlarla besin veya yer rekabeti ederek veya onlar üzerinde hiperparazit yaşayarak baskı altına almasıdır (Whipps, 2001).

2.2.1. Antibiosis

Biyokontrol etmenler, salgıladıkları antibiyotiklerle, fungal ve bakteriyel patojenlerin gelişimini engellemektedir. Toprakta yaygın olarak bulunan; *Pseudomonas* bakterilerinin fenazin, floroglusinol, poluterin, pironitrin gibi antibiyotikleri salgılayarak bitki patojeni mikroorganizmalara karşı etkili olduğu bulunmuştur (Raaijmakers ve ark., 2001).

Biyolojik kontrolde tanımlanan ilk antibiyotik buğdayda karapasın kontrolünde kullanılan, *P. fluorescens* 2-79 izolatu ve *P. aureofaciens* 30-84'den elde edilen fenezin olmuştur (Weller ve Cook, 1983).

Biyokontrol mikroorganizmalarının birden fazla antibiyotik üretmeleri sebebiyle antibiyotiklere karşı oluşacak dirençliliklerinin düşük olacağı düşünülmektedir. Böylece kimyasal ilaçlara karşı oluşan dirençliğe göre biyokontrol mikroorganizmalarca üretilen antimikrobiyal bileşiklere karşı dayanıklılık daha yavaş olacaktır (Nikaido, 1994; Öztürk ve ark., 2003; Weller, 1990).

Tarla koşullarında buğdaylarda kök çürüklüğü hastalığına neden olan *Gaeumannomyces graminis*'e karşı *Pseudomonas fluorescens*'in 2,4-diasetilfloroglukinol (Phl) antibiyotiği salgılayarak hastalığı azalttığı tespit edilmiştir (Thomashow ve Weller, 1988).

P. fluorescens'in *Pyhium ultimum*'un neden olduğu çökerten hastalığını da piyoluterin (Plt) ve 2,4- diasetilfloroglukinol (Phl) gibi antibiyotik metabolitle engellediği saptanmıştır (De Souza ve ark., 2003; Williams ve Vickers, 1986).

2.2.2. Mikoparazitizm

Antagonist mikroorganizmalar; selüloz, proteaz, β -1,3-glukanaz, kitinaz gibi ekstraselüler enzimleri salgılayarak patojen fungusların hücre duvarının parçalanmasına neden olmaktadır. Bu enzimleri üreten mikroorganizmalarının tarımsal savaşta kullanılarak, fungal patojenlere karşı hiperparazit olarak biyokontrol etmeni oldukları belirtilmektedir (Whipps, 2001).

Pseudomonas sp.'nin turpta görülen *Fusarium oxysporum*'a karşı ürettiği kitinaz aktivitesinden yararlanılarak biyolojik mücadele de kullanılmıştır (Nielsen ve Sorensen, 1997). Ayrıca kitinaz, β -1,3-glukanaz ve proteaz üreten *Pseudomonas* izolalarının *Chaetomium globosum*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *Indriella holleyi*, *Mucor hiemalis*, *Phoma exiquma*, *Ulocladium* spp.'nin gelişimini önlediğini bildirmişlerdir (De Boer ve ark., 1998).

Fluoresan *Pseudomonas*'ların *Colletotrichum falcatum*'a karşı etkili olmasında izolatlarca üretilen kitinaz aktivitesinin etkili olduğu ve patojen fungusun gelişiminin engellendiği görülmüştür (Viswanathan ve Samiyappan, 2001).

Pseudomonas corrugata ve *Pseudomonas cepacia*'nın şeftali ve nektarinde kara leke mantar hastalıklarına karşı etkili oldukları patojenin gelişimini önlediği görülmüştür (Smilanick ve ark., 1993).

Egamberdieva (2005) ise *Aspergillus insultus*, *Penicillium purpurogenum*'a antagonist aktivite gösteren *Pseudomonas denitrificans* PsD6'nın hidrolitik enzimlerden amilaz ve lipaz ürettiğini belirlemiştir. *P. raphonis* PsR47'nin üreaz, sellüloz ve arjinin dehidrolaz aktivitelerini ise pozitif olarak kaydetmiştir.

2.2.3. *Pseudomonas* spp.'nin yer ve besinler için rekabeti

Biyokontrolde iki besin elementi olarak karbon (C) ve demir (Fe) büyük önem taşımaktadır. Sellüloz, hemisellüloz ve pektin gibi kompleks karbohidratları içeren kök musilajları sadece belli mikroorganizmalar tarafından parçalanabilmektedir. Besin elementleri yönünden rekabete dayalı biyokontrol organizmaların da daha çok tohumla taşınan ve toprak orijinli hastalıklara karşı başarıyla kullanıldığı görülmüştür (Egamberdieva ve ark., 2008; Kloepper ve ark., 1999).

Bitkilerin kök bölgesi veya tohumlarından salgılanan bileşiklerin, bu bölgede kolonize olan biyokontrol mikroorganizmalarının gelişimini olumlu yönde etkiledikleri rapor edilmiştir (Kloepper ve ark., 1980). Patojen ve antagonist mikroorganizmalar arasındaki ilişkide önem sağlayan bir diğer besin elementi de demirdir. Demir elementinin düşük çözünür özelliği nedeniyle anaerobik koşullar altında bitkiler tarafından sınırlı kullanılmaktadır.

Fluoresan Pseudomonadlar, birbirlerine kovalent olarak peptid bağlarıyla bağlanmış *quinoline* gruplarından oluşan, *piyoverdin* veya *pseudobaktin* olarak isimlendirilen ve renk maddesine sahip sideroforlar üretmektedirler. Bu renk maddelerinin, suda çözünür, besi ortamına yeşilimsi sarı renkli görünümde yayılabilen ve ultraviyole ışık altında floresan parlama özelliğinde olan maddeler olduğu bildirilmiştir (Kloepper ve ark., 1999). Floresan *Pseudomonas*'larca üretilen piyoverdinin, Fe^{+3} iyonuna sıkı şekilde bağlanma eğiliminde olduğu saptanmıştır (Podile ve Kishore, 2006). Bu bağlanma, bakteri hücresinin dış membranındaki spesifik reseptörler tarafından gerçekleştirilmektedir. Piyoverdinlerin etkisiyle demir elementi bitki tarafından kullanılabilir Fe^{+2} formuna dönüşmektedir (Elad and Baker, 1985).

Çalışmamızda, Şanlıurfa ve çevresinde yaygın tarımı yapılan biber, dere otu, mısır, nohut ‘un kök bölgelerinden *Pseudomonas* spp. izolasyonu yapıp, tanımlamak ve birçok tarımsal üründe büyük kayıplara yol açan toprak kökenli fungal bitki patojenlerinden *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium accuminatum*, *F. chlamydosporum*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternata*, *Drechslera sorokiniana*, *Ascochyta rabiei*’ye karşı laboratuvar (*in vitro*) koşullarında antagonistik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan mikroorganizmalar ve toprak örnekleri

Çalışmada Akçakale/Koruklu ve Ziraat Fakültesi'nde biber, nohut dere otu, mısır bitkilerinin rizosfer bölgelerinden ve boş arazi alanlarından alınan toprak örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. *Pseudomonas* sp. 'nin izole edildiği ve örneklerin alındığı yerler

İzolatlar	Bitki	Alındığı Yer	Toprak pH
B1	Biber	Akçakale/Koruklu	8.56
B2	Biber	Siverek	7.80
B3	Biber	Halfeti	7.47
B4	Biber	Bozova	8.40
B5	Biber	Akçakale	7.85
B7	Biber	Ceylanpınar	7.70
B8	Biber	Akçakale/Koruklu	8.54
B9	Biber	Suruç	7.50
B10	Biber	Akçakale	7.40
B11	Biber	Akçakale	7.16
B14	Biber	Akçakale/Koruklu	8.55
B15	Biber	Bozova	7.71
B16	Biber	Hilvan	7.10
B17	Biber	Bozova	7.72
B19	Biber	Akçakale/Koruklu	8.57
B20	Biber	Siverek	7.68
B21	Biber	Halfeti	7.70
B22	Biber	Bozova	7.90
B23	Biber	Hilvan	7.88
B24	Biber	Suruç	7.60
B25	Biber	Akçakale/Koruklu	8.50
B26	Biber	Akçakale/Koruklu	8.57
N11	Nohut	Ziraat Fakültesi	8.82

Çizelge 3.1. (Devamı)

İzolatlar	Bitki	Alındığı Yer	Toprak pH
N12	Nohut	Bozova	7.65
N13	Nohut	Ziraat fakültesi	8.21
N14	Nohut	Siverek	7.65
D1	Dere otu	Ziraat fakültesi	8.00
D2	Dere otu	Ziraat Fakültesi	8.51
D3	Dere otu	Bozova	7.62
D4	Dere otu	Ziraat Fakültesi	8.52
D5	Dere otu	Ziraat Fakültesi	8.56
D6	Dere otu	Siverek	7.74
D8	Dere otu	Suruç	7.89
D9	Dere otu	Ziraat Fakültesi	8.50
D10	Dere otu	Ziraat Fakültesi	8.43
D11	Dere otu	Bozova	7.79
M2	Mısır	Akçakale	8.00
M4	Mısır	Ceylanpınar	7.81
BA2	Boş arazi	Siverek	7.67
BA13	Boş arazi	Ziraat Fakültesi	8.2
BA15	Boş arazi	Bozova	7.89
BA17	Boş arazi	Birecik	7.75
BA18	Boş arazi	Ziraat Fakültesi	8.3
BA19	Boş arazi	Birecik	7.78
BA20	Boş arazi	Siverek	7.50
BA23	Boş arazi	Ziraat Fakültesi	8.3
BA24	Boş arazi	Osmanbey kampüsü	7.91

3.1.2. Kullanılan fungal patojenler

Bitki patojeni funguslardan *Fusarium culmorum* ve *Fusarium solani* izolatları Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden, *Ascochyta rabiei* (Pass) Labr., *Dreschlera sorokiniana*, *Fusarium moniliforme* Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden , *Alternaria alternata* Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Kültür koleksiyonundan, *Fusarium chlamyosporum*, *Fusarium accuminatum* Ankara Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü'nden sağlanmıştır. Mikroorganizma kültürleri kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.1.3. Kullanılan mikroorganizmaların gelişimi için besiyerleri

Araştırmada izolatların izolasyonunda kullanılan besiyerleri King's B Ortamı (KB), Pigment Üretim Ortamı, Gliserin Pepton Agar (GPA), *Pseudomonas* izolasyon agar (PIA), *Pseudomonas* agar (PA), Trypticase soy agar (TSA) kullanılmıştır (Ek 1).

Fungal patojenlerin gelişimleri için Patates dekstroza agar (PDA) besiyeri kullanılmıştır (Ek 1).

3.1.4. Kullanılan mikroorganizmaların gelişme ortamı

Araştırmada izolatların gelişimi için Nutrient broth ortamı kullanılmıştır (Ek 2).

3.1.5. Kullanılan çözeltiler

Çalışmada amilaz aktivitesini belirlemede iyot çözeltisi, gram boyamasında kristal viyole ve safranin çözeltisi, pH ölçümünde 1 M NaOH ve 1M HCl, katalaz testi için %3'lük H₂O₂, izolatları -80 °C'de saklamada kullanılan %30'luk gliserol ve toprak izolasyonu için peptonlu çözelti kullanılmıştır (Ek 3).

3.1.6. İzolatların fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

3.1.6.1. İzolatların farklı sıcaklık ve farklı tuz konsantrasyonlarında kullanılan ortam

Araştırmada izolatların farklı sıcaklık ve farklı tuz konsantrasyonlarında King's B broth ortamı kullanılmıştır (Ek 4).

3.1.6.2. Kullanılan levan üretim ortamı

Araştırmada, levan üretimi için et ekstraktı ve sukroz içeren Nutrient agar ortamı kullanılmıştır (Ek 5).

3.1.6.3. Karbonhidrat testi için kullanılan ortam

Araştırmada, karbonhidrat testleri için mineral tuz ortamı kullanılmıştır (Ek 6).

3.1.6.4. Sitrat testi için kullanılan ortam

Çalışmada, sitrat analizi için simmans agar kullanılmıştır (Ek 7).

3.1.6.5. Enzimatik aktivite için kullanılan besiyerleri

Amilaz aktivitesinde nişasta agar, jelatin hidrolizinde jelatin agar, fosfataz aktivitesinde pikovskaya ortamı, üreaz aktivitesinde Dye's ortamı, Tween 80 hidrolinde Sierra's ortamı, kitinaz aktivitesinde kitin agar, arjinin dehidrolaz aktivitesinde Thornley ortamı, proteaz aktivitesinde TSA ve skim milk ortamı, ve sellüloz aktivite için ise hazırlanmış ayrı ayrı solusyonlar kullanılmıştır (EK 8).

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Toprak örneklerinden *Pseudomonas* sp. izolasyonu:

Alınan toprak örneklerinden 10 gr tartılarak, içerisinde 20 ml'lik peptonlu çözelti bulunan ortama konularak, 15-20 dk çalkalanmış 10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar dilüsyonları yapılmıştır.

Hazırlanan dilüsyonlardan King's B Agar, PPM, PIA, GPA ve Tryptic Soy Agar (TSA) içeren steril petri kutularına inokule edilmiştir. Petri kutuları 28 °C'de 24-48 saat inkübe edilerek, bakteri sayımları yapılmıştır. Buradaki tipik kolonilerden seçilerek King's B agarda saflaştırılmıştır (Costa ve ark., 2006). Gelişen koloniler King's B agar içeren eğik besiyerine alınarak +4 °C'de saklanmış, kültürler %30'luk gliserol içeren ependorf tüplerine steril kürdanla eklenmiş ve -80 °C'de stoklanmıştır.

3.2.2. Toprak pH'nın ölçümü

Toprak pH'nın ölçümü, toprak: su oranı 1:2,5 olarak ayarlanan toprak çözeltisinde pH metre kullanılarak yapılmıştır (Kacar, 2009).

3.2.3. Mac Farland metodu

A= % 1.175 BaCl₂. 2H₂O olacak şekilde A çözeltisi hazırlanmıştır.

B= 0.36 N %1 (v/v) H₂SO₄ olacak şekilde B çözeltisi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. Mac Farland metodu

NO	1	2	3	4	5	6
A	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
B	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4

1'den 6'ya kadar numaralandırılmış tüpler hazırlanmış ve 1 nolu tüpe A çözeltisinden 0,1 ml koyup üzerine B çözeltisinden 9,9 ml ilave edilmiştir. Daha sonra 2 nolu tüpe 0.2 ml A çözeltisinden ve 9.8 ml B çözeltisinden olacak şekilde ilave edilmiştir. Bu şekilde 6 nolu tüpe kadar işlem devam edilmiştir (Gürgün ve Halkman, 1990).

3.3. Bakterilerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

3.3.1. Gram boyama

İzole edilen izolatlar King's B besiyerinde 24 saat geliştirilmiştir. Kültürden bir öze dolusu alınan örnek lam üzerine yayılmış, kurutulduktan sonra fiksasyon yapılmıştır. Preparat üzerine kristal viyole damlatılarak ve 1 dk bekletilmiştir. 1 dk sonra su ile yıkanmıştır. Kuruması beklenmeden gram iyodu örneği kaplayacak şekilde damlatılıp 60 sn bekletilmiştir. Preparat, suyla yıkanmıştır. Örneğe alkol damlatılarak 20 saniye bekletilmiş, mor renk gidinceye kadar yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnek safranin ile 20 sn bekletilmiş, saf suyla yıkanıp kurutulmuştur. İmmersiyon yağı damlatılarak x100'lük objektifte incelenmiştir (Demirbağ ve Demir, 2005).

3.3.2. Hareketlilik

Temiz bir lam üzerine bir damla sedir yağı damlatarak lamel büyüklüğünde yayılması sağlanmıştır. Temiz bir lamelin ortasına bir damla 24 saatlik taze kültür eklenmiştir. Lameli kültür altta kalacak şekilde çevirerek lam üzerine yayılmış olan sedir yağı üzerine oturtulmuştur. İmmersiyon objektifi ile en az ışıklandırma ile bakteri hareketi gözlemlenmiştir (Holt ve ark., 1994).

3.3.3. Floresan özellik

Toprakta izole edilen *Pseudomonas* izolatları King's B ortamında çizgi ekim şeklinde ekilerek 24 saat 28 °C'de inkübe edilmiştir. Gelişme gösteren izolatların floresan özellikleri 254 dalga boylu UV ışığı altında incelenmiştir (Holt ve ark., 1994).

3.3.4. Katalaz

İzolatlar, King's B broth ortamında 28 °C'de 2 gün geliştirilmiştir. İzolatların üzerine %3'lük H₂O₂ eklenip köpürme durumuna göre değerlendirme yapılmıştır. Köpürme varsa pozitif (+), yoksa negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Holt ve ark., 1994).

3.3.5. Oksidaz

Kurutma kağıdı üzerine bakteri izolatlarından bir öze dolusu örnek alınıp sürülmüştür. Daha sonra oksidaz (Fluka, N,N-dimethyl-p-phnylenediamine oxalate, α -naphthol) dökülüp renk değişimi gözlemlenmiştir. Mavi renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Holt ve ark., 1994).

3.4. İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

3.4.1. İzolatların farklı sıcaklık derecelerine toleranslılıkları

King's B brohta 24 saat geliştirilen izolatların, konsantrasyonu 5 nolu Mac Farlanda (Çizelge 3.2) göre ayarlanmıştır. Buradan 10 μ l alınıp, 5 ml King's B broth içeren steril tüplere inokule edilmiştir. Kültürlerin 4, 15, 27, 37 ve 41°C'de gelişimleri 7 gün boyunca incelenmiştir (Gardner ve ark., 1984). Deneyler 3 paralelli olarak yapılmıştır.

3.4.2. İzolatların farklı konsantrasyonlardaki tuza toleranslılıkları

King's B brothta ayrı ayrı % 0, 1, 2, 3, 4'lük konsantrasyonlarda NaCl eklenmiştir. Ortamlar 3'er ml olacak şekilde tüplere eklenip steril edilmiştir. Steril ortamlara 10 µl 5 nolu Mac Farlanda (Çizelge 3.2) göre ayarlanmış izolatlar inokule edilmiştir. 28 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir (Cappucino ve Sherman, 1992). Deneyle 3 paralelli olarak yapılmıştır.

3.4.3. Nitrat redüksiyonu

Hazırlanan steril tüplere beşer ml olacak şekilde hazırlanan besiyeri dökülüp yatık agar olacak şekilde soğumaya bırakılmıştır. Soğuduktan sonra bakterinin çizgi ekimi yapıp 3, 4 ve 7 gün boyunca bakteri gelişimi gözlenip petrielerde bakteri gelişimi olmuyosa pozitif, olmuyorsa negatif olarak incelenmiştir (Saygılı ve ark., 2006).

3.4.4. Levan üretimi

Et ekstraktı ve sukroz içeren Nutrient agara izolatların çizgi ekimleri yapıp, 28 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Mukoid özellikte koloni oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Cappuccino ve Sherman, 1992).

3.4.5. Karbonhidrat testleri

Steril edilen mineral tuz ortamına ayrı ayrı maltoz, mannitol, triptofan, fruktoz, ksiloz, m-inositol ve glukoz % 0.1(w/v) oranında 0.45 µm'lik filtreden geçirilip eklenmiştir. Farklı karbon kaynağı içeren ortamlara çizgi ekim yapılan izolatların gelişimleri 28 °C'de 3, 7 ve 14 gün boyunca incelenmiştir. Deneyle 3 paralelli olarak yapılmıştır (Ji ve Wilson, 2002).

3.4.6. Sitrat analizi

10 ml Simmans agar içeren steril tüplere öze ile izolatlar inokule edilip 28 °C'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu yeşilden maviye renk dönüşümü varsa pozitif, yoksa negatif olarak değerlendirilmiştir. Maviye dönüşümü sitratın enerji ve karbon kaynağı olarak kullanıldığını göstermiştir (Demirbağ ve Demir, 2005).

3.4.7. Antibiyotik dirençlilik testi

Ampisilin, streptomisin, penisilin, kloromfenikol ve sikloheksimid 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 ve 2000 µg/ml olacak şekilde steril edilmiş King's B agara ayrı ayrı 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek eklenmiştir. İyiye karıştırılıp steril petri kutularına dökülmüştür. 5 nolu Mac Farland'a göre ayarlanmış kültürlerden bir öze dolusu alınıp çizgi ekimleri yapılarak 28 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Gelişme gösteren izolatlar test edilen antibiyotiklere karşı dirençli olarak kaydedilmiştir (Pandey ve ark., 2001). Deneyler 3 paralelli olarak yürütülmüştür.

3.5. Antogonistik Aktivite

Pseudomonas spp.'nin 47 (B1, B2, B3, B4, B5, B7, B8, B9, B10, B11, B14, B15, B16, B17, B19, B20, B21, B22, B23, B24, B25, B26, N11, N12, N13, N14, M2, M4, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D8, D9, D10, D11, BA2, BA13, BA15, BA17, BA18, BA19, BA20, BA23, BA24) izolatları King's B brothta 28 °C'de 2 gün geliştirilmiştir. Kullanılan toprak kökenli bitki patojenlerinden *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium accuminatum*, *Fusarium moniliforme*, *F. chlamyosporum*, *Dreschlera sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *Ascochyta rabiei* 5 gün boyunca, ayrı ayrı Patates Dekstroz Agar (PDA) içeren besi ortamında geliştirilmiştir. Daha sonra her bir bakteri kültürünün yoğunlukları 5 nolu Mac Farland'a göre ayarlanmıştır. Sıvı örneklerden bir öze dolusu alınarak, PDA içeren petri kutularında çizgi şeklinde ekilip 28 °C'de 2 gün inkübe edilmiştir.

Fungal patojenlerin bulunduğu petri kutularından alınan 7 mm çapındaki fungal disk, farklı *Pseudomonas* izolatlarını içeren petri kutularına her iki mikroorganizma arasında 5 cm boşluk olacak şekilde ekilmiştir. 25 °C'de 7 gün inkübasyon süresince patojenin ve antagonistin büyüme miktarının zon çapları ölçülmüştür. Patojen fungusun büyümesinin, antagonist tarafından engellenmesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Ahmad ve ark., 2008). Deneyle 3 paralelli olarak yapılmıştır.

$$\% RI = R-r / R * 100$$

R: Patojen fungusun bakterisiz taraftaki gelişimi

r: Patojen fungusun bakteriye doğru olan gelişimi

%RI: İnhibisyon oranı

3.6. Enzimatik Aktivite

Tüm enzim deneylerinde izolatların 5 nolu Mc Farland'a göre hazırlanmış kültürleri kullanıldı. Enzim deneylerinin tümü 3 paralelli olarak yapılmıştır.

3.6.1. Amilaz aktivite (Nişastanın hidrolizi)

Pseudomonas izolatları, nişasta agar içeren petri kutularına çizgi ekimleri yapıp, 48 saat 28°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, nişasta agar üzerinde oluşan kolonilerin üzerlerine lugol solusyonu damlatılmıştır. Parlak renk oluşumu nişastanın hidrolizini, mavi-siyah renk ise hidroliz oluşmadığını göstermiştir (Egamberdieva ve ark., 2008).

3.6.2. Jelatin hidrolizi

Jelatin agar içeren steril test tüplerine 24 saatlik taze kültürlerden inokule edilerek, ekimleri yapıp 28 °C'de 7-14 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda ekim yapılan izolatların sıvılaşması izolatların jelatini hidrolize ettiklerini göstermiştir (Egamberdieva ve ark., 2008).

3.6.3. Fosfataz aktivitesi

Hazırlanan Pikovskaya besiyeri otoklavda steril edildikten sonra petrilere dökülmüştür. Soğuyan petrilere 5 nolu Mac Farlanda göre ayarlanmış kültürlerden 10 µl alınıp damla şeklinde ekimleri yapılmıştır. 28 °C’de 24 ve 96 saatlik gelişme sonunda koloni etrafındaki açık zon oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Kim ve ark., 1998). Kontrol olarak $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ eklenmeyen ortamlarda izolatlar geliştirilmiştir.

3.6.4. Üreaz aktivite

Hazırlanmış Dye’s ortamı steril tüplere 5 ml eklenip izolatların ekimi yapılmıştır. 28 °C’de 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu tüplerdeki renk değişimleri incelenmiştir. Pembe-kırmızı renk verenler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Egamberdieva ve ark., 2005). Kontrol olarak üre içermeyen Dye’s ortamında izolatlar geliştirilmiştir.

3.6.5. Tween 80 hidrolizi (Lipaz aktivite)

Steril petri kutularına Sierra’s besiyeri dökülmüştür. İzolatların damla ekimleri yapıp, 7 gün boyunca 28 °C’de inkübe edilmiştir. Zon oluşumu pozitif, zon oluşumunun görülmemesi ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Egamberdieva ve ark., 2005).

3.6.6. Kitinaz aktivite

Steril edilen kitin agar ortamı, steril petrilere dökülüp izolatların çizgi ekimleri yapıldı ve 28 °C’de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu gelişen kolonilerin etrafındaki zon oluşumlarına bakılmıştır

. Koloni etrafında açık zon oluşumu kitinaz aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Chernin ve ark., 1995; De Boer ve ark., 1998).

3.6.7. Arjinin dehidrolaz

Steril edilmiş 5'er ml Thornley ortamı bulunan tüplere 5 nolu Mac Farlanda (Çizelge 4.2) göre ayarlanmış kültürlerden 10 µl inokule edilmiştir. 28 °C'de 3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda renk oluşumlarına bakılmıştır. Kırmızı renk verenler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Holt ve ark., 1994).

3.6.8. Proteaz aktivite

Steril edilen 50 ml 1/5 TSA ve %4 agar içeren ortama 50 ml skim milk eklenip, steril petri kutularına dökülmüştür. Petri kutularına 5 nolu Mac Farlanda (Çizelge 4.2) göre ayarlanmış kültürlerin öze ile çizgi ekimleri yapılmış ve 5 gün 24 °C'de inkübe edilmiştir. Koloni etrafındaki açık renkli zonlar proteaz aktivite pozitif olarak incelenmiştir (Costa ve ark., 2006).

3.6.9. Sellülaz aktivite

Steril edilen B ve D solüsyonlarından 1 ml alınıp, steril edilmiş A+C solüsyonuna eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri steril petri kutularına dökülmüştür. Donan besiyerine izolatların çizgi ekimleri yapılmıştır. Petri kutuları 28 °C'de 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, koloni üzerine % 0.1'lik Kongo red solüsyonu damlatılmış ve 15- 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra petri kutuları 1 N NaCl çözelti ile yıkanmıştır. Koloni etrafında belirlenen açık zon sellülaz aktivitenin göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Egamberdieva ve ark., 2005).

3.6.10. İstatistik analiz

Antagonistik aktivite sonucu elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS paket programına göre yapılmıştır. İzolatlar arasındaki farklılık ise Duncan testine göre belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.

4.1. Rizosfer toprak örneklerinden *Pseudomonas* spp.'nin izolasyonu

Bu çalışmada, Şanlıurfa ve çevresinde yaygın olarak tarımı yapılan nohut bitkilerin kök bölgelerinden N11, N12, N13, N14; mısır bitkilerin kök bölgelerinden M2, M4; biber rizosfer bölgesinden B1, B2, B3, B4, B5, B7, B8, B9, B10, B11, B14, B15, B16, B17, B19, B20, B21, B22, B23, B24, B25, B26; dere otu rizosfer bölgelerinden D1, D2, D3, D4, D5, D6, D8, D9, D10, D11 ve boş arazi rizosfer bölgelerinden BA2, BA13, BA15, BA17, BA18, BA19, BA29, BA23, BA24 olacak şekilde toplam *Pseudomonas* spp.'e ait 47 izolat izole edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Farklı toprak örneklerinden izole edilen, farklı besiyerlerinden gelişme gösteren *Pseudomonas* spp. izolatları

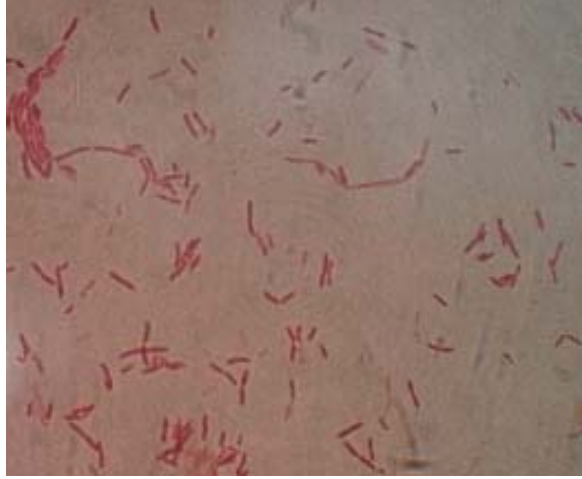
Bitki	Besiyeri ortamı	İzolat no
Nohut	PİA	N11,N12,N13,N14
Mısır	PA, PİA	M2, M4
Biber	PA, PİA, KB	B1, B2, B3, B4, B5, B7, B8, B9, B10, B11, B14, B15, B16, B17, B19, B20, B21, B22, B23, B24, B25, B26
Dere otu	PA, GPA, KB	D1, D2, D3, D4, D5, D6, D8, D9, D10, D11
Boş Arazi	GPA, PİA, KB	BA2, BA13, BA15, BA17, BA18, BA19, BA29, BA23, BA24

Çizelge 4.1.'den de görüleceği farklı toprak örneklerinden en fazla biber rizosfer bölgesinden *Pseudomonas* spp. izolatı izole edilmiştir.

4.2. *Pseudomonas* spp. 'nin Bazı Morfolojik özellikleri

4.2.1. Gram reaksiyonlar

Seçici besiyerinde geliştirilen izolatların tümü gram (-), çubuk şekilli olarak saptanmıştır (Çizelge 4.2). *Pseudomonas* B15 nolu izolatın mikroskopik görünümü Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Pseudomonas* B15 izolatının mikroskop altında görünümü

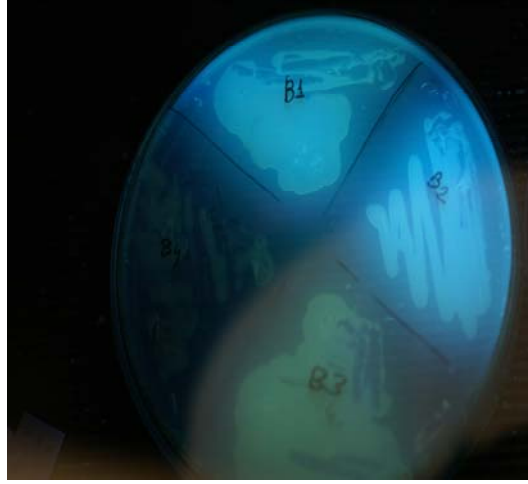
Pseudomonas spp. izolatlarının gram negatif, çubuk şekilli olduğu Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'de de açıklanmıştır (Holt ve ark., 1994). King's B ortamında geliştirilen N14 izolatı Şekil 4.2.'de verilmiştir.



4.2. *Pseudomonas* N14 izolatının petri kutusunda görünümü

4.2.2. Floresan özellik

İzolatlardan 19 tanesi (B1, B2, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B13, B14, B15 B21, B25, B26, D1, D2, D3, D4 ve BA2) mavi renkli floresan; izolatlardan 7'si (B3, B5, B12, B20, B22, B23 ve B24) sarı-yeşil floresan özellik gösterdikleri; izolatlardan 21 tanesinin ise (B4, B16, B17, B19, N11, N12, N13, N14, M2, M4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, BA13, BA15, BA16, BA17, BA18, BA19, BA19, BA20, BA23 ve BA24) pigmentsiz oldukları incelenmiştir (Çizelge 4.2). *Pseudomonas* B1, B2, B3 ve B4 izolatının UV altındaki görünüşleri Şekil 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4.3. *Pseudomonas* sp. B1, B2, B3, B4 'ün 254 nm' de görünümü; B1 ve B2 mavi, B3 sarı yeşil, B4 renksiz

Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi izolatlardan B1 ve B2'nin UV ışığı altında mavi renkli, B3 izolatının sarı-yeşil ve B4'ün ise renksiz koloni oluşturduğu belirlenmiştir.

Çalışmada izolatların %55'i floresan özellik göstermişlerdir. %40'ı mavi, %15'i sarı yeşil rengi oluşturmuştur. Floresan özellik gösteren *Pseudomonas* bakterilerinin gelişme gösterdikleri besiyeri rengini sarı yeşilimse renge dönüştürdükleri bildirilmiştir (Bangera ve Thomashow, 1996).

Yapılan bir araştırmada, *Pseudomonas* bakterilerinden fluoresan özelliğe sahip olanların 6 farklı pigment ürettikleri gözlemlenmiştir. Dördünün fenazin grubuna ait olduğu (piyosiyenin, piyorubin, klororafin, oksifenazin) diğerlerinin de *Pseudomonas* mavi pigment ve piyoverdin olduğu bildirilmiştir. Fluoresan *Pseudomonas*'ların sarı-yeşil pigment ürettikleri belirlenmiştir (Thomashow, 1990).

Pseudomonas bakterilerinin bazısının ise fluoresan özelliğe sahip olmadıkları ve *P. stutzeri* üzerinde yapılan çalışmada, hücrelerde sitokrom c'nin yüksek oranda bulunmasıyla pigmentsiz kolonilerin koyu kahve rengine sahip oldukları belirlenmiştir (Lim ve ark., 1991).

4.2.3. Hareketlilik

İzole edilen bakterilerin tümünün hareketli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2).

4.2.4. Levan analizi

Araştırmacılar, *Pseudomonas* bakterilerinin levan üretimlerini ortamda mukoid koloni oluşturmalarına göre değerlendirmişlerdir (Holt ve ark., 1994; Siddiqui ve ark., 2008). Çalışmamızda kullandığımız *Pseudomonas* spp. izolatlarından 44'ünde (B1, B2, B3, B4, B5, B7, B8, B9, B10, B11, B14, B15, B16, B19, B20, B21, B22, B23, B24, B25, B26, N12, N14, M4, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D8, D9, D10, D11, BA2, BA23 ayrıca M2, BA13, BA15, BA17, BA18, BA19, BA20, BA24) mukoid koloni ürettikleri için levan pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2).

Siddiqui ve ark. (2008) fluoresan *Pseudomonas* izolatlarının levan üretimini değerlendirmişler ve 3 izolatın levan pozitif, diğer 5 izolatın levan üretmediğini tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.2. İzolatların morfolojik özellikleri

İZOLATLAR	MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ							
	Gram reaksiyon	Floresan özellik	Hareketlilik	Levan	Sitrat	Nitrat redüksiyonu	Oksidaz	Katalaz
B1	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
B2	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
B3	Gr (-)	+ (YS)	+	+	+	+	+	+
B4	Gr (-)	-	+	+	+	+	+	+
B5	Gr (-)	+ (YS)	+	+	+	+	+	+
B6	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
B7	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
B8	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
B9	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
B10	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
B11	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
B14	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
B15	Gr (-)	+ (M)	+	+	-	+	+	+
B16	Gr (-)	-	+	+	-	+	-	+
B17	Gr (-)	-	+	-	-	+	+	+
B19	Gr (-)	-	+	+	-	+	+	+
B20	Gr (-)	+ (YS)	+	+	+	+	+	+
B21	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
B22	Gr (-)	+ (YS)	+	+	+	+	+	+
B23	Gr (-)	+ (YS)	+	+	+	+	+	+
B24	Gr (-)	+ (YS)	+	+	+	+	+	+
B25	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
B26	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	-	+
N11	Gr (-)	-	+	-	-	+	+	+
N12	Gr (-)	-	+	+	-	+	-	+
N13	Gr (-)	-	+	-	-	+	+	+
N14	Gr (-)	-	+	+	+	+	-	+
M2	Gr (-)	-	+	+ (Z)	-	+	+	+
M4	Gr (-)	-	+	+	-	+	+	+
D1	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
D2	Gr (-)	+ (M)	+	+	-	+	+	+
D3	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
D4	Gr (-)	+ (M)	+	+	+	+	+	+
D5	Gr (-)	-	+	+	-	+	+	+
D6	Gr (-)	-	+	+	-	+	+	+
D8	Gr (-)	-	+	+	-	+	+	+
D9	Gr (-)	-	+	+	-	+	+	+
D10	Gr (-)	-	+	+	-	+	+	+
D11	Gr (-)	-	+	+	-	+	+	+
BA2	Gr (-)	+ (M)	+	+	-	+	-	+

Çizelge 4.2. (Devam)

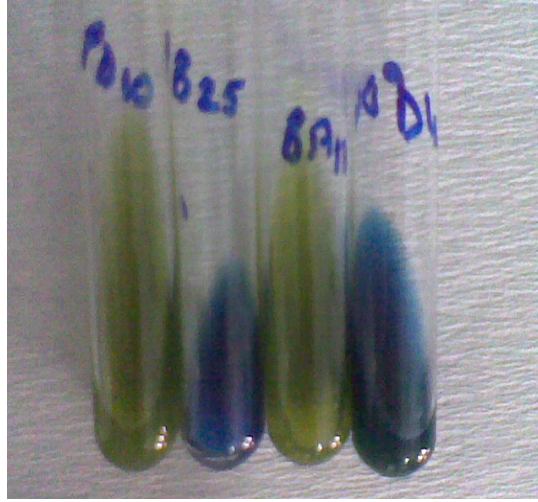
İZOLATLAR	MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ							
	Gram reaksiyon	Fluoresan özellik	Hareketlilik	Levan	Sitrat	Nitrat redüksiyonu	Oksidaz	Katalaz
BA13	Gr (-)	-	+	+ (Z)	-	+	+	+
BA15	Gr (-)	-	+	+ (Z)	-	+	+	+
BA16	Gr (-)	-	+	+	-	+	+	+
BA17	Gr (-)	-	+	+ (Z)	-	+	+ (Z)	+
BA18	Gr (-)	-	+	+ (Z)	-	+	+	+
BA19	Gr (-)	-	+	+ (Z)	-	+	-	+
BA20	Gr (-)	-	+	+ (Z)	-	+	+	+
BA23	Gr (-)	-	+	+	-	+	-	+
BA24	Gr (-)	-	+	+ (Z)	-	+	+	+

Zayıf (Z), negatif (-), pozitif (+), gram negatif Gr (-), Mavi (M), Sarı-Yeşil (YS)

4.2.5. Sitrat analizi

Bazı organizmalar ortamda fermente edebilecekleri glikoz gibi karbonhidratlar olmadığında, enerji elde etmek için karbon kaynağı olarak sitratı kullanabilmektedirler. Mikroorganizmaların sitratı kullanıp kullanmadıklarını ise sitrat kullanım testleri ile belirlenmektedir (Holt ve ark., 1994).

İzolatlarımızdan B15, B16, B17, B19, N11, N12, N13, M2, M4, D2, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, BA2, BA13, BA15, BA17, BA18, BA19, BA20, BA24 sitrat negatif olup diğer izolatlar pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.4. *Pseudomonas* D10, B25, BA13, D4 izolatlarının sitrat analiz sonucu; B25, D4 sitratı kullanabilen, D10 ve BA13 sitratı kullanamayan

Siddiqui ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, mercimek rizosferinden izole ettikleri sekiz floresan *Pseudomonas* izolatının sitrat kullanımları değerlendirilmiş, test edilen 8 izolatın sitratı kullandıkları incelenmiştir. Ahmad ve ark (2008); kök bölgesinden izole ettikleri bakterilerin sitrat testinde %100 pozitif sonuç verdiğini belirtmişlerdir.

Bakterilerin demir, alüminyum, çinko, kalsiyum, galyum gibi çeşitli metallere karşı dirençli oldukları tabiatta çok bulunan elementleri sitrat ile birlikte kompleks oluşturarak oksitleyebildiklerini bildirmişlerdir (Holt ve ark., 1994).

4.2.6. Nitrat redüksiyonu

Yapılan nitrat redüktaz testi sonucu tüm izolatlar pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.2). *Pseudomonas* spp. izolatları nitratı nitrite indirgenebildikleri, bu indirgenme, redüktaz enzimlerinin katalitik etkisiyle ve genellikle anaerobik koşullarda gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Ayrıca hücre içinde metabolize edilerek protein ve nükleik asit yapımında da kullanıldığını bildirmişlerdir (Öztürk ve ark., 2003).

4.2.7. Oksidaz testi

İzolatlardan B16, B26, N12, N14, BA2 ve BA19 dışındaki tüm izolatlar oksidazı pozitif olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

4.2.8. Katalaz testi

İzolatların hepsinde katalaz pozitif olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.2). *Pseudomonas* B6, B8 ve B1 izolatlarının katalaz testi Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. *Pseudomonas* B6, B8 ve B1 izolatlarının katalaz test sonucu; B6, B8, B1 katalaz pozitif

Costa ve ark. (2006) yaptıkları araştırmada *Pseudomonas* grubu bakterilerin oksidaz testinin pozitif veya negatif olarak değişiklik gösterdiğini; Holt ve ark., (1994) ise *Pseudomonas* bakterilerinin pozitif olduğunu bildirmiştir. Araştırmacıların sonuçları bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir.

4.3. *Pseudomonas* sp. İzolatlarının Farklı Sıcaklık ve Tuza Toleranslıkları

Pseudomonas izolatlarının 4, 28, 37, 41 °C'lik sıcaklıklar ve %1, % 2, % 3 ve % 4'lük NaCl içeren ortamlardaki toleranslıkları incelenmiştir (Çizelge 4.3). İzolatlarımızdan, +4 °C'de B2, B10, B22, B25, D1, D4, D9, D10, BA13 zayıf gelişmiş, B1, B4, B7, B8, B9, B14, B21, B23, B26 ve BA2 gelişmiş, diğer izolatlarda gelişme görülmemiştir. 28 °C'de tüm izolatlar gelişmiştir. 37 °C'de B2, B5, B10, B22, B24, B25, M4, D1, D3, D5, D6, BA13, BA14, BA23, BA24'de zayıf gelişme göstermiştir. 41 °C'de B1, B7, B9, B14, B15, B16, B17, B19, B21, B26, N11, N13, N14, D4, D8, D9, D11, BA2, BA15, BA17, BA18, BA19, BA20 izolatları gelişmiş, B2, B5, B8, B10, B22, B24, N12, M4, D1, D3, D5, D6, D10 ve BA23 izolatlarının ise zayıf gelişme gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.3).

Trivedi ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada, *Pseudomonas corrugata*'nın 7-35 °C arasındaki sıcaklık değerlerinde gelişmesi incelenmiş, en iyi gelişmenin 21 °C'de olduğu belirtilmiştir. Ayrıca yapılan deneylerde de *Pseudomonas corrugata*'nın *Alternaria alternata* ve *Fusarium oxysporum*'a karşı en iyi 21 °C'de antagonistik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Pseudomonas spp.'nin sıcaklığa olan toleranslılığı ile ilgili yapılan bir çalışmada, *Pseudomonas* RJ2 izolatının 20, 40 ve 41 °C'de gelişimleri değerlendirilmiş en iyi gelişmenin 20 °C ile 40 °C arasında olduğu, 41°C'de gelişmenin olmadığını tespit etmişlerdir (Jayaswal ve ark., 1990).

Sıcaklığın, bitki gelişimini teşvik eden mikroorganizmalarda koloni oluşturmalarında etkili olup olmadıklarını değerlendirmek için yapılan bir çalışmada izolatların 14, 18 ve 22 °C'deki gelişimleri incelenmiştir. Araştırma sonucuna göre sıcaklık değerlerinin koloni oluşturmada etkili oldukları, en iyi koloni oluşumunun 22 °C'de gerçekleştiği rapor edilmiştir (Davies ve Whitbread, 1989). Siddiqui ve ark. (2007) floresan *Pseudomonas* spp.'lerin 8 izolatının 4 °C ve 41 °C 'deki sıcaklık gelişimlerine bakmışlar ve 4 °C'de 3 izolatın gelişebildiği, 41 °C'de ise 5 izolatın geliştiğini rapor etmişlerdir.

Tuza toleranslılık deneyinde kontrol (%0), %1, %2, %3 NaCl'de izolatlar toleranslı bulundu. %4 NaCl içeren ortamda ise, izolatlardan B16, M2, M4, D2, D5, D6, D9, D10, BA13, BA17, BA19, BA20, BA23 ve BA24'ün gelişme göstermediği, N13 ve D8'in zayıf geliştiği, diğer tüm izolatların ise gelişme gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.3).

Egamberdieva (2005), *P. denitrificans*'ın %7 NaCl'de gelişmediğini, *P. rathonis*'in ise toleranslı olduğunu bildirmiştir. Ayrıca araştırmacı, tuza toleranslığının topraktaki yaşam için bir avantaj olduğunu belirtmiştir.

Jayaswal ve ark. (1990) *Pseudomonas* RJ2 izolatının %2'lik tuza tolerans gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızdaki *Pseudomonas* izolatlarımızın farklı sıcaklık derecelerinde gelişebilmeleri ve farklı tuz konsantrasyonlarına toleranslılıkları Bergey's Manual of Sistematik Bakteriyolojide verilen *Pseudomonas* spp. bakterilerinin özellikleriyle uygunluk göstermektedir. İzolatların farklı sıcaklık derecelerinde ve farklı tuz konsantrasyonlarında farklı gelişme göstermeleri ise, izolatlar arasındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.3. İzolatların farklı sıcaklık ve tuza toleranslıkları

İZOLATLAR	SICAKLIK (°C)				TUZA TOLERANSLILIK (%)				
	4	28	37	41	0	1	2	3	4
B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B2	Z	+	Z	Z	+	+	+	+	+
B3	-	+	+	-	+	+	+	+	+
B4	+	+	+	-	+	+	+	+	+
B5	-	+	Z	Z	+	+	+	+	+
B7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B8	+	+	+	Z	+	+	+	+	+
B9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B10	Z	+	Z	Z	+	+	+	+	+
B11	-	+	+	-	+	+	+	+	+
B14	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B15	-	+	+	+	+	+	+	+	+
B16	-	+	+	+	+	+	+	+	-
B17	-	+	+	+	+	+	+	+	+
B19	-	+	+	+	+	+	+	+	+
B20	-	+	+	-	+	+	+	+	+
B21	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B22	Z	+	Z	Z	+	+	+	+	+
B23	+	+	+	-	+	+	+	+	+
B24	-	+	Z	Z	+	+	+	+	+
B25	Z	+	Z	-	+	+	+	+	+
B26	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N11	-	+	+	+	+	+	+	+	+
N12	-	+	+	Z	+	+	+	+	+
N13	-	+	+	+	+	+	+	+	Z
N14	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M2	-	+	+	-	+	+	+	+	-
M4	-	+	Z	-	+	+	+	+	-
D1	Z	+	Z	Z	+	+	+	+	+
D2	-	+	+	-	+	+	+	+	-
D3	-	+	Z	Z	+	+	+	+	+
D4	Z	+	+	+	+	+	+	+	+
D5	-	+	Z	Z	+	+	+	+	-
D6	-	+	Z	Z	+	+	+	+	-
D8	-	+	+	+	+	+	+	+	Z
D9	Z	+	+	+	+	+	+	+	-
D10	Z	+	+	Z	+	+	+	+	-
D11	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Çizelge 4.3. (Devam)

İZOLATLAR	SICAKLIK (°C)				TUZA TOLERANSLILIK (%)				
	4	28	37	41	0	1	2	3	4
BA2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BA13	Z	+	Z	-	+	+	+	+	-
BA14	-	+	Z	-	+	+	+	+	+
BA15	-	+	+	+	+	+	+	+	+
BA17	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BA18	-	+	+	+	+	+	+	+	+
BA19	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BA20	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BA23	-	+	Z	Z	+	+	+	+	-
BA24	-	+	Z	-	+	+	+	+	-

(+) = gelişme var (-) = Gelişme yok

4.4. *Pseudomonas* spp. İzolatlarının Farklı Karbon Kaynaklarındaki Gelişimleri

İzolatlarımızın gelişimi ortama eklenen karbon kaynaklarına göre farklılık göstermiştir. Maltoz içeren ortamda, izolatlardan sadece BA2 gelişme göstermemiş diğer izolatlar gelişmiştir. Mannitol içeren ortamda B3, B7, B8, B14, B21, B26, D2, D4, M2, M4, BA2, BA13, BA23 ve BA24'ün gelişmediği, B2, B6, B10, B11, B15, B20, B24, D3, BA14, BA16 zayıf, diğer izolatların ise geliştiği gözlenmiştir.

Triptofan içeren ortamda B1, B12, B16, B17, B19, B25, N11, N12, N13, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, BA2, BA15, BA17, BA18, BA19 ve BA20 nolu izolatlar gelişmiştir. B9, B23, D1, D2, D3, M4 ve BA14 ise zayıf gelişme göstermiştir. Fruktoz içeren ortamda ise, B4, B24, B26, D3, M4, BA13 ve BA16 nolu izolatlarda gelişme görülmemiştir (Çizelge 4.4).

Ksiloz ortamında, B4, B13, B15, B24, B26, D3, D10, M4, BA14, BA16, BA24 gelişme görülmemiştir. Diğer izolatlar gelişme göstermiştir (Çizelge 4.4).

M-inositol içeren ortamda, B1, B4, B12, B17, B19, B25, N12, N13, D1, D2, D5, D10, D11, M4, BA2, BA13, BA18, BA23, N14, BA14, BA15, BA16, BA19, BA20 gelişmiş, diğer izolatlar gelişme göstermemiştir (Çizelge 4.4).

Mikroorganizmaların çoğu kendileri için gerekli olan enerjiyi karbonhidratlar gibi substratların biyooksidasyonunu gerçekleştiren enzimler yardımıyla elde ederler (Ji ve Wilson, 2002). Organizmaların karbonhidratları kullanımı, sahip oldukları enzim sistemleriyle ilgili olup, bir türün farklı izolatları arasında karbonhidratları kullanım bakımından farklılık olduğu saptanmıştır (Lugtenberg ve ark., 2001).

Organik substratlarca zengin rizosfer bölgelerinin mikroorganizmaların gelişmeleri uyardığı, kök bölgesinde bakteri sayısını arttırdığı bildirilmiştir (Egamberdieva, 2005). Köklerden salgılanan sızıntıların ve rizosferde bulunan karbonhidratların mikrobiyal gelişmeyi arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca kanalizasyon sularıyla yapılan sulama sonucu insanlara patojen olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın buğdayda hastalık etmeni *P. ultimum*'a biyokontrol etmeni olarak etkili olduğu belirlenmiştir (Egamberdieva ve ark., 2005). Çevresel izolatların, klinik izolatlardan genotipik, taksonomik ve metabolik özellikleriyle ayrıldığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Guo ve ark., 2005; Egamberdieva ve ark., 2005; Egamberdieva ve ark., 2008). Rizosfer bölgelerinden izole edilen izolatların ise insan vücudunda direk kolonize olduğuna dair tam bir kanıt bulunamamıştır (Egamberdieva, 2005). Araştırmada elde edilen izolatların test edilen karbon kaynaklarının çoğunu kullandıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Glukoz içeren ortamda, N11, N13, D9, D10, D11, M4, BA17, BA18, BA19 izolatlarında gelişme göstermemiştir (Çizelge 4.5). Walsh ve ark. (2001), rizosferde yüksek oranda bulunan floresan *Pseudomonas*'ların ortamdaki karbon kaynaklarının çeşitliliğine bağlı olarak rekabette etkili olduklarını saptamışlardır. Lugtenberg ve ark. (2001), ise yaptıkları bir çalışmada *Pseudomonas* spp.'nin kök bölgesinde kolonize olarak rekabet için besinleri katabolize ettiklerini ve karbon kaynaklarını kullandıklarını rapor etmişlerdir. Ahmad ve ark (2008) rizosfer fluoresan *Pseudomonas* izolatlarının karbon kaynaklarından; glukozu % 55.56, laktozu % 11.11, sükrozu %33.33 kullandığı ve manitolu ise kullanılmadığını rapor etmişlerdir. Araştırmada, izolatların % 72.34'nün manitolu, % 78.72'nin glikozu karbon kaynağı olarak kullandığı belirlenmiştir. Karbon kaynaklarından triptofanı kullanabilen izolat yüzdesi ise %57.44 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. İzolatların farklı karbon kaynaklarındaki gelişimleri

İzolatlar	KARBON KAYNAKLARI						
	Maltoz	Mannitol	Triptofan	Fruktoz	Ksiloz	M-inositol	Glukoz
B1	+	+	+	+	+	+	+
B2	+	+(Z)	-	+	+	-	+
B3	+	-	-	+	+	-	+
B4	+(Z)	+	-	-	-	+	+(Z)
B5	+	+	-	+(Z)	+	-	+
B7	+	-	-	+	+	-	+
B8	+	-	-	-	+(Z)	-	+
B9	+	+	+(Z)	+	+	-	+
B10	+	+(Z)	-	+	+	-	+
B11	+	+(Z)	-	+(Z)	+	-	+
B14	+	-	-	+	+	-	+
B15	+	+(Z)	-	+	-	-	+
B16	+	+	+	+	+	-	+
B17	+	+	+	+	+(Z)	+	+
B19	+	+	+	+	+	+	+
B20	+	+(Z)	-	+(Z)	+(Z)	-	+
B21	+	-	-	+	+(Z)	-	+
B22	+	+	-	+	+	-	+
B23	+	+	+(Z)	+	+	-	+

Çizelge 4.4. (Devam)

IZOLATLAR	KARBON KAYNAKLARI						
	Maltoz	Mannitol	Triptofan	Fruktoz	Ksiloz	M-inositol	Glukoz
B24	+	+(Z)	-	-	-	-	+
B25	+	+	+	+	+	+	+
B26	+	-	-	-	-	-	+
N11	+	+	+	+	+	-	-
N12	+	+	+	+	+	+	+
N13	+	+	+	+	+	+	-
N14	+	+	-	+	+	+(Z)	+(Z)
D1	+	+	+(Z)	+	+	+	+
D2	+(Z)	-	+(Z)	+	+(Z)	+	+
D3	+	+(Z)	+(Z)	-	-	-	+
D4	+	-	-	+	+	-	+
D5	+	+	+	+	+	+	+
D6	+	+	+	+	+	-	+
D8	+	+	+	+	+	-	+
D9	+	+	+	+	+	-	-
D10	+	+	+	+	-	+	-
D11	+	+	+	+	+	+	-
M2	+	-	-	+	+(Z)	-	+
M4	+	-	Z	-	-	+	-
BA2	-	-	+	+	+	+	+
BA13	+(Z)	+(Z)	+(Z)	+(Z)	-	Z	-
BA15	+	+	+	+	+	Z	+
BA17	+	+	+	+	+	-	-
BA18	+	+	+	+	+	+	-
BA19	+	+	+	+	+	+(Z)	-
BA20	+	+	+	+	+	+(Z)	+
BA23	+	-	-	+	+	+	+
BA24	+	-	-	+	-	-	+

(Z)= Zayıf gelişme (+) = Gelişme var (-) = Gelişme yok

Jayaswal ve ark. (1990), *Pseudomonas* RJ2 izolatının karbon kaynağı olarak triptofan, D-ksiloz, inositol, mannitol ve sükrozu kullandıkları, maltozu ise kullanamadıklarını rapor etmişlerdir.

4.6. *Pseudomonas* spp. İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

İzolatların penisilin, ampisilin, streptomisin, kloromfenikol ve sikloheksimid antibiyotiklerine dirençlilikleri test edilmiştir. Kullanılan antibiyotiklerin 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 µg/ml'lik dozları kullanılmıştır. İzolatların antibiyotiklere karşı gelişme gösterebilmesi dirençli, gelişme göstermemesi ise duyarlı olarak rapor edilmiştir.

Penisilinin 100 µg/ml'lik dozunda B16, B17, B19, N11, N12, N13, M2, M4, D2, BA2, BA13, BA17, BA18, BA19, BA20, BA23 gelişme göstermemiştir. 250, 500, ve 1000 µg/ml'lik dozlarda ise izolatlardan B3, BA24 ve 1000 µg/ml'lik dozda ise B5, B24 nolu izolatlar gelişme göstermediğinden penisilinin kullanılan bu dozlarına karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. Diğer izolatların bu dozlara dirençli olarak saptanmıştır. 1500µg/ml'lik dozda B2, B23, B11 ve B21 gelişme göstermiştir. Penisilinin kullanılan en yüksek dozunda (1500 µg/ml) ise 4 izolat (B2, B11, B21, B23) toleranslı olarak bulunmuştur.

İzolatların streptomisin 100 µg/ml'lik dozunda 13 izolatın (B16, B17, B19, N11, N13, M2, BA2, BA15, BA17, BA18, BA19, BA20, BA23, BA24) duyarlı diğerlerinin ise toleranslı olduğu belirlenmiştir. Streptomisin 250 ve 500 µg/ml'lik dozlarında 24 izolat (B1, B2, B5, B7, B8, B9, B10, B11, B14, B20, B21, B22, B23, B24, B25, B26, D1, D3, D4, D5, D6, D8, D9, D10) toleranslılık göstermiştir. Test edilen 1000 ve 1500 µg/ml'lik dozlarda ise izolatların gelişme göstermediği saptanmıştır.

Jayaswal ve ark. (1990) antibiyotik duyarlılık çalışmasında, *Pseudomonas* RJ2 izolatının, kloromfenikole karşı duyarlı olduğu; ampisilin, penisilin ve streptomisine karşı ise dirençli olduğunu belirtmiştir.

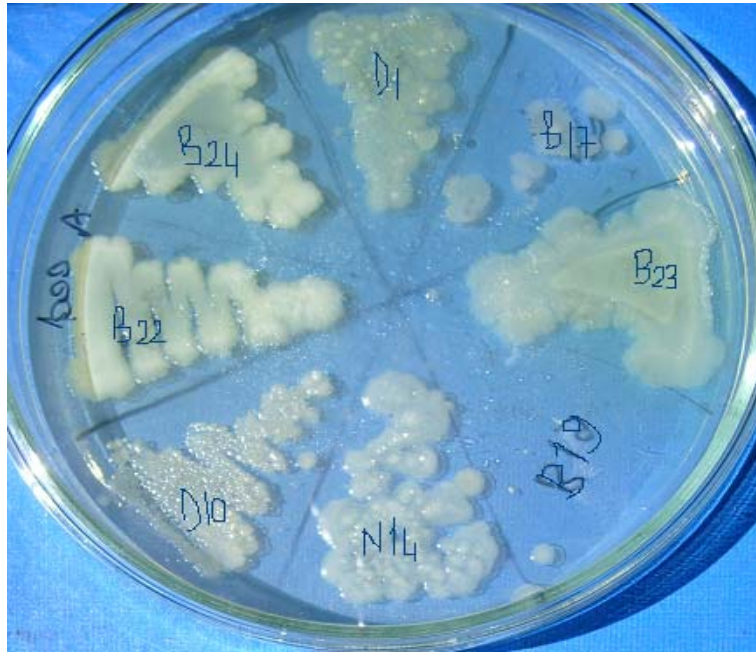
Pandey ve ark (2001) tarafından yapılan bir çalışmada *Pseudomonas corrugata*'nın 2 farklı izolatının farklı antibiyotiklere karşı olan dirençliliğini incelemişler. İzolatların

ampisilinin 10-1500 µg/ml'lik dozlarında direçli olduğunu saptamışlardır. Araştırmacıların bulguları bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Ayrıca Pandey ve ark. (2001); *Pseudomonas*'ın 2 izolatının kloromfenikolün 100 µg/ml'lik dozunda gelişme gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bizim izolatlarımızdan bazılarının kloromfenikolün 1500 µg/ml'lik dozunda da dirençli olduğu incelenmiştir (Çizelge 4.5). Bu da *Pseudomonas* izolatlarımızın farklı olduğunu göstermiştir.

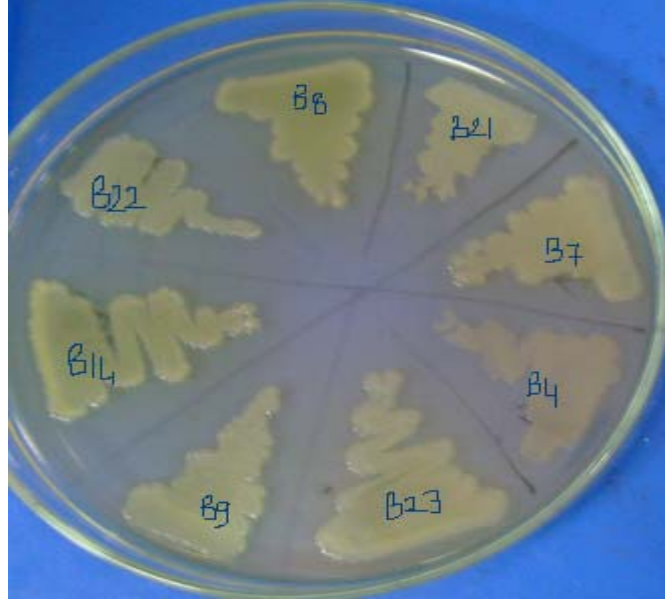
100 µg/ml'de ampisiline karşı izolatlardan B17, B19, N11, N13, M2, BA16, B A17, BA18, BA19, BA20, BA23'ün duyarlı olduğu bulunmuştur. Ampisilinin 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik dozlarında ise 27 izolatın (B1, B2, B3, B4, B5, B7, B8, B9, B14, B15, B21, B22, B23, B24, B25, B26, N14, M4, D1, D3, D4, D6, D9, D10, D11, BA2, BA15) dirençli olduğu saptanmıştır. 1500 µg/ml'lik dozda ise sadece 14 izolat (B1, B2, B5, B7, B9, B10, B11, B21, B22, B23, B25, D1, D4, BA2) ampisiline ise dirençlilik göstermiştir.

İzolatlardan bazılarının ampisilin 1000 µg/ml'lik doza dirençlilikleri Şekil 4.6 verilmiştir.



Şekil 4.6. *Pseudomonas* D10, B22, B24, D1, B17, B23, B19 ve N14 izolatlarının ampisiline dirençlilikleri. B17 duyarlı; B23, B17, D1, B24, B22, D10, N14 dirençli

Kloromfenikolün 100 µg/ml'lik dozunda izolardan B16, B17, B19, N11, N13, M2, BA2, BA15, BA17, BA18, BA19, BA20 ve BA23'ün gelişmediği, 250 ve 500 µg/ml'lik dozda ise B16, B17, B19, N11, N12, N13, M2, M4, D2, D8, D10, D11, BA2, BA13, BA15, BA17, BA18, BA19, BA20, BA23, BA24'ün gelişme göstermemiştir. 1000 µg/ml'lik dozda izolatlardan B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B14, B15, B20, B21, B22, B23, B24, B25, B26, D1, D3, D4 'ün kloromfenikole dirençli olduğu saptanmıştır. 1500 µg/ml'lik dozda 12 izolat (B1, B3, B5, B7, B9, B11, B21, B22, B23, B25, D1, D3) dirençlilik göstermiştir. İzolatlardan bazılarının kloromfenikolün 250 µg/ml'lik dozuna dirençlilikleri Şekil 4.7.'de verilmiştir.

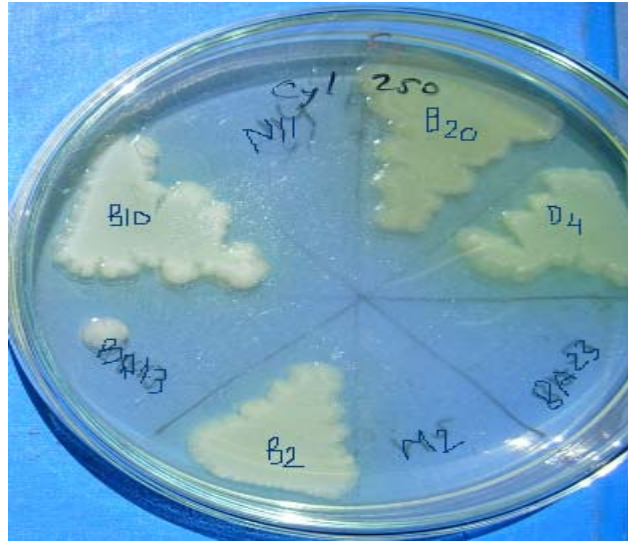


Şekil 4.7. *Pseudomonas* B22, B14, B9, B23, B4, B7, B21, B8 izolatlarının 250 µg/ml dozdaki kloromfenikole dirençlilikleri.

Şekil 4.7.'de B14, B22, B8, B21, B7, B4, B23, B9 izolatlarının 250 µg/ml dozdaki kloromfenikol dirençli olduğu görülmektedir.

Sindhu ve ark. (1999) patojenik fungide *Pseudomonas* spp.'nin antagonistik etkisini incelemek için yaptıkları çalışmalarında, *Pseudomonas* spp.'lerin antibiyotik dirençliliğini araştırmışlar ve *Pseudomonas* izolatlarından 6 tanesinin 20, 50, 100 ve 200 µg/ml⁻¹'lik dozlardaki ampisilin, kloromfenikol ve streptomisine duyarlılıklarını incelemişlerdir. Bu sonuca göre ampisilin ve kloromfenikolün 200 µg/ml⁻¹'lik dozlarına 6 izolatın dirençli olduğu, ancak iki izolatın streptomisinin 200 µg/ml⁻¹'lik dozuna dirençsiz olduğunu rapor etmişlerdir.

Sikloheksimidin 100 µg/ml'lik dozunda B16, B17, B19, N11, N13, M2, BA2, BA17, BA18, BA19, BA20, BA23, 250 ve 500 µg/ml'lik dozunda B16, B17, B19, N11, N12, N13, M2, M4, D2, BA2, BA13, BA15, BA17, BA18, BA19, BA20, BA23 ve 1000 µg/ml'lik dozda ise B16, B17, B19, N11, N12, N13, M2, M4, D2, D10, D11, BA2, BA13, BA15, BA17, BA18, BA19, BA20, BA23, BA24'ün duyarlı olduğu ve gelişmediği belirlenmiştir. 1500 µg/ml'lik dozda B4, B8, B15, B16, B17, B19, B24, B26, N11, N12, N13, M2, M4, D2, D9, D10, D11, BA2, BA13, BA15, BA17, BA18, BA19, BA20, BA23, BA24 izolatlarının gelişim göstermediği saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları görülmeyip negatif, diğer izolatlar pozitif sonuç vermiştir. *Pseudomonas*'ın bazı izolatlarının sikloheksimide olan toleranslılıkları Şekil 4.8. 'de görülmektedir.



Şekil 4. 8. *Pseudomonas* B20, D4, N11, B2, BA13, B10, M2, BA23 izolatlarının 250 µg/ml'lik dozda sikloheksimide dirençlilikleri. B10, B20, D4, B2 dirençli; N11, BA23, M2, BA13 duyarlı

Şekil 4.8.'de izolatlardan B20, B2, B10 ve D4'ün 1000 µg/ml'ye toleranslı olduğu görülmektedir. Çalışmada kullandığımız izolatlardan, test edilen antibiyotiklerin farklı dozlarına karşı olan % dirençlilik oranları Çizelge 4.5.'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. İzolatların antibiyotik konsantrasyonlarına etkisindeki % oranları

ANTİBİYOTİKLER	KONSANTRASYONLAR (µg/ml)				
	100	250	500	1000	1500
Penisilin	66	60	60	55	9
Streptomisin	72	51	51	0	0
Kloromfenikol	69	51	51	45	29
Ampisilin	79	62	62	62	30
Sikloheksimid	71	61	61	51	41

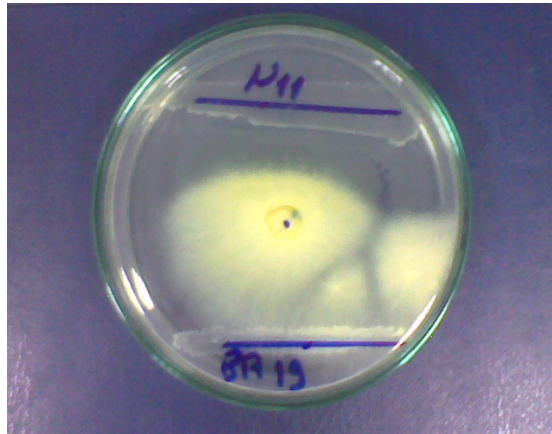
İzolatlardan 100 µg/ml'lik dozda en yüksek olarak Ampisiline %79 dirençlilik göstermiştir. Bunu sırasıyla; %72 oranıyla streptomisin, %71 oranıyla sikloheksimid, %69 oranıyla kloromfenikol ve %66 oranıyla penisilin izlemiştir. 100 µg/ml'lik dozda izolatlar arası en düşük dirençlilik %66 oranıyla penisilinde saptanmıştır. İzolatlardan 250 ve 500 µg/ml'lik dozda en yüksek olarak Ampisiline %60 dirençlilik göstermiştir. Bunu sırasıyla; %61 oranıyla sikloheksimid, %60 oranıyla penisilin ve % 51 oranıyla streptomisin ile kloromfenikol izlemiştir. 250 ve 500 µg/ml'lik dozda izolatlar arası en düşük dirençlilik %51 oranıyla streptomisin ve kloromfenikolde saptanmıştır. İzolatlardan 1000 µg/ml'lik dozda en yüksek olarak Ampisiline %62 dirençlilik göstermiştir. Bunu sırasıyla; %55 oranıyla penisilin, %51 oranıyla sikloheksimid ve % 45 oranıyla kloromfenikol izlemiştir. 1000 µg/ml'lik dozda izolatlar arası en düşük dirençlilik %0 oranıyla streptomisinde saptanmıştır. İzolatlardan 1500 µg/ml'lik dozda en yüksek olarak Ampisiline %41 dirençlilik göstermiştir. Bunu sırasıyla; %30 oranıyla Ampisilin, %29 oranıyla kloromfenikol ve %9 oranıyla penisilin izlemiştir. 1500 µg/ml'lik dozda izolatlar arası en düşük dirençlilik %0 oranıyla streptomisinde saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Pandey ve ark. (2001), toprakta bol miktarda bulunan antibiyotiklere karşı dirençli olan izolatların mikrobiyal inokulant olarak kullanılabilceğini, dirençli olan izolatların toprakta canlılıklarını uzun yıllar sürdürebildikleri, rekabetçi yetenekleri ile hastalıkları kontrol etmede büyük önem taşıdıkları Siddiqui ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada belirtilmiştir. İzolatlarımızdan B1, B2, B8, B21, B22, B23'ün ampisilin, sikloheksimid ve penisilinin test edilen yüksek dozunda (1500 µg/ml) dirençli olduğu ve bu izolatların toprakta rekabetçi özellik gösterebileceği düşünülmektedir.

4.7. *Pseudomonas* sp. İzolatlarının Antagonist Aktiviteleri

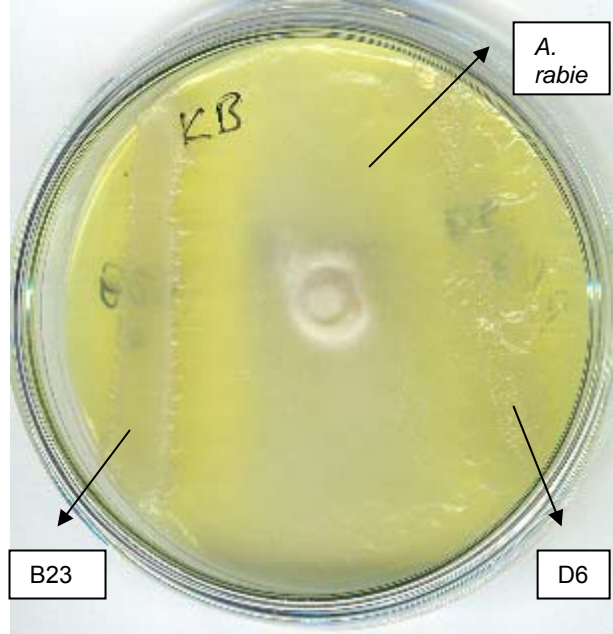
Şanlıurfa ve çevresinde yaygın olarak tarımı yapılan mısır, biber ve dereotu rizosfer bölgesinden ve boş arazi alanlarından izole edilen *Pseudomonas* spp. izolatlarının fungal bitki patojenlerine karşı antagonistik aktiviteleri fungal gelişme üzerine incelenmiş ve izolatlar farklı etkiler göstermiştir. İnhibisyon deneylerinde izolatlarımızın *Fusarium moniliforme*, *F. solani*, *Alternaria alternata*, *F.culmorum*, *F. accumitanum*, *F. chlamydosporum*, *A. rabiei*, *Drechslera sorokiniana* fungal patojenlerine karşı aktiviteleri incelenmiştir.

İzolatlarımızdan B1 ve B2 *F. culmorum*'a karşı etkili bulunmuştur. N11 ve N14 izolatları *F. solani*'ye karşı etkili bulunmuştur. *Pseudomonas* N11 ve BA19'un *F. solani*'ye karşı aktivitesi Şekil 4.9.'da verilmiştir.



Şekil 4.9. *Pseudomonas* N11 ve BA19'un *F. solani*'ye karşı görünümü

B8 izolatu % 68,57 ile B23 ve M4 izolatlarının %66,6 oranıyla *F. accuminatum*'a karşı, N11 izolatu %70.58 ile *F. moniliforme*'ye karşı, %83.3 ile B16 ve %75 ile BA15 izolatları *F. chlamydosporum*'a karşı, %96.77 ile B1, B5, N11, N12, M4 ve BA2, % 93.54 ile B26, %83 ile B11 izolatu ve % 80.64 ile D9 izolatu *Drechslera sorakiana*'ya karşı etkili bulunmuştur (Çizelge 4.9). N11 izolatu %87.5 ile, B8 izolatu %75, B2 izolatu %70 ile *Alternaria alternata*'ya karşı etkili bulunmuştur. %82.97 ile D2 izolatu, %80.76 ile B8 izolatu *Ascochyta rabiei*'nin gelişmesini inhibe etmiştir (Çizelge 4.9). Nohut rizosferinden izole ettiğimiz N12 izolatu *Ascochyta rabiei*'nin gelişmesini %68 oranında engellemiştir. İzolatlardan B23 ve D6'nın *Ascochyta rabiei*'ye karşı aktivitesi Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. *Pseudomonas* B23ve D6 izolatlarının *A. rabiei* ile etkileşimi

Pseudomonas bakterilerinin çalışmada kullanılan bitki patojenlerinin gelişmesini engelledikleri belirlendi. Bu engelleme izolatlarımızca üretilen metabolitler ve enzimler tarafından kaynaklanmış olabilir. Gardner ve ark. (1984) , *Pseudomonas* bakterilerinin farklı antibiyotik benzeri madde ürettiklerini ve bu izolatların patojen olan *Pseudomonas* bakterilerinkinden farklı dirence sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Yapılan benzer çalışmalarda da, bitki patojenlerine karşı *Pseudomonas* sp.'nin etkili olduğu saptanmıştır (Ahmad ve ark., 2008; Guo ve ark., 2007; Costa ve ark., 2006).

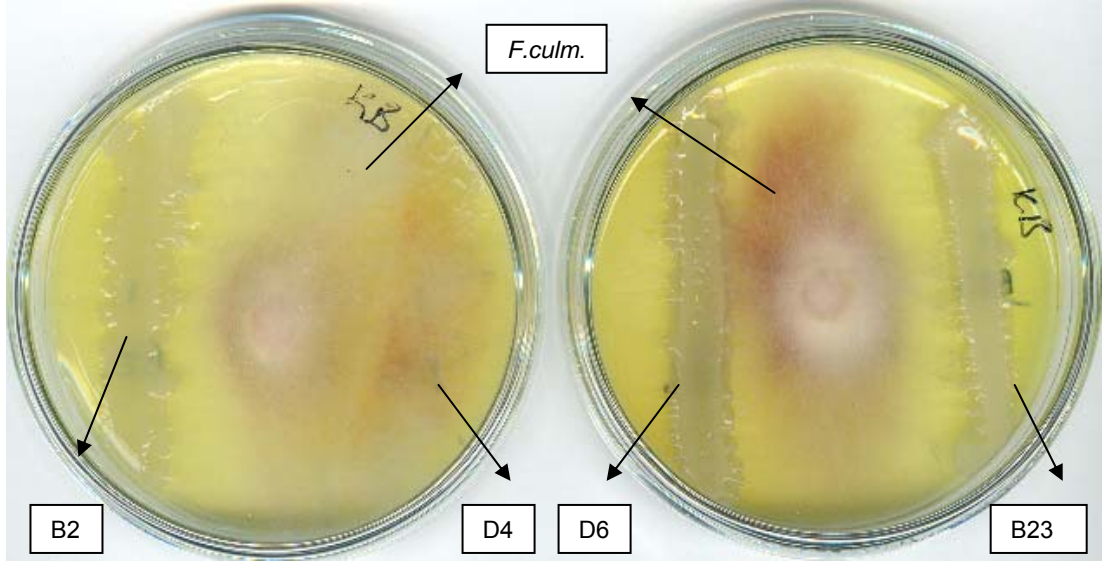
Pseudomonas izolatları tarafından üretilen farklı kimyasal yapıdaki metabolitlerin, fungal membranın geçirgenliğini etkilediği, fungal miselyumun gelişmesini önleyerek spor oluşumunu engellediği araştırmacılar tarafından saptanmıştır (Muleta ve ark., 2007; Costa ve ark., 2006; Egabberdiyeva, 2005).

İzolatların *F. accuminatum*'a karşı etkisi Şekil 4.11.'de ve *F. culmorum*'a karşı antagonistik etkileri Şekil 4.12.'de verilmiştir.



Şekil 4.11. *Pseudomonas* B14 ve D3'ün *F. accuminatum*'a etkisi

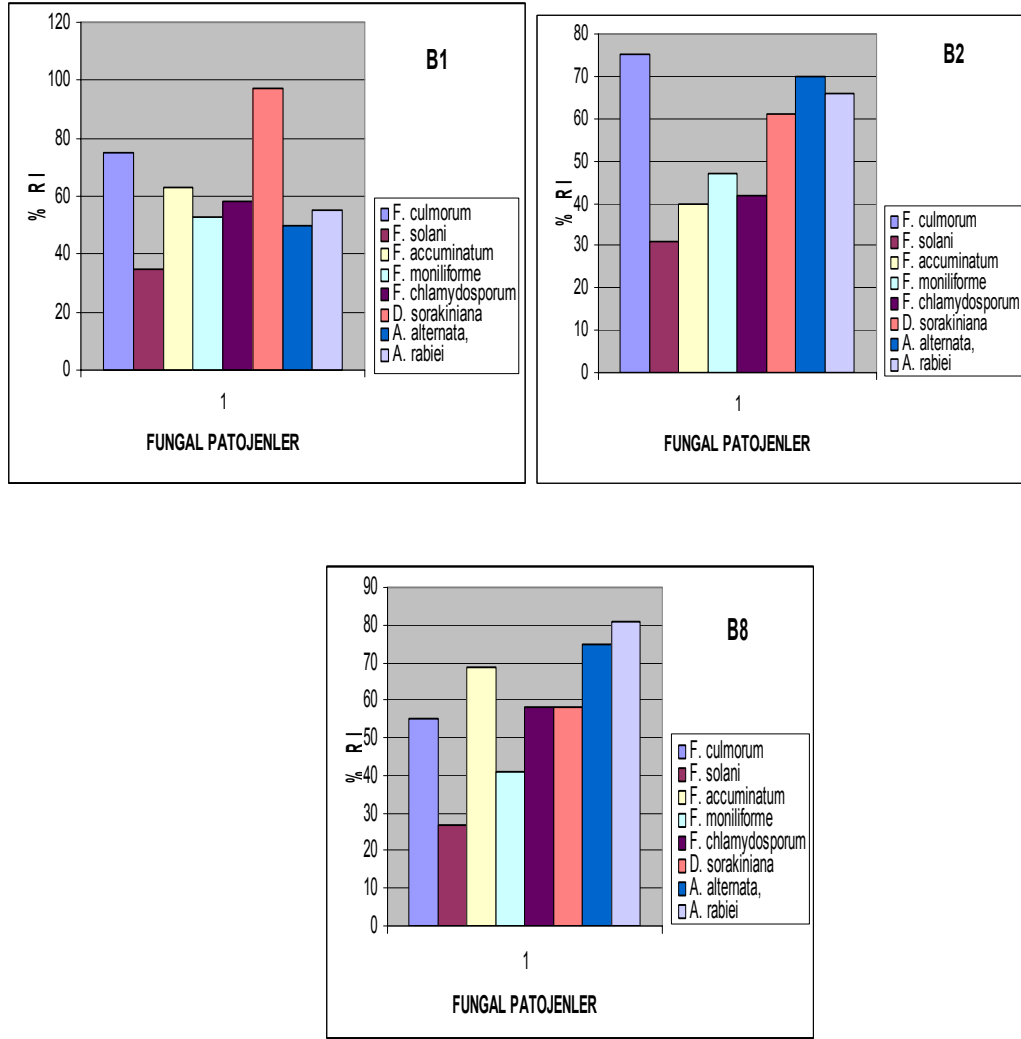
F. accuminatum'un kontrol grubunda normal gelişerek petriyi kapladığı görülürken, B14 ve D3 izolatlarının olduğu petride izolatların bu fungal patojenin gelişimini engellediği görülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.12. *Pseudomonas* B2 ve D4, *Pseudomonas* D6, B23 İzolatlarının *F. culmorum*'a karşı görünümü

Pseudomonas'ın B2, D4, D6 ve B23 izolatlarının *F. culmorum*'un gelişimini engelledikleri Şekil 4.12'de belirlenmiştir.

Şekil 4.13.'de B1, B2 ve B8 izolatlarının *Fusarium culmorum*, *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. moniliforme*, *Alternaria alternata*, *Drechslera sorokiniana*, *Ascochyta rabiei* ve *F. chlamydosporum*'ye karşı aktiviteleri verilmiştir.



Şekil 4.13. İzolatların fungal patojenlere karşı %RI değerleri

Pseudomonas spp. izolatları arasında ortaya çıkan bu farklılık patojenlerin farklı dirence sahip olmalarından kaynaklanabileceği gibi, *Pseudomonas* izolatlarının farklı kimyasal ve enzim üretmelerinden de kaynaklanmış olabilir.

İzolatların ve patojenik funguslara ait varyans analizi Çizelge 4.6.'da verilmiştir. İzolatlar arasındaki farklılık %1 düzeyinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.6. Varyans analiz Tablosu

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Genel	375	209401.9	558.40.51	1.59
İzolat	46	45128.3	981.0	2.8**
Patojen	7	51688.2	7384.03	21.12**
Hata	322	112585.4	349.64	

** %1 düzeyinde önemli

İzolatların 8 farklı fungal patojene olan etkinliklerini Duncan testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. İzolatların Duncan testine göre etkinlikleri

İzolat	Etkinlik düzeyi	İzolat	Etkinlik düzeyi	İzolat	Etkinlik düzeyi
B1	60.75	B21	41.63	D5	34.88
B2	54.00	B22	49.13	D6	35.50
B3	46.63	B23	47.75	D8	35.25
B4	30.00	B24	31.38	D9	40.00
B5	38.1	B25	42.63	D10	37.38
B7	33.00	B26	32.5	D11	48.75
B8	58.00	N11	47.1	BA2	50.4
B9	33.63	N12	45.8	BA13	20.75
B10	37.00	N13	43.50	BA15	30.2
B11	42.63	N14	41.50	BA17	20.38
B14	43.50	M2	29.50	BA18	17.25
B15	36.50	M4	45.0	BA19	21.00
B16	31.1	D1	40.50	BA20	19.13
B17	13.88	D2	27.00	BA23	33.25
B19	12.63	D3	34.13	BA24	23.75
B20	41.50	D4	34.88		

Çizelge 4.7.'de de görüldüğü gibi, izolatlarımızın patojen üzerindeki etkileri 60.75 ile 12.63 arasında değişiklik göstermiştir. En etkili olarak *Pseudomonas* B1 izolatı 60.75 ile, en düşük etki gösteren ise 12.63 ile *Pseudomonas* B19 izolatı olmuştur.

İzolatların farklı fungal patojenlere karşı % engellemesi ile ilgili veriler ise Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. İzolatların farklı fungal patojenlere karşı % engellemesi

İZOLATLAR	BİTKİ PATOJENİ FUNGUSLAR							
	<i>F. culmorum</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. accuminatum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>D. sorokiniana</i>	<i>A. alternata</i>	<i>A. rabiei</i>
B1	75	34.61	62.85	52.94	58.33	96.77	50	54.9
B2	75	30.76	40	47.05	41.66	61.29	70	65.71
B3	47.61	19.23	50	26.47	83.3	41.93	50	56.25
B4	20	11.53	62.55	23.5	16.6	51.61	20	33.3
B5	11.11	23.07	44.9	26.47	-	96.77	45	58
B7	11.1	26.92	9.09	32.35	41.6	41.93	57.5	44.4
B8	55.5	26.92	68.57	41.17	58.3	58.06	75	80.76
B9	55.55	19.23	42.85	11.76	-	45.16	45	50
B10	40	3.84	70	20.58	33.3	58.06	37.5	33.3
B11	40.54	23.07	44.9	35.29	16.6	83.87	37.5	60
B14	66.6	23.07	37.5	41.17	8.3	61.29	41.66	69.04
B15	61.1	15.38	9.09	-	25	66.66	62.5	52.7
B16	11.11	-	3.12	8.82	83.3	51.61	45	45.65
B17	-	-	2.77	17.64	16.6	64.51	62.5	4,25
B19	-	-	25	-	-	25.8	50	-
B20	55.55	11.53	42.85	41.17	33.3	51.61	55	40
B21	56	23.07	33.3	41.34	16.6	61.29	52.77	48.83
B22	67.56	23.07	60	41.34	25	61.29	55	60
B23	42.85	23.07	66.6	41.17	41.66	64.51	57.5	44.4
B24	11.11	23.07	3.12	55.88	41.66	61.29	42.5	13.04
B25	65.9	3.84	54.28	41.17	16.6	45.16	50	64
B26	-	30.76	50	35.29	-	93.54	50	-
N11	-	57.69	7.4	70.58	50	96.77	87.5	6.52
N12	51.35	7.69	35.29	11.76	33.33	96.77	62.5	68
N13	48.64	50	25	11.76	66.6	74.19	65	6.25
N14	51.93	57.69	33.3	50	25	51.61	37.5	25
M2	23.07	-	25.92	47.05	75	51.61	-	13.04

Çizelge 4.8. (Devam)

İZOLATLAR	BİTKİ PATOJENİ FUNGUSLAR							
	<i>F. culmorum</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. accuminatum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>D. sorokiniana</i>	<i>A. alternata</i>	<i>A. rabiei</i>
M4	50	-	66.6	11.76	66.66	96.77	25	42.5
D1	37.5	26.92	33.3	26.47	25	70.96	50	55
D2	25	3.84	33.3	-	-	45.94	25	82.97
D3	35.13	23.07	41.6	26.47	-	58.06	37.5	52.38
D4	40.54	-	20	23.5	33.3	61.29	47.5	54.28
D5	23.91	38.46	47.68	26.47	50	45.16	37.5	11.11
D6	60	23.07	13.3	32.35	41.66	45.16	40	28.8
D8	57.69	30.76	13.3	11.76	50	48.38	45	25
D9	33.3	26.92	31.25	26.47	-	80.64	65	57.49
D10	33.3	23.07	43.75	41.17	-	54.83	50	53.19
D11	56.52	23.07	52.38	41.17	50	51.61	57.5	57.69
BA2	55.55	23.07	60	41.17	-	96.77	62.5	64
BA13	-	-	9.09	5.8	33.33	22.58	25	70
BA15	-	-	62.5	2.94	75	64.51	25	10.63
BA17	41.17	-	-	-	-	45.61	25	50.98
BA18	6	-	16.6	-	41.6	45.61	25	2.32
BA19	44.18	-	33.3	-	41.66	38.7	-	11.1
BA20	-	-	9.09	26.47	8.3	45.16	45	20
BA23	48.83	-	33.3	32.35	41.66	48.38	24	37.7
BA24	51.1	-	33.3	2.94	16.6	25.8	-	59.57

(-) = Fungus gelişimini engellemedi

İzolatların *Drechslera sorokiniana*'nın gelişimi üzerine etkili oldukları incelenmiş, B1, B2, B4, B5, B8, B10, B11, B14, B15, B16, B17, B20, B21, B22, B23, B24, B26, N11, N12, N13, N14, M2, M4, D1, D3, D4, D9, D10, D11, BA2, BA15 izolatları % 50'nin üzerinde etkili bulunmuştur (Çizelge 4.8).

Fusarium culmorum'a karşı en etkili olarak %75 oranıyla B1 ve B2 izolatu olup B17, B19, B26, N11, BA13, BA15, BA20 izolatları ise etkisiz olarak saptanmıştır. *F. solani*'ye karşı N11 ve N14 izolatları %57.69 oranıyla en etkili olarak bulunmuştur. B16, B17, B19, M2, M4, D4, BA13, BA15, BA17, BA18, BA19, BA20, BA23 ve BA24 izolatları *F. solani*'ye karşı etkili bulunmamıştır.

F. accuminatum'a karşı B8 izolatu %68.57 oranıyla en etkili olarak bulunmuştur. BA17 izolatu *F. accuminatum*'a karşı etkili bulunmamıştır. *F. moniliforme*'ye karşı N11 izolatu %70.58 oranıyla en etkili olarak bulunmuştur. B15, B19, D2, BA17, BA18 ve BA19 izolatları *F. moniliforme*'ye karşı etkili bulunmamıştır. *F. chlamydosporum*'a karşı B3 ve B16 izolatu % 83.3 oranıyla en etkili olarak bulunmuştur. B5, B9, B19, B26, D2, D3, D9, D10, BA2 ve BA17 izolatları *F. chlamydosporum*'a karşı etkili bulunmamıştır. *Drechslera sorakiniana*'ya karşı B1, B5, N11, N12, M4 ve BA2 izolatları %96.77 oranıyla en etkili olarak bulunmuştur. *Drechslera sorakiniana*'ya karşı en düşük etki %22.58 oranıyla BA13 izolatında görülmüştür. *Alternaria alternata*'ya karşı N11 izolatu %87.5 oranıyla en etkili bulunmuştur. M2, BA19, BA24 izolatları *Alternaria alternata*'ya karşı etkili bulunmamıştır. *Ascochyta rabiei*'ye karşı D2 izolatu %82.97 oranıyla en etkili bulunmuştur. B19 ve B26 izolatları *Ascochyta rabiei*'ye karşı etkili bulunmamıştır.

Çizelge 4.9. İzolatların Duncan testine göre bitki patojenlerine etkinlikleri

Patojen	Etkinlik
<i>Fusarium moniliforme</i>	37.11
<i>Fusarium solani</i>	17.30
<i>Alternaria alternata</i>	35.38
<i>Fusarium culmorum</i>	26.53
<i>Fusarium accuminatum</i>	31.57
<i>Drechslera sorakiana</i>	59.79
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	42.83
<i>Ascochyta rabiei</i>	41.34

Yapılan Duncan testine göre izolatları patojenler arasında en fazla *Drechslera sorakiana*'nın gelişmesini inhibe etmişlerdir. Patojenler arasında en dirençli olarak *Fusarium solani* bulunmuştur (Çizelge 4.9).

Fusarium türlerinin izolatları karşı dirençli olması hücre duvarlarındaki protein miktarının diğer fungal hücre duvarlarından daha fazla olmasından kaynaklanabilir. Elad ve Baker (1985) ve Sneh ve ark. (1984) yapılan çalışmalarda *Fusarium* türlerine tek bir izolatu etkili olmadığını tespit etmişlerdir.

Costa ve ark. (2006) mısır rizosferinden 39 *Pseudomonas* spp. izolatının *Ralstonia solanacearum*'a karşı antagonistik aktivitelerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, 1-7 mm arasında değişen inhibisyon zonlarını saptamışlardır.

Çalışmamızda izolatlarımızın antagonistik aktivite deneylerinde 1- 25 mm arasında inhibisyon zonları oluşturdukları belirlenmiştir. İzolatlarımızın inhibisyon zonları sonuçları Çizelge 4.10.'da verilmiştir

Çizelge 4.10. İzolatların inhibisyon zonları

İzolatlar	İNHİBİSYON ZONLARI (mm)							
	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>A. alternata</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. accuminatum</i>	<i>D. sorokiniana</i>	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>A. rabiei</i>
B1	4	-	3	-	4	17	17	-
B2	3	-	10	3	6	6	14	5
B3	-	-	3	-	-	1	21	-
B4	-	-	-	-	-	-	8	-
B5	1	-	1	-	-	16	10	-
B7	2	-	3	-	-	3	11	-
B8	3	-	10	-	5	11	16	6
B9	-	-	5	-	-	2	11	-
B10	-	-	1	-	-	2	15	-
B11	-	-	-	-	1	10	12	-
B14	3	-	5	-	-	5	8	5
B15	-	-	2	-	-	9	8	-
B16	-	-	1	-	-	10	19	1
B17	2	-	10	-	-	12	5	-
B19	-	-	3	-	-	1	7	-
B20	-	-	1	-	-	4	12	-
B21	-	-	-	-	-	-	8	-
B22	3	-	7	3	8	7	14	3
B23	-	-	10	-	6	1	11	5
B24	3	-	5	-	10	7	13	-
B25	-	-	5	-	-	7	10	-
B26	-	-	2	-	1	18	16	-
N11	10	13	25	-	-	13	15	-
N12	-	-	5	-	4	-	10	1
N13	-	13	10	-	-	1	14	-

Çizelge 4.10. (Devam)

İZOLATLAR	İNHİBİSYON ZONLARI (mm)							
	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>A. alternata</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. accuminatum</i>	<i>D. sorokiniana</i>	<i>F. Chlamydosporum</i>	<i>A. rabiei</i>
N14	1	3	-	-	-	3	12	-
D1	3	1	1	3	-	5	10	5
D2	-	-	-	-	-	-	6	4
D3	-	-	-	-	-	5	11	-
D4	-	-	1	-	-	7	14	-
D5	7	-	3	-	5	5	13	-
D6	2	-	3	-	-	5	17	-
D8	3	-	5	-	-	2	10	-
D9	-	3	3	-	1	18	14	-
D10	-	1	3	-	-	4	9	-
D11	2	2	3	-	3	3	8	-
M2	-	-	-	-	1	6	18	-
M4	-	-	-	-	-	-	11	-
BA2	3	-	12	-	5	5	14	2
BA13	-	-	10	-	-	-	16	-
BA15	-	-	-	-	-	10	1	-
BA17	-	-	2	-	-	7	14	-
BA18	-	-	-	-	-	5	19	-
BA19	-	-	-	-	-	-	15	-
BA20	-	-	5	-	-	5	11	-
BA23	-	-	2	-	-	7	15	-
BA24	-	-	-	-	-	1	12	-

(-) = Zon oluşumu yok

Trivedi ve ark. (2008) *Pseudomonas corrugata*'nın *Alternaria alternata*'ya karşı inhibisyon zonunu; 24 saat sonra 15 mm; 48 saat sonra 25 mm; 72 saat sonra 33 mm; 96 saat sonra 41 mm; 120 saat sonra ise 47 mm olarak belirtmişlerdir. İnhibisyon zonları arasında görülen farklılığın *Pseudomonas* izolatları arasındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülebilir.

İzolatların test edilen fungal patojenlerin gelişimleri üzerine etkileri farklı olmuştur. En yüksek inhibisyon zonu *Alternaria alternata*'da 25 mm ile N11 izolatında ve *Fusarium chlamydosporum*'da 21 mm ile B3 izolatında saptanmıştır. Bunu 19 mm ile *F. chlamydosporum*'a karşı BA18 izolatu izlemiştir. Pandey ve ark. (1998) *Pseudomonas corrugata* 1'in *Fusarium moniliforme*'ye karşı inhibisyon zonunun 8.7 mm ve *Pseudomonas corrugata* 7'nin *Fusarium moniliforme*'ye karşı inhibisyon zonunun 8.3 mm olduğunu belirtmişlerdir (Çizelge 4.10).

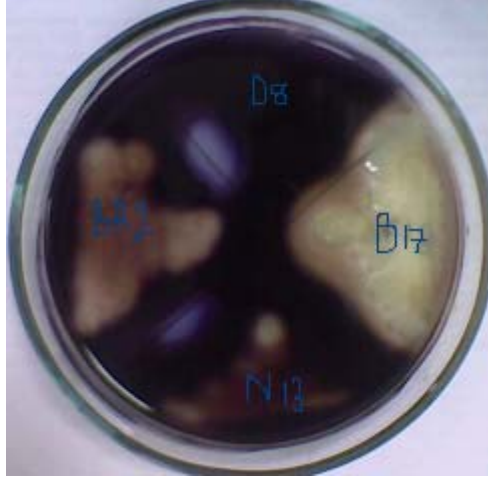
Ahmad ve ark (2008) kök bölgesinden izole ettikleri bakterilerin aktivitelerini incelemişler, *Pseudomonas* Ps5 izolatının *F. solani*'ye karşı Nutrient agar ortamında inhibisyon zonunun 12 mm olduğunu bildirmişlerdir.

4.8. *Pseudomonas* spp. İzolatlarının Enzim Aktiviteleri

Çalışmada kullanılan fungal patojenlere karşı antagonistik aktivitede etkili bulunan izolatların amilaz, kitinaz, sellülaz, üreaz, proteaz, lipaz gibi hidrolitik enzimleri araştırılmıştır. Nişasta, *Pseudomonas* spp. izolatlarınca sentezlenen ekstrasellüler amilaz enzimi tarafından hidrolize edilerek glikoza kadar ayrıştırılmaktadır (Guo ve ark., 2007). Kishore ve ark., (2005) ve Klein ve ark., (1998) tarafından birçok tarım ürünlerinin bulunduğu toprak ve rizosfer örneklerinden izole edilen *Pseudomonas* spp. izolatlarında amilaz aktivite belirlenmiştir.

Test edilen izolatlardan B17, N11, N12, N13, BA2, BA13, BA17, BA19, BA20, BA23 ve BA24'ün amilaz aktiviteleri pozitif olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Şekil 4.14.'de B17, BA2, N13, D8 izolatlarının amilaz aktivitesi verilmiştir. BA2, B17 ve N13 parlak renk oluşturmalarıyla pozitif sonuç vermiştir. BA2, B17, N13'ün amilaz enzimine sahip olduğu ancak N13'ün BA2 ve B17 'ye oranla daha zayıf nişastayı hidrolize ettiği görülmüştür. D8'de ise amilaz aktivitesi görülmemektedir.



Şekil 4.14. *Pseudomonas* B17, BA2, N13, D8 izolatlarının amilaz aktivitesi

Pandey ve ark. (1998), *Pseudomonas corrugata* ile yaptıkları çalışmalarında nişasta hidrolizinin pozitif sonuç verdiğini belirtmişlerdir.

Çalışmada tüm izolatların jelatini hidrolize etmedikleri belirlenmiştir. Siddiqui ve ark. (2007), floresan *Pseudomonas*'ların 8 izolatının jelatini hidroliz etmelerini değerlendirmişler ve tüm izolatların pozitif sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Pandey ve ark. (1998), *Pseudomonas corrugata* ile yaptıkları çalışmada jelatin hidrolizinin pozitif sonuç verdiğini rapor etmişlerdir. Egamberdieva (2005) izolatlardan *P. denitrificans* ve *P. rathonis*'in jelatin hidrolizi göstermediğini belirtmişlerdir. Araştırmamızın bulguları bizim bulgularımızla uyum içindedir.

B2, B4, B7, B8, B9, B14, B15, B16, B17, B21, B23, B24, B25, B26, D1, D2, D4, D5, D10, M2, M4, BA2, BA13, BA15, BA17, BA18, BA24 izolatları lipaz aktivitesinde pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.11). Pandey ve ark. (1998) *Pseudomonas corrugata* ile yapılan çalışmalarında Tween-80 (lipaz) hidrolizasyonunun pozitif sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Ahmad ve ark (2008); kök bölgesinden izole ettikleri floresan *Pseudomonas*'ların %77.78'nin lipaz aktivite gösterdiğini, Egamberdieva (2005) ise lipaz aktivitesinde *P. denitrificans*'ın negatif, *P. rathonis*'in ise pozitif sonuç verdiğini bildirmiştir.

Çalışmada, B17, B19, N11, N12, N14, BA2, BA20, BA23, D8 ve D11 izolatları proteaz aktivitesine sahip iken diğer izolatların proteaz aktivitesine sahip olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.12). Egamberdieva (2005) izolatlarından *P. denitrificans* ve *P. rathonis*'de proteaz aktivitesinin gerçekleşmediğini belirtmiştir.

Doğada azottan sonra en fazla ihtiyaç duyulan ikinci element fosfordur. Fosforun çoğu topraklarda çözünmeyen form şeklinde bulunur. Toprakta çok az bir (yaklaşık %0.1) kısmı bitkilerin yararlanılabileceği formda bulunmaktadır (Podile ve Kishore, 2006). Bitkinin fosfora ihtiyaçları fosforlu gübrelerin verilmesiyle giderildiği gibi, topraktaki çeşitli mikroorganizmaların sahip olduğu fosfataz enzimiyle bitkilerin alabileceği formlara dönüşebilmektedir (Podile ve Kishore, 2006). Fosfat çözebilen bakterilerin başlıcalarının *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia spp.* ve *Azotobacter chroococcum* olduğu bildirilmiştir (Podile ve Rishore, 2006).

İzolatlardan D5 ve D11 izolatlarında fosfataz aktivite belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Topraktan izole edilen *Pseudomonas spp.*'den özellikle *P. chlororaphis* ve *P. putida*'nın fosfataz enzimiyle fosfatı çözebildikleri saptanmıştır (Kim ve ark., 1998b). Hariprasad ve Niranjana (2008) yaptıkları bir çalışmada, *Pseudomonas* izolatlarının agar ortamında fosfataz enzimi ürettiklerini bildirmişlerdir. Fosfataz enzimi üretebilen izolatların toprakta çözülmeyen haldeki fosfatı çözerek bitkilerin kullanımına sunduğu ve böylece bitkinin fosfat ihtiyacının giderilebileceği açıklanmıştır (Podile ve Kishore, 2006).

Vessey (2003) fosfor çözebilen mikroorganizmaların rizosfer bölgesinde yoğun olarak bulunduğunu bildirmiştir. Hariprasad ve Nijanjana, (2008) çeşitli rizosfer bakterilerinin fosfatı çözebilirliklerini incelemişler, domates rizosferinden izole ettikleri *Pseudomonas spp.*'nin bazı izolatının fosfatı çözebildiğini saptamışlardır.

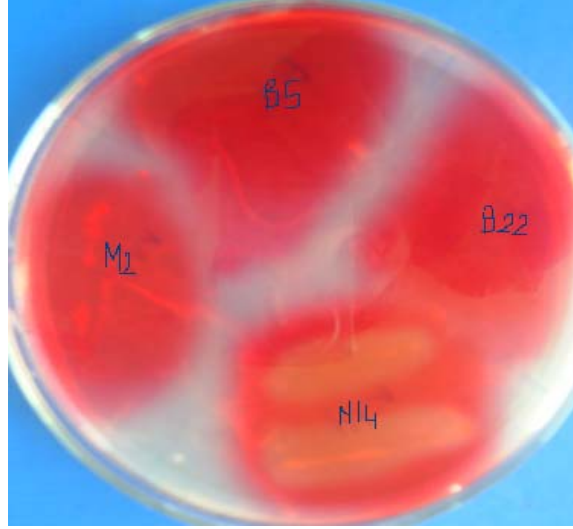
Çizelge 4.11.Pseudomonas spp. izolatlarının enzim aktiviteleeri

İzolatlar	ENZİM AKTİVİTELERİ								
	Üreaz	Amilaz	Jelatin hidrolizi	Lipaz (mm)	Fosfataz (mm)	Proteaz	Sellülaz	Arjinin dehidrolaz	Kitinaz (mm)
B1	-	-	-	-	-	-	+	+	-
B5	+	-	-	-	-	-	+	+	-
B8	-	-	-	+(2)	-	-	+	+	-
B16	-	-	-	+(2)	-	-	+	+(Z)	+(18)
B17	-	+	-	+(2)	-	+	+	-	+(12)
B22	+	-	-	-	-	-	-	+	-
B26	-	-	-	+(2)	-	-	+	-	+(8)
N13	-	+	-	-	-	-	-	+(Z)	-
N14	+	-	-	-	-	+	+	+	+(1)
D1	+	-	-	+(2)	-	-	-	+	-
D5	+	-	-	+(3)	+(1)	-	+	-	-
D8	+	-	-	-	-	+	+	-	-
D9	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D11	-	-	-	-	+(3)	+	+	+	+(1)
M2	-	-	-	+(3)	-	-	-	-	+(7)
M4	-	-	-	+(4)	-	-	-	+	-
BA2	+	+	-	+(2)	-	+	+	+(Z)	+(6)
BA15	-	-	-	+(2)	-	-	+	-	+(1)

Zayıf (Z), negatif (-), pozitif (+)

Trivedi ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada *P. corrugata*'nın lipaz ve kitinaz enzimlerini ürettiğini, *A. alternata* ve *F. oxysporum*'un hücre duvarlarını karbon kaynağı olarak kullanarak kitinaz enzimi ürettiğini bulmuşlardır. *P. corrugata*'nın amilaz, sellülaz ve proteaz aktivite göstermediğini belirlemişlerdir.

Araştırmada, B8, B17, B26, N14, D5, D8, D9, D11, BA2, B1, B16 ve BA15 izolatlarının sellülaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 4.15.'de *Pseudomonas* N14, M2, B22 ve B5 izolatlarının sellülaz aktivitesi verilmiştir.



Şekil 4.15. *Pseudomonas* N14, M2, B22 ve B5 izolatlarının selülag aktivitesi

Şekil 4.15.'de N14 izolatında görülen açık zon, izolatın selülag aktivitesi gösterdiğini, M2, B5 ve B22 izolatlarında açık zon oluşumu görülmediğinden selülag aktivitesine sahip olmadıklarını göstermektedir.

Fluorescent *Pseudomonas* spp.'nin çeşitli tarım ürünlerinin rizosfer bölgelerinde bol miktarda bulunduğu Sindhu ve Dadarwal (2001) tarafından bildirilmiştir. Fluorescent *Pseudomonas* spp. bakterilerinin kitinolitik aktivite ve selülotik aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir (Lim ve ark., 1991; Nielson ve ark., 1998). Kitin, fitopatojenik fungusların hücre duvarında bulunmaktadır. Kitinolitik bakterilerin, antifungal özelliklerinin kitinaz β -1-3-glukanaz ve proteaz gibi litik enzimlerle beraber etkili olduğu yapılan çalışmada tespit edilmiştir (Boer ve ark., 1998).

İzolatlarımızın kitinaz aktiviteyi Şekil 4.15. ve 4.16.'da verilmiştir.



Şekil 4.16. *Pseudomonas* B16, B1, B5 ve B8 izolatlarının kitinaz aktivitesi

Şekil 4.16.'da B16 izolatının koloni etrafında görülen açık renkli zon, B16'nın kitinaz aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. B8, B5 ve B1 izolatlarının kolonilerinin etrafında oluşmayan zon ise kitinaz aktivitesinin olmadığını göstermektedir. Nagraj Kumar ve ark., (2004) ve Viswanathan ve Samiyappan (2001) siderefor, oksin gibi bitki gelişimini teşvik eden hormonların, biyoaktif metabolitlerin, glukanaz, kitinaz, lipaz ve proteaz gibi hidrolitik enzimlerin *Pseudomonas* spp. tarafından üretildiğini rapor etmişlerdir. Araştırmada saptanan izolatlar çeşitli hidrolitik enzimleri üretmişlerdir. *Pseudomonas* M2, N11, N13 ve N14 izolatlarının kitinaz aktivitesi Şekil 4.17.'de verilmiştir.



Şekil 4.17. *Pseudomonas* M2, N11, N13 ve N14 izolatlarının kitinaz aktivitesi

M2 izolatının kolonisi etrafında görülen açık zon oluşumu kitinaz aktiviteye sahip olduğunu göstermekle birlikte, kitin içeren agar ortamında N14, N13 ve N11 izolatlarının kolonileri etrafında açık zon oluşumu belirlenmemiştir.

İzolatlardan B16'nın %83.3 ile *Fusarium chlamyosporum*'a, B17'nin *Alternaria alternata*'ya BA2, M2 ve B16 izolatlarının *Fusarium chlamyosporum*'a karşı en yüksek antagonistik aktivite göstermesinin kitinaz aktivitesine sahip olmalarından kaynaklandığı düşünülebilir. BA2 ve B26 izolatının *Drechslera sorakiana*'ya karşı yüksek antagonistik aktivitesi de kitinaz aktivitesinden kaynaklanabilir. Kitinaz aktivitesine sahip olan izolatların, patojen fungus hücre duvarlarını karbon kaynağı olarak kullandıkları bilinmektedir (Whipps, 2001). B26 izolatında yüksek antagonistik aktivite göstermesi *Drechslera sorakiana*'nın hücre duvarını sahip olduğu kitinaz enzimiyle parçalayabileceği ve patojenin hücre duvarını tek karbon kaynağı olarak kullanabileceği düşünülebilir.

İzolatlardan B16, B17, B26, N14, M2, BA2, BA15 ve D11'in kitinaz aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.13). Gaffney ve ark. (1994), yaptıkları çalışmada *P. fluorescens* tarafından kitinaz ve siyanid, pirolnitritin gibi antifungal bileşikler üretilerek *Rhizoctonia solani*'yi kontrol altına alındığını bildirmişlerdir.

Pseudomonas bakterilerince anaerobik koşullarda arjinin dehidrolaz enziminin üretildiği bilinmektedir. Arjinin dehidrolaz ile arjinin amine dönüşmektedir (Jayaswal ve ark., 1990).

İzolatlardan, B1, B5, B8, B22, B16, BA2, N13 N14, M4, D1, D11 Arjinin dehidrolaz üretilmiş, diğer izolatlar ise negatif sonuç vermiştir. Yapılan çeşitli araştırmalarda arjinin dehidrolaz aktivitesinin *Pseudomonas* spp. bakterilerinin tanımlanmasında önemli olduğu, arjinin dehidrolaz aktivitesinin *Pseudomonas* spp. türleri arasında değişiklik gösterdiği gibi aynı türün izolatları arasında da değişiklik gösterdiği bildirilmiştir Egamberdieva ve ark., 2008; Guo ve ark., 2007; Holt ve ark., 1994).

Üre, toprakta üreaz enzimiyle kolayca hidrolize olurlar. Topraklara verilen gübre olarak üre çeşitli yollarla hidroliz olarak amonyak ve karbondioksite dönüştürülmektedir (Cook ve Baker, 1983). Toprakta üreyi hidroliz eden mikroorganizmalardan biride *Pseudomonas* spp. bakterileri olup, ürenin amonyağa dönüşmesini sağladıkları bildirilmiştir (Cook ve Baker, 1983). Çalışmamızda izolatlardan B5, B22, D1, D5, D8, N14’de üreaz aktivitesi belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Şekil 4.18.’de *Pseudomonas* D5 üreaz aktivitesinin kontrol grubuyla birlikte görünümü verilmiştir.



Şekil 4.18. *Pseudomonas* D5 üreaz aktivitesinin kontrol grubuyla birlikte görünümü

D5 izolatının sağda görülen kontrol grubundaki gibi sarı renkli besiyerini pembe-mor renge dönüştürmesi üreaz aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Ortadaki tüpte ise üre eklenmeyen besiyerinde, gelişen kontrolde D5 izolatı, besiyeri rengini değiştirmemiştir.

Egamberdieva (2005) arjinin dehidrolaz, selülaz ve üreaz aktivitelerinde *P. denitrificans*'in negatif, *P. rathonis*'in ise pozitif sonuç verdiğini rapor etmiştir.

Jayaswal ve ark. (1990) ise yaptıkları çalışmada; *Pseudomonas* RJ2 izolatının arjinin dehidrolaz ve üreaz aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

5.KAYNAKLAR

- AHMAD, F., AHMAD, I., KHAN, M, S, 2008. Screening of Free-Living Rhizospheric Bacteria for Their Multiple Plant Growth-promoting Activities. *Microbial Araes.*, 163:173-181.
- ANDRADE, O. A., MATHRE, D. E., SANDS, D. C., 1994. Suppression *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in Montana Soils and its Transferability between Soils. *Soil Biol. and Biochem.*, 26: 397-402.
- AVIS, T. J., GRAVEL, V., ANTOUN, H., TWEDDELL, R. J., 2008. Multifaceted Beneficial Effects of Rhizosphere Microorganisms on Plant Health and Productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1733-1740.
- BANGERA , M. G., THOMASHOW, L. S., 1996. Characterization of a Genomic locus Required for Synthesis of the Antibiotic 2.4-Diacetylphloroglucinol by the Biological Control Agent *Pseudomonas fluorescens* 02-87 *Moleculer Plant Microbe Interec.*, 9: 83-90.
- BERGSMA-VLAMI, M., PRINS, M. E., and RAAIJMAKERS, J. M., 2005. Influence of Plant Species on Population Dynamics, Genotypic Diversity and Antibiotic Production in the Rhizosphere by Indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52: 59-69.
- BORA, T., ÖZAKTAN, H., 1998. Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş. E. Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- CAPPUCCINO, J. C., SHERMAN, N., 1992. In *Microbiology: A Laboratory Manual* Third Ed. Benjamin/ Cummings Pub. Co., New York, pp. 125-179.
- CHEN, C., BELANGER, R. R., BENHAMOU N. & PAULLITZ, T. C., 2000. Defence Enzymes Induced in Cucumber Roots by Treatment with Plant-Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56, 13-23.
- CHERNIN, L., ISMAILOV, Z., HARAN, S., CHET, I., 1995. Chitinolythic *Enterobacter agglomerans* Antagonistic to Fungal Plant Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1720- 1726.
- COOK, R. J., BAKER, K. F., 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens.* St Paul, MN: APS Press. P 539.
- COSTA, R., GOMES, N. C. M., PEIXOTO, R. S., RUMJANEK, N., BERG, G., MENDONCA-HAGLER, L. C. S., SMALLA, K., 2006. Diversity and Antagonistic Potential of *Pseudomonas* spp. Associated to the Rhizosphere of Maize Grown in a Subtropical Organic Form. *Soil Biol. Biochem.* 38: 2434, 2447.
- COSTA, R., GOTZ, M., MROTZEK, N., LOTTMANN, J., BERG, G., SMALLA, K., 2006. Effects of Site and Plant Species on Rhizosphere Community Structure as Revealed by Molecular Analysis of Microbial Guilds. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 236-249.
- DE BOER, W., GUNNEWIEK, J. A. K., LAFEBER, P., JANSE, J. D., SPIT, B. E., WOLDENDROP, J. W., 1998. Anti-Fungal Properties of Chitinolytic dune Soil Bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 30: 193-203.

- DELEN, N., TOSUN, N., 1997. Türkiye’de Pestisit Kullanımının Toksikolojik Değerlendirilmesi, II. Ulusal Toksikoloji Kongresi., (3-6 Nisan, 1997 Antalya).
- DEMİRBAĞ, Z., DEMİR, İ., 2005. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kitabı. İkinci Baskı. Trabzon.
- DE SOUZA, J. T., WELLER, D. M., RAAIJMAKER, J. M., 2003. Frequency, Diversity, and Activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-Producing Fluorescent *Pseudomonas* spp. in Dutch take-all decline soils. *Phytopathology* 93: 54-63.
- DOWLING, D. N., O’ GORA, F., 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol* 12: 133-144.
- DUNNE, C., DELANY, I., FENTO, A., O’GARA, F.I 1996. Mechanisms Involved in Biocontrol by Microbial Inoculants. *Agronomie.*, 16: 721-729.
- EGAMBERDIEVA, D., 2005. Plant- Growth- Promoting Rhizobacteria Isolated from a Calcisol in a Semi-Arid Region of Uzbekistan: Biochemical Characterization and Effectiveness. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168: 94- 99.
- EGAMBERDIEVA, D., KAMILOVA, F., VALIDOV, S., GAFUROVA, L., KUCCHAROVA, Z., LUGTENBERG, B., (2008). High Incidence of Plant Growth-Stimulating Bacteria Associated with the Rhizosphere of Wheat Grown on Salinated Soil in Uzbekistan. *Environmental microbial.*, 10:1-9.
- ELAD, Y., BAKER, R., 1985. Influence of Trace Amounts of Cations and Siderophore Producing *Pseudomonads* on Chlamyospore Germination of *F. oxysporum* *Phytopathol.*, 75:1047-1052.
- FRAVEL, D. R., 1988. Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 75-91.
- FRAVEL, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 43: 337-359.
- GAFFNEY, T. D., LAM, S. T., LIGON, J., GATES, K., FRAZELLE, A., DI MAIO, J., HILL, S., GOODWIN, S., TORKEZITZ, N., ALLSHOUSE, A. M., KEMPH, H. J., and BECKER, J. O., 1994. Global Regulation of Expression of Antifungal Factors by a *Pseudomonas fluorescens* Biological Control strain. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 455-463.
- GARDNER, J. M., CHANDLER, J. L., FELDMAN, A. W., 1984. Growth Promotion and Inhibition by Antibiotic Producing Fluorescent *Pseudomonads* Citrus Roots. *Plant Soil.* 77: 103-113.
- GLICK, B. R., 1995. The Enhancement of Plant Growth by Free Living Bacteria. *Can J. Microbiol.* 41: 109-114.
- GUO, J. H., QI, H. Y., GUO, Y. H., GE, H. L., GONG, L.Y., ZNANG, L. X., SUN, P. H., 2004. Biocontrol of Tomato Wilt by Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Biological Control.* 29: 66-72.
- GUO, X. W., FERNANDO, W. G. D., ENTZ, M., 2005. Effects of crop rotation and tillage on blackleg disease of canola. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 53-57.
- GUO, Y., ZHENG H., YANG, Y., WANG, H., 2007. Characterization of *Pseudomonas corrugata* strain P34 Isolated from Soil in Beijing as a Potential Biocontrol Agent. 55: 247-253.
- GURGUN, V., HALKMAN, K., 1990. Mikrobiyoloji’de Sayım Yöntemleri Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 7, Ankara s. 146.

- HAAS, D., KEEL, C., LAVILLE, J., MAURHOFFER, M., OBERHANSLI, T., SCHNIDER, U., VOISARD, C., WUTHRICH, B., AND DEFAGO, G., 1991. Secondary Metabolites of *Pseudomonas fluorescens* Strain CHA0 Involved in the Suppression of Root Diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 450-456.
- HASS, D. and DEFAGO, G., 2005. Biological Control of Soil-Borne Pathogens by Fluorescent Pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307–319.
- HAFEEZ, F.Y., YASMIN, S., ARIANI, D., RAHMAN, M., ZAFAR, Y., MALIK, K.A., 2006. Plant Growth-Promoting Bacteria as Biofertilizer. *Argon. Sustain. Dev.*, 26:143-150.
- HARIPRASAD, P., and NIJANJANA, S.R., 2008. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Rhizobacteria to Improve Plant Health of Tomato Plant Soil.
- HOLT, G. J., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T., 1994. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. ninth ed. The Williams and Wilkins Pub., M. D., USA.
- HOMMA, Y., S., HIRAYAMA, Z., KONNO, F., SHIRAHAMA, H., SUZUKI, T., 1989. Production of Antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an Agent for Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens. *Soil Biol. Biochem.*, 21: 723-728.
- HOWELL C. R., STIPONOVIC, R. D., 1980. Suppression of *Pythium ultimum* Induced Damping off of Cotton Seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its Antibiotics. *Phytopathol.*, 70: 712-715.
- JAYASWAL, R. K., FERNANDEZ, M. S., SCHROEDER III R.G., 1990. Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* Strain that Restricts Growth of Various Phytopathogenic Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1053–1058.
- JAYASWAL, R.K., FERNANDEZ, M., UPADHYAY, R.S., VISIHTIN, L., KURZ, M., WEBB, J., RINEHART, K., (1993). Antagonism of *Pseudomonas cepacia* against Phytopathogenic Fungi. *Curr. Microbiol.*, 26: 17-22.
- JI, P., WILSON, M., 2002. Assessment of the Importance of Similarity in Carbon Source Utilization Profiles between the Biological Control Agent and the Pathogen in Biological Control of Bacterial Speck of Tomato. *Appl. And Environ. Microbiol.* 68, 4383 - 4389.
- KACAR, B., 2009. *Toprak Analizleri*, Nobel Yayın Dağıtım Ltd. Şti., Ankara, 2. Basım, 467 sayfa.
- KEEL, C., SCHNIDER, U., MAURHOFFER, M., VOISARD, C., LAVILLE, J., BURGER, P., WIRTHNER, P., HASS, D., DEFAGO, G., 1992. Suppression of Root Diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the Secondary Metabolite 2, 4- Diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 4-13.
- KEEL, C., DEFAGO, C., 1997. Interactions between Beneficial Soil Bacteria and Root Pathogens: Mechanisms and Ecological Impact. In *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. Edited by Gance, A. C., Brown, V. K., London: Blackwell Science: 27-46.
- KIM, K. Y., JORDAN, D., and McDonald, G. A., 1998. *Enterobacter agglomerans*, Phosphate Solubilizing Bacteria, and Microbial Activity in Soil: Effect of Carbon Sources. *Soil Biology and Biochemistry.* 30: 995-1003.

- KISHORE, G. K., PANDE, S., RAO, J. N., and PODILE, A.R., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* Inhibits the Plant Cell Wall Degrading Enzymes of *Sclerotium rolfsii* and Reduces the Severity of Groundnut Stem Rot. European Journal of Plant Pathology.
- KLEIN GUNNEWIEK, P. J. A., LAFEBER, P., JANSE, J. D., DE BOER, W., SPIT, B. E., WOLDENDORP, J. W., 1998. Antifungal Properties of Chitinolytic due Soil Bacteria. Soil Biol. Biochem. 30(2), 193- 203.
- KLOEPPER, J. W., HUME, D. J., SCHER, F. M., SINGLETON, C., TIPPING, B., LALIBERTE, M., FRAULEY, K., KUTCHAW, T., SIMONSON, C., LIFSHITZ, R., ZALESKA I. And LEE, L., 1988. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Kanola (rapeseed). Plant Dis. 72: 42–46.
- KLOEPPER, J. W., J. LEONG, M. TEINTZE, AND N. M. SCHROTH. 1980. Enhanced Plant Growth by Siderophores Produced by Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Nature (London) 286:885-886.
- KLOEPPER, J. W., LIFSHITS, R., ZABLOTOWICHZ, R. M., 1989. Free-Living Bacterial Inocula for Enhancing Crop Productivity. *Trends Biotechnol.* 7, 39-43.
- KLOEPPER, J.W., 1991. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Biological Control Agents of Soil Borne Disease. in: E.C. Tjamos, G. C. Papavizas And R.J. Cook (Eds), The Biological Control of Plant Diseases – Progress and Challenges for The Future. Nato Ası Series. 230plenum Press, New York. pp. 142–152.
- KLOEPPER, J.W., LIFSHITZ, R., ZABLOTOWICZ, R.M., (1999). Free-Living Bacterial Inocula for Enhancing Crop Productivity. *Trends Biotechnol.*, 7:39-43.
- KUCHAROVA, Z., LUGTENBERG, B., 2008. High Indicence of Plant Growth-Stimulating Bacteria Associated with the Rhizosphere Of Wheat Grown on Salinated Soil in Uzbekistan. *Environmental Microbial.*, 10:1-9.
- LEONG, J., 1986. Siderophores: Their Biochemistry and Possible Role in the Biocontrol of Plant Pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 24:187–209.
- LIM, H., KIM, Y., and KIM, S., 1991. *Pseudomonas stutzeri* YLP-1 Genetic transformation and antifungal mechanism aganist *Fusarium solani*, an agent of plant root rot . *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 510-516.
- LINDBERG, T., GRANHALL, U., 1984. Isolation and Characterization of Dihydrogen-Fixing Bacteria from The Rhizosphere of Temperate Cereals and Forage Grasses. *Appl. Environ. Microbial.*, 48: 683-689.
- LOUWS, F.S., WILSON, M., CAMPBELL, H.L., CUPPELS, D.A., JONES, J., SHOEMAKER, P. B., SAHIN, F. MILLER, S. A., 2001. Field Control of Bacterial Spot and Bacterial Speck of Tomato using a Plant Activator. *Plant Dis.* 85:1-12.
- LUGTENBERG, B.J.J., DEKKERS L, BLOEMBERG, G. V., 2001. Molecular Determinants of Rhizosphere Colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 461–490
- LUGTENBERG, B.J.J., KRAVCHENKO, L.V., SIMONS, M., 1999. Tomato Seed and Root Exudate Sugars, Composition, Utilization by *Pseudomonas* Biocontrol Strains and Role in Rhizosphere Colonization. *Environ. Microbial.*, 1: 439-446.

- MULETA, D., ASSEFA, F., GARNHALL, U., 2007. *In vitro* Antagonism of Rhizobacteria Isolated from *Coffea arabica* L. Against Emerging Fungal Coffee Pathogens. Eng. Life Sci. 7(6), 577-586.
- NAGRAJKUMAR, M., BHASASKARAN, R., VELAZHAHAN, R., 2004. Involvement of Secondary Metabolites and Extracellular Lytic Enzymes Produced by *Pseudomonas fluorescens* in Inhibition of *Rhizoctonia solani*, the Rice Sheath Blight Pathogen. Microbiol. Res., 159:73-81.
- NIELSEN, P., SORENSEN, J., 1997. Multi Target and Medium-Independent Fungal Antagonisms by Hydrolytic Enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* Strains from Barley Rhizosphere. FEMS Microbiol Ecol., 22:183-192.
- NIKAIDO, H., 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. Science, 264, 382-388.
- OEDJIJONO, LINE MA, DRAGER, C., 1993. Isolation of Bacteria Antagonistic to a Range of Plant Pathogenic Fungi. Soil Biol Biochem 25:247-250.
- OZTURK, A., CAGLAR, O., SAHIN, F., 2003. Yield Response of Wheat and Barley to Inoculation of Plant Growth Promoting Rhizobacteria at Various Levels of Nitrogen Fertilization. Plant Nutr. Soil Sci., 166:1-5.
- PANDEY, A., PALNI, L. M. S., HEBBAR, K.P., 2001. Suppression of Damping-off in Maize Seedlings by *Pseudomonas corrugata*. Microbiol. Res. 156: 191-194.
- PICARD, C., DI CELLO, F., VENTURA, M., FANI, R., GUCKERT, A., 2000. Frequency and Biodiversity of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Bacteria Isolated from the Maize Rhizosphere at Different Stages of Plant Growth. Applied and Environmental Microbiology 66, 948-955.
- PIKOVSKAYA R. I., 1948. Mobilization of Phosphorus in Soil in Connection with Vital Activity of some Microbial Species. Microbiologia 17: 363-370.
- PODILE, A. R., KISHORE, K., 2006. Plant Growth- Promoting Rhizobacteria. Plant Associated Bacteria, 195-230.
- RAAIJMAKERS, S., WELLER, D. M., and THOMASHOW, L. S., 1997. Frequency of Antibiotic-Producing *Pseudomonas* spp. in Natural Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 881-887.
- RAAIJMAKER, J. M., and WELLER, D. M., 2001. Exploiting Genotypic Diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas* spp. Characterization of Superior Root-Colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2545-2554.
- SAYGILI, H., ŞAHİN, F., AYCAN, Y., 2006. Fitobakteriyoloji, 523 sayfa.
- SIDDIQUI, S., SIDDIQUI, Z. A., and AHMAD, I., 2005. Evaluation of Fluorescent *Pseudomonads* and *Bacillus* isolates for the Biocontrol of a Wilt Disease Complex of Pigeonpea. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21: 729-732.
- SIDDIQUI, Z. A., BAGHEL, G., AKHTAR, M. S., 2007. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Rhizobium* and Plant Growth-promoting Rhizobacteria on Lentil. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 435-441.
- SINDHU, S. S., GUPTA, S.K, DADARWAL, K.R., 1999. Antagonistic Effect of *Pseudomonas* spp. on Pathogenic Fungi and Enhancement of Growth of Green Gram (*Vigna radiata*). 29: 62-68.

- SMILANICK, J. L., DENIS-ARRUE, R., BOSCH, J. R., GONZALES, A.R., HENSON, D., and JANISIEWICZ, W. J., 1993. Control of Postharvest Brown Rot of Nectarines and Peaches by *Pseudomonas* Species. *Crop Protection* 12, 513-520.
- SNEH, B., DUPLER M., ELAD, Y. and BAKER, R., 1984. Chlamyospore Germination of *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucurmerinum* as Affected by Fluorescent and Lytic Bacteria from *Fusarium* suppressive soils. *Phytopatology* 74, 1115-1124.
- THOMASHOW L. S., WELLER D. M. 1995. Current Concepts in the use of Introduced Bacteria for Biological Control: Mechanisms and Anti fungal Metabolites. in: Stacey G, Keen N, Editors. *Plant Microbe Interactions*, Vol. 1. New York: Chapman And Hall. Pp 187 – 235.
- THOMASHOW L. S., WELLER D. M. 1988. Role of a Phenazine Antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in Biological Control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* 170:3499–508.
- THOMASHOW, L. S., 1996. Biological Control of Plant Root Pathogens. *Curr. Opin. Biotechnol* 7: 343-347.
- THOMASHOW, L. S., WELLER, D. M., BONSALE, R. F., AND PIERSON, L. S. 1990. Production of the Antibiotic Phenazine-1-Carboxylic Acid by Fluorescent *Pseudomonas* Species in the Rhizosphere of Wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:908-912.
- TRIVEDI, P., PANDEY, A., PALNI, L. M. S., 2006. *In vitro* Evaluation of Antagonistic Properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research*. 163: 329-336.
- VESSEY, J. K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.*, 225:571-586.
- VISWANATHAN, R., SAMIYAPPAN, R., 2001. Antifungal Activity of Chitinases Produced by some Fluorescent Pseudomonads against *Colletotrichum falcatum* Went. causing Red Rot Disease in Sugarcane. *Microbiological Research* 155, 309-314.
- VIVEKANANTHAN, R., RAVI, M., RAMANANTHAN, A., SAMIYAPPAN, R., 2004. Lytic Enzymes Induced by *Pseudomonas* Fluorescens and other Biocontrol Organisms Mediate Defence against the Anthracnose Pathogen in Mango. *World J. of Microbial. Biotchnol.*, 20:235-244.
- VOISARD, C., KEEL, C., HAAS, D., & DEFAGO, G., 1989. Cyanide Production by *Pseudomonas fluorescens* Helps Suppress Black Root Rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO Journal*, 8: 351-358.
- WALSH, U. F., MORISSEY, J. P., & O'GARA, F., 2001. *Pseudomonas* for Biological Control of Phytopathogens; from Functional Genomics to Commercial Exploitation. *Current opinion in Biotechnology* 12: 289-295.
- WELLER D. M., and COOK, R. J., 1983. Suppression of Take-all of Wheat by Seed Treatments with Fluorescent Pseudomonads. *Phytopathol.* 26: 379-407.
- WELLER D. M., 1988. Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 26:379–407.
- WELLER, D. M., THOMASHOW, L. S., 1990. Antibiotics: evidence for their production and sites where they are produced, pp. 703-711 in R. Baker, P. Dunn (Eds): *New Directions in Biological Control*. A.R. Liss, New York.

- WHIPPS, J. M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp.Bot.* 52: 487–511.
- WILLIAMS, S. T., and VICKERS, J. C. 1986. The ecology of antibiotic production. *Microbiol. Ecol.* 12: 43-52.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Şanlıurfa'da doğdum. İlköğretimine Vatan ilkokulunda başladım. Ortaokul öğrenimini Merkez ortaokulunda tamamladıktan sonra, 2002 yılında Şanlıurfa Ç.E.A.Ş. Anadolu Lisesinden mezun oldum. 2007 yılında Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim dalına kaydoldum. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalında 2008 yılında başlayan yüksek lisans öğrenimimi, 2009-2010 yılları arasında yapmış olduğum tez çalışmasının sona ermesi ile tamamlamış bulunmaktayım.

EKLER

EK 1.

. Kullanılan Mikroorganizmaların Gelişimi için Besiyerleri

1. King's B Ortamı (KB)

Pepton	20 gr
KH ₂ PO ₄	1.5 gr
MgSO ₄	1.5 gr
Agar	15 gr
Gliserol	10 ml
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile $7\pm 0,2$ 'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

2. Pigment Üretim Ortamı

Pepton	20 gr
Gliserol	20 gr
NaCl	5 gr
KNO ₃	1 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile $7\pm 0,2$ 'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3. Gliserin Pepton Agar (GPA)

Pepton	10 gr
KH ₂ PO ₄	0.1 gr
NaCl	5 gr
Agar	15 gr
Gliserol	10 ml
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile 7±0,2'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

4. *Pseudomonas* izolasyon agar (PIA)

Pepton	20 gr
MgCl ²	1.4gr
Potasyum sülfat	10 gr
Agar	13.6 gr
Gliserol	20 ml
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile 7±0,2'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

5. *Pseudomonas* agar (PA)

Pepton	20 gr
KH ₂ PO ₄	1.5 gr
MgSO ₄	1.5 gr
Agar	12gr
Gliserol	10 ml
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile $7\pm 0,2$ 'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Steril edilen ortama 0.013 g/l kloromfenikol filtreden geçirilerek eklenmiştir.

6. Trypticase soy agar (TSA)

Pepton	20 gr
NaCl	5 gr
Agar	15 gr
Kristal viyole	0.0002 gr
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözülerek pH 7'ye ayarlanmıştır. Ortam 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak kullanılmıştır.

7. Patates Dekstroz agar (MERCK)

Patates infusion	4 gr
D(+) glikoz	20 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

Patates Dekstroz agar ortamı, 39g/l olacak şekilde hazırlanmıştır. 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

EK 2.

Kullanılan Mikroorganizmaların Gelişme Ortamı

Nutrient Broth (Fluka)

Et extract	3 gr
Pepton	5 gr
Distile su	1000 ml

Nutrient Broth 13 g/l olacak şekilde distile suda eritilmiştir. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra kullanılmıştır.

EK 3.

Kullanılan Çözeltiler

2. İyot (Lugol) çözeltisi

İyot	1 gr
Potasyum iyodür (KI)	2 gr
Sodyum bikarbonat (%5'lik)	60 ml
Distile su	250 ml

İyot ve potasyum iyodür 5 ml dH₂O'da çözülmüş, karışıma 250 ml dH₂O ve 60 ml %5'lik sodyum bikarbonat ilave edilip hazırlanmıştır.

3. Kristal viyole

2 g kristal viyole 10 ml etil alkol (%95) içinde çözülmüştür. 0.8 g amonyum okzalit 80 ml saf suda çözülmüş ve bu iki çözelti birbiri ile karıştırılmıştır.

4. Safranin çözeltisi

0.25 g safranin 10 ml %95'lik etil alkolde çözülerek saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

5. 1M NaOH

NaOH	40 gr
Distile su	1000 ml

6. 1M HCl

HCl	36.5 gr
Distile su	1000 ml

7. %85 'lik NaCl çözeltisi

NaCl	85 gr
Distile su	100 ml

İçerik karıştırılmıştır.

8. %3'lük H₂O₂

H ₂ O ₂	3 ml
Distile su	97 ml

İçerik karıştırılmıştır.

9. %30 'luk Gliserol

Gliserol	30 ml
Distile su	70 ml

İçerik karıştırılmış, 121 °C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

10. Peptonlu Çözelti

Distile su	20 ml
Pepton	2 gr

Pepton distile suda çözülmüş ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

EK 4.

İzolatların Farklı Sıcaklık ve Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Kullanılan Ortam

King's B broth

Pepton	20 gr
KH ₂ PO ₄	1.5 gr
MgSO ₄	1.5 gr
Gliserol	10 ml
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile $7\pm 0,2$ 'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

EK 5

Kullanılan levan üretim ortamı

Levan testi

Sukroz	23 gr
Et ekstrakt	5 gr
Distile su	1000 ml
Nutrient agar	28 g

İçerik karıştırılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

EK 6

Karbonhidrat Testi için Kullanılan Ortam

Mineral Tuz Ortamı

NH ₄ H ₂ PO ₄	1 gr
KCl	0.2 gr
MgSO ₄	0.2 gr
Agar	12 gr
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile 7±0,2'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Maltoz, mannitol, triptofan, fruktoz, ksiloz, m-inositol, glikoz ayrı ayrı % 0.1(w/v) olacak şekilde 0.45µm'lik disposable filtreden geçirilerek ortama ayrı ayrı ilave edilmiştir.

EK 7

Sitrat Testi için Kullanılan Ortam

Simmans agar

Sodyum sitrat	2 gr
KH ₂ PO ₄	1 gr
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 gr
MgSO ₄	0.2 gr
Bromtimol mavisi	0.08
NaCl	5 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile $7\pm 0,2$ 'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

EK 8

Enzimatik aktivite için kullanılan besiyerleri

1. Sierra's ortamı

Pepton	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂	0.1 g
Agar	17 g
Distile su	1000 ml
Tween 80	10 g

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile $7\pm 0,2$ 'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

2. Pikovskaya Ortamı

Sukroz	10 gr
Ca(PO ₄) ₂	5 gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 gr
KCl	0.2 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 gr
Mn SO ₄ . 7H ₂ O	0.001 gr
Fe SO ₄ . 7H ₂ O	0.001 gr
Yeast ekstrakt	0.5 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile $7\pm 0,2$ 'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3. Kitin agar

Et ekstrakt	3 g
Pepton	5 g
NaCl	0.5 g
Na ₂ HPO ₄	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
NH ₄ Cl	0.1 g
Kitin	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile 7±0,2'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

4. Nutrient Agar (Fluka)

Pepton	5 gr
Et ekstrakt	3 gr
Agar	12 gr
Distile su	1000 ml

Nutrient agar besisi ortamı, 28 g/l olacak şekilde hazırlanmıştır. 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

5. Nişasta agar

Pepton	5 gr
Et ekstrakt	3 gr
Agar	12 gr
Nişasta	20 gr
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile $7\pm 0,2$ 'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

6. Sellüloz ortamı

Solusyon A:

NaCl	0.25 gr
K ₂ HPO ₄	1.5 gr
Karboksimetilselüloz	2.5 gr
Distile su	400 ml

Solüsyon B:

MgSO ₄ .7H ₂ O	1M
--------------------------------------	----

Solusyon C:

Na ₂ HPO ₄	3 gr
NH ₄ Cl	0.5 gr
Gliserol	2.5 gr
Yeast Ekstraktı	0.5 gr
Agar	6.5 gr
Distile su	100 ml

Solusyon D:

CaCl ₂	% 7.5 (V/W)
-------------------	-------------

Solusyonlar ayrı ayrı 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. B+D solusyonları karıştırılmış ve bu karışımdan 1'er ml alınıp A ve B solusyon karışımına eklenerek ortam hazırlanmıştır.

7. Dye's Ortamı

NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5 gr
K ₂ HPO ₄	0.5 gr
MgSO ₄	0.2 gr
NaCl	0.5 gr
Yeast Ekstraktı	1 gr
Krezol kırmızısı	0.016 gr
Distile su	800 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile 7±0,2'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. %10'luk üre filtreden geçirilerek steril edilmiş ve ortama eklenmiştir.

8. Jelatin Agar

Pepton	5 gr
Et ekstrakt	3 gr
Agar	12 gr
Jelatin	10 gr
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile 7±0,2'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

9. Thornley ortamı

Pepton	1 gr
NaCl	5 gr
K ₂ HPO ₄	0.3 gr
Fenol red	0.01 gr
L-arginin HCl	10 gr
Agar	3 gr
Distile su	1000 ml

Hazırlanan ortamın pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl ile 7,2'e ayarlanmıştır. Besi ortamı, 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

ÖZET

Bu çalışmada, Şanlıurfa ve çevresinden farklı rizosfer toprak örneklerinden *Pseudomonas* spp. izolatları izole edilmiştir. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik özellikleri ve bitki patojenlerine karşı antagonistik aktiviteleri araştırılmıştır.

Toprak kökenli fungal bitki patojenlerinden *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium accuminatum*, *F. chlamyosporum*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternata*, *Drechslera sorokiniana*, *Ascochyta rabiei*'ye karşı izolatların antagonistik aktiviteleri *in vitro* koşullarda test edilmiştir. Yapılan istatistik analizlerde izolatlar arasında %1 düzeyinde farklılık belirlenmiştir. Tek bir patojene etkili olan izolat bulunmamasına rağmen, izolatların tümünün en fazla *Drechslera sorokiniana*'nın gelişimini inhibe ettikleri istatistik analiziyle tespit edilmiştir. Patojenlere karşı en yüksek değer B1, B5, BA2, M4, N11 ve N12 izolatlarında belirlenmiştir.

Etkili bulunan 18 izolatın üreaz, sellülaz, amilaz, jeletinaz, fosfataz, lipaz, kitinaz, proteaz gibi hidrolitik enzim üretimleri değerlendirilmiştir. B5, B22, N14, D1, D5, D8 ve BA2 izolatlarının üreaz ürettikleri, B1, B5, B8, B16, B17, B26, N14, D5, D8, D9, D11, BA2, BA15 izolatlarının sellülaz ürettikleri, B17, N13 ve BA2, izolatlarının amilaz ürettikleri, D5, D11 izolatlarının fosfataz ürettikleri, tüm izolatların jelatini hidroliz etmediği, B16, B17, B26, D11, M2, BA2 ve BA15 izolatların kitinaz ürettikleri, B17, N14, D8, D11 ve BA2'nin proteaz ürettikleri saptanmıştır.

SUMMARY

In this study, *Pseudomonas* spp. isolates from different rhizosphere soil samples in Şanlıurfa region were isolated. Moreover morphological, physiological features and antagonistic activities of these isolates against different plant pathogenic were investigated.

The antagonistic activity of the isolates were tested *in vitro* conditions against *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium accuminatum*, *F. chlamyosporum*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternata*, *Drechslera sorokiniana*, *Ascochyta rabiei*. In conducted statistics analyzes, among bacteria were determined differences in 1% level. It was determined with statistic analysis that all of the isolates. *Pseudomonas* B1, B5, BA2, M4, N11 and N12 isolates showed wide range of inhibitory effect more than one plant pathogen.

The hydrolytic enzyme productions such as urease, cellulase, amylase, gelatinase, phosphatase, lipase, chitinase and protease were evaluated which is efficient of 18 isolates. Urease production of B5, B22, N14, D1, D5, D8, BA2 isolates, cellulase production of B1, B5, B8, B16, B17, B26, N14, D5, D8, D9, D11, BA2, BA15 isolates, amylase production of B17, N13, BA2 isolates, phosphatase production of D5, D11 isolates, chitinase production of BA2, BA15 isolates and protease production of B17, N14, D8, D11 have been determined.