

## Sebzelerde Sorun Olan Önemli Bitki Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı Vermikomposttan İzole Edilen Mikrobiyomların *in vitro* Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi

Emine Mine SOYLU<sup>1</sup>, Soner SOYLU<sup>2\*</sup>, Merve KARA<sup>3</sup>, Şener KURT<sup>4</sup>

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü 31034 Antakya-HATAY

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0001-5961-0848>, <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0003-1002-8958>, <sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0001-7320-3376>,

<sup>4</sup><https://orcid.org/0000-0003-4545-5968>

✉: soylu@mku.edu.tr

### ÖZET

Bu çalışmada, solucan gübresi olarak bilinen vermikompostlardan elde edilen bakteriyel mikrobiyomların sebzelerde sorun olan önemli yaprak ve toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinden *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cinerea*, *Verticilium dahliae* üzerine olan antagonistik etkinlikleri *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucunda toplam 69 adet aday bakteriyel izolat elde edilmiştir. Elde edilen bakteriyel izolatlar arasında 28 bakteriyel izolat (toplam izolatın %49.12) *in vitro* ikili kültür testlemelerinde fungal etmenlerden *S. sclerotiorum*'un gelişimini %1.72-75.43, *M. phaseolina*'nın gelişimini %1.67-65.83, *B. cinerea* gelişimini %3.44-57.18, *V. dahliae* gelişimini ise %2.28-58.74 gibi değişen oranlarda engellemişlerdir. Antagonist potansiyele sahip bakteriyel izolatların çoğunluğunun *Bacillus* spp.'e ait olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında bazı *Bacillus* spp.'ye ait izolatlar fungal hastalık etmeni *S. sclerotiorum* hifleri üzerinde önemli morfolojik değişikliklere neden olmuştur. Antagonist bakterilerin *in vitro* antagonizm etkinliği, fungus inokulasyonu öncesi ön inkübasyon süresine bağlı olarak artış göstermiştir. *Bacillus* spp. ait izolatlar yüksek antagonistik özelliklerinden dolayı organik ve sürdürülebilir tarımı teşvik etmek için toprak kökenli hastalıklarla mücadelede kimyasallara alternatif etkili biyo-kontrol ajanlar olarak kullanılabilir.

### Araştırma Makalesi

#### Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 05.08.2019

Kabul Tarihi : 07.11.2019

#### Anahtar Kelimeler

Biyolojik mücadele

Antagonist

Toprak kökenli

Fungal hastalıklar

## Determinations of *in vitro* Antagonistic Effects of Microbiomes Isolated from Vermicompost Against Major Plant Fungal Disease Agents of Vegetables

### ABSTRACT

In this study, *in vitro* antagonistic potentials of bacterial microbiomes, obtained from earthworm fertiliser, vermicompost, were investigated on inhibitions of mycelial growth of major foliar and soilborne fungal disease agents *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cinerea*, *Verticilium dahliae*. Total of 69 putative bacterial biocontrol agent (BCA) isolates were obtained from commercial vermicompost lots. Among them, 28 bacterial isolates (49.12% of total isolates) were inhibited mycelial growth of *S. sclerotiorum* by 1.72-75.43%, *M. phaseolina* by 1.67-65.83%, *B. cinerea* by 3.44-57.18%, *V. dahliae* by 2.28-58.74%, respectively. Majorities of bacterial isolates were identified as *Bacillus* spp. Certain isolates of *Bacillus* spp. have caused noticeable morphological changes on mycelia of *S. sclerotiorum*. Antagonistic potentials of bacterial isolates were found to increase by pre-incubation time prior the fungal inoculation. Due to high antagonistic properties, efficient isolates of *Bacillus* spp. may be used as biocontrol agent against soilborne diseases as an alternative to pesticides to promote organic and sustainable agriculture.

### Research Article

#### Article History

Received : 05.08.2019

Accepted : 07.11.2019

#### Keywords

Biological control

Antagonist

Soil-borne

Fungal diseases

## GİRİŞ

Türkiye, dünyada örtü altı ve açık alanda sebze yetiştiriciliği yapılan ülkeler arasında önemli bir yere sahiptir. Türkiye'nin 2018 yılı TUIK verilerine göre 8.206.680 dekar alanda yapılan sebze üretimi sonucu 30.032.827 ton ürün elde edilmiştir (Anonim, 2018). Türkiye'nin bölgelere göre sebze üretim miktarlarına bakıldığında ise Akdeniz Bölgesi 1.587.635 da alanda yapılan 9.460.978 ton sebze üretimi ile Türkiye'nin toplam sebze üretiminin %31.5 gibi büyük bir bölümünü karşılamaktadır (Anonim, 2018). Bu bölge içerisinde Hatay ili, sebze üretimi açısından Antalya, Mersin ve Adana illerinden sonra dördüncü sırada bulunmaktadır (Anonim, 2018).

Bölgemizde ve Türkiye'de sebze üretimini sınırlayan ve önemli ürün kayıplarına neden olan faktörlerden birisi, bitki patojeni fungal hastalık etmenlerinin oluşturduğu hastalıklardır. Örtü altı ve açık alanda yapılan sebze yetiştiriciliği sırasında karşılaşılan toprak patojenlerinden *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Verticillium dahliae* ile hava kökenli *Botrytis cinerea* tüm dünyada ve Türkiye'de sebzelerde solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü ve yanıklık ve kurşuni küf gibi hastalıklara neden olmaktadır. Hastalık etmenleri, bitkinin fide döneminde olduğu kadar ileri dönemlerinde de ortaya çıkmak suretiyle erken enfeksiyonlarda bitki ölümlerine yol açan önemli fungal türlerdir (Yücel, 1994; Kıran ve Ertunç, 1998; Soylu ve Kurt, 2001; Katan, 2017; Koivunen ve ark., 2018).

Bu patojenlerden *S. sclerotiorum*, *V. dahliae* ve *M. phaseolina* toprakta oluşturdukları dayanıklı yapılar olan sklerotlarla toprakta uzun yıllar konukçuları olmaksızın canlı kalabilmektedirler (Punja ve Rahe, 1992; Mihail, 1992; Sneh ve ark., 1997; Katan ve ark., 2012; Malcolm ve ark., 2013; Katan, 2017). Özellikle ılıman iklim bölgelerinde ve inokulumun fazla olduğu örtü altı ve açık alan sebze yetiştiriciliği yapılan alanlarda önemli ürün kayıpları meydana getirebilmektedirler.

Ekonomik olarak ciddi kayıplara neden olan toprak ve hava kökenli fungal hastalıkların mücadelesinde genelde pestisitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Toprak kökenli fungal patojenler, tarım ekosistemlerinin üretkenliğini sınırlayan, dayanıklı veya tolerant çeşit ve sentetik fungusit kullanımı zor etmenlerdir. Çevre dostu fungusitlerin yetersizliği, patojenlerde fungusit dayanıklılığının ortaya çıkışı ve patojen popülasyonlarının konukçu dayanıklılığını kırması (Mc Donald ve Linde, 2002) alternatif mücadele yöntemleri geliştirilme çabalarının altında yatan nedenlerdendir. Dünyada toprak dezenfeksiyonunda en etkili fumigant olarak kullanılan metil bromid'in yasaklanması da alternatif kontrol metodlarının araştırılma ihtiyacını daha da

arttırmıştır (Katan, 1999; Martin, 2003). Hayvan gübresi, yeşil gübre, kompost ve torf (turba) gibi organik materyallerin kullanımı hem geleneksel hem de biyolojik sistemlerde toprak yapısı ve verimliliğinin sağlanmasının yanı sıra bu topraklarda yetişen ürünlerde toprak kökenli patojenlerin neden olduğu hastalıkların görülmesini azaltması açısından önerilmektedir (Gamliel ve Stapleton, 1993; Magid ve ark., 2001; Conklin ve ark., 2002; Cavigelli ve Thien, 2003; Litterick ve ark., 2004; Noble ve Convertry, 2005; Gamliel ve Stapleton, 2012). Bu alanda toprak kalitesini arttıran değişik aerobik kompostların yanı sıra, solucandan elde edilen vermikompost veya vermikest olarak bilinen (solucan dışkısı; gübresi) ürünler çok büyük önem kazanmıştır.

Solucan tarafından işlenen organik atıkların son ürünü olarak ortaya çıkan vermikestin bir ortam veya toprağa karıştırıldığında bu ortamların fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal özelliklerini arttırdığı ve bitki gelişimini uyardığı bilinmektedir (Arancon ve ark., 2004; Atiyeh ve ark., 2000). Farklı bitkisel ve hayvansal orijinlere sahip kompost materyallerinin bitki beslemeye etkisinin yanı sıra özellikle toprak kökenli bitki patojenlerinin gelişimi ve baskılanması üzerine etkinliklere sahip olduklarının belirlenmesi (Hadar, 1991), söz konusu materyallerin organik tarım uygulamalarına yönelik çalışmalarda yoğun olarak kullanılmasına neden olmuştur (Boehm ve ark., 1993). Yapılan çalışmalarda Vermikompost içeriğinin %97'sini bitki tarafından büyüme sırasında doğrudan alınabilir formdaki azot, fosfor ve potasyum gibi önemli bitki besin elementlerinin oluşturduğu bildirilmiştir (Hoitink ve ark., 1997). Büyükbaş hayvan gübresinden üretilen vermikompostların uygulandığı topraklarda *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora nicotiana* var. *nicotianae* ve *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ve *Plasmiodiophora brassicae* gibi bazı toprak kökenli patojenleri bastırdığı bildirilmiştir (Szczech, 1993; Szczech, 1999; Devi ve ark., 2013; Barocio-Ceja ve ark., 2013; Pandya ve ark., 2017). Vermikompostun çimlenme öncesinde, sırasında ve sonrasında sebep oldukları enfeksiyonlar sebebiyle büyük ekonomik kayıplardan sorumlu toprak ve hava kökenli bitki hastalıklarının baskılama kapasitesinin araştırıldığı saksı denemelerinde, *Rhizoctonia*, *Fusarium* (Şimşek-Erşahin, 2007), *Pythium* ve *Verticillium* (Edwards ve Arancon, 2004) gibi toprak kökenli patojenlerin sebep olduğu hastalıkları etkili şekilde kontrol edebildiğini ortaya koymuştur. Vermikompost uygulamasının doğrudan uygulandığı topraklarda hastalık etmenlerinin gelişimini baskıladığı bu çalışmalarda, fungal etmenlerin gelişimlerinin engellenmesinde rol oynayan etki mekanizmaları üzerine yapılmış detaylı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada solucan gübresi olarak bilinen vermikompost'tan farklı türlere ait biyolojik mücadele

etmeni (BCA) bakteri izolatların izolasyonu, teşhisi ve bu izolatların sebzelede geniş konukçu dizilime sahip olan yaprak ve toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinden *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* ve *V. dahliae*'ya karşı antagonistik etkileri *in vitro* koşullarda araştırılmıştır.

## MATERYAL ve METOD

### Fungus ve Vermikompost Materyali

Denemede *Sclerotinia sclerotiorum* izolatu domates bitkisinden (Tübitak 1080304 nolu projeden), *M. phaseolina* izolatu biber bitkisinden (MKÜ BAP 06-M-0202 nolu projeden), *V. dahliae* ve *B. cinerea* izolatları ise patlıcan ve domates bitkilerinden (Tübitak TOGTAG 3104 nolu projeden) elde edilmiştir. Bu izolatlar deneme süresince saf kültür olarak +4°C'de veya uzun süreli olarak -20°C'de saklanmıştır.

Çalışmada kullanılmış olan vermikompost materyali ise Bionat firmasından sağlanmıştır.

### Vermikomposttan Aday Antagonist Bakteriyel İzolatların Elde Edilmesi

Vermikompost'dan aday antagonist bakteri izolatlarının mikrobiyal popülasyonları ve izolasyonları 250 ml'lik erlenler içerisindeki 90 ml steril saf suya 10 g kompost örneğinin ilave edilmesiyle belirlenmiştir. Erlenler 20 dk. süreyle 200 rpm hızla orbital çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra seri halinde seyreltilmiş ( $10^{-1}$  ile  $10^{-9}$ ) süspansiyonlar (200 µl) Nutrient Agar (NA, Merck, Germany), Pseudomonas F Base Agar (KBA, Merck, Germany), Tryptic Soy Bean Agar (TSBA, Merck Germany) besi ortamlara yayılarak 25°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bakterilerin ekimi yapılan petriyeler üzerinde gelişen izolatların koloni morfolojilerine göre ve aday izolatlar ortamda gelişen popülasyonu temsil edecek şekilde rastgele seçilmiş ve daha sonra tek koloniden saflaştırılmıştır. Her bir koloni bir izolat olarak değerlendirilmiştir.

### Antagonist Bakteriyel İzolatların Tanısı

Vermikomposttan izole edilen aday antagonist bakteri izolatlarının öncelikle klasik ve biyokimyasal testlemeler ile ön teşhisleri yapılmıştır. Saflaştırılan tüm bakteri izolatlarına gram boyama, oksidaz testi, hareketlilik, spor oluşumu ve katalaz testleri uygulanmıştır (Lelliott ve Stead, 1987). İçerisinde KBA besi ortamı bulunan petriyelerde gelişen bakterilerin 366 nm'lik UV ışık altında tutularak özellikle floresan *Pseudomonas* spp. ait bakteri izolatların ayrımı amacı ile kullanılmıştır. Tüm bakteri izolatları rutin analizler için +4°C'de buzdolabında petri kapları içerisinde, uzun süreli saklamalar içinse %20'lik gliserol içerisinde -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Ön teşhisleri yapılmış izolatların kesin tür teşhislerinde yağ asit metil ester (FAME) ve MALDI-TOF tanılama sistemleri kullanılmıştır (Sasser,1990; Ahmad ve ark., 2012). TSBA katı besi ortamlarına 4 fazlı çizgi ekim yapılmış bakteri izolatların yağ asit metil ester ekstraksiyonu (FAME), izolasyonu, saflaştırılması ve analizleri Sasser (1990) tarafından bildirildiği gibi yağ asit metil esterlerinin saflaştırılmasını müteakip, yağ asitlerinin metilleştirilmesi adımları uygulanmak suretiyle yapılmıştır. Bakterilere ait yağ asitleri metil esterler gaz kromatografisi (Agilent Technologies 6890N Network GC System) ile izolatların yağ asiti profillerine göre ayrıştırılması sonucu tanıları Sherlock MIS (Microbial Identification System) RTSBA 6.0 yazılımı (Microbial ID, Inc., Newark, Delaware) ile yapılmıştır.

Bakteriyel aday antagonist izolatların tanısı ayrıca son yıllarda mikrobiyolojik tanılamada hızlı ve güvenilir en son teknolojilerden olan matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçus süreli kütle spektroskopisi (MALDI-TOF MS) cihazı ile (Bruker Microflex LT Biotyper, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) ile teyit edilmiştir. MALDI-TOF sistemi doğrudan bakteriden lazer ile elde edilen protein profillerinin cihaz tarafından kütüphanesinde tanımlı izolatlar ile karşılaştırılma prensibine dayanan en son teknolojik bir tanılama sistemidir. Saf kültürden alınan ve katı TSA besi ortamında gelişen 1 günlük bakteri kolonisinden alınan örnekler etanol/formik asit yöntemi ile muamele edildikten sonra (Pavlovic ve ark., 2012) cihazın örnek tablasına (target) yüklenerek cihazın kütüphanesindeki mikroorganizmalar ile BioTyper™ 1.1 software (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) yazılımı ile karşılaştırmak sureti ile teşhisleri yapılmıştır.

### Tütünde Aşırı Duyarlılık (HR= Hypersensitive Reaction) ve Patates Yumuşak Çürüklük Testi

Vermikomposttan elde edilen aday bakteriyel izolatların patojen/saprofit durumlarının belirlenmesi amacı ile tütünde aşırı duyarlılık testi (HR) yapılmıştır (Lelliott ve Stead, 1987). HR testinde NA besi yerinde 2 günlük bakteri kültürleri steril saf su içerisinde  $10^8$  hücre ml<sup>-1</sup> (OD=0.13) yoğunlukta süspansiyon edilerek tütün yapraklarının dokusu içerisine enjekte edilmiştir. Negatif kontrol olarak yapraklara steril saf su inokule edilmiş, pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* izolatu kullanılmıştır. İnokulasyondan 2 gün sonra değerlendirme yapılarak inokulasyon noktasında doku çökmesine neden olan izolatlar HR (+) olarak kabul edilmiştir. HR testi negatif olan izolatlara aynı zamanda patates dilimi yumuşak çürüklük testi uygulanmıştır (Lelliott ve Stead, 1987).

## İzole Edilen BCA İzolatların Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi

Seçilen aday BCA bakteriyel izolatların hastalık etmenlerinin misel gelişimini engelleme (antagonize etme) potansiyelleri PDA içeren petri kaplarında önceden bildirildiği gibi ikili kültür testlemeleriyle belirlenmiştir (Soylu ve ark., 2005). Bu testlerde her bir petrinin ucuna test edilecek bakteriyel izolat çizilerek 26°C'de 2 gün ön inkübasyona bırakıldıktan sonra PDA besi ortamında gelişmiş 7 günlük patojen fungus kültürlerinin uç kısımlarından alınan 6 mm çapında misel diskleri besi yerinde gelişmiş aday antagonist bakteri izolatlarının 4 cm uzağına yerleştirilmiş ve 26°C'de tekrar gelişmeye bırakılmıştır. Kontrol petrilere herhangi bir antagonist bakteriyel izolat çizilmemiştir. Kontrol petrilere patojen fungusun işaretli alana ulaşmasıyla birlikte bakterilerin çizildiği tüm petrilere bakteriye doğru yönelen fungal misel gelişimi (MGu) ölçülmüş (fungal etmenlerin gelişmesine bağlı olarak inokulasyondan 4-7 gün sonra) ve kontrol petrilere misel (MGk) gelişmesine göre % engelleme oranlarının aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%Engelleme = ((MGk-MGu)/MGk)*100$$

Her bakteri-fungus kombinasyonu için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

## Ön İnkübasyon Süresinin Bakterilerin Antagonist Potansiyelleri Üzerine Olan Etkinliği

Antagonist bakteriyel izolatların antagonistik potansiyelleri üzerine ön inkübasyon süresinin olan etkinliğinin belirlenmesi amacıyla yapılmış çalışmalarda, farklı izolatlar PDA içeren petrilere fungus inokulasyonundan 1, 24, 48 ve 72 saat öncesinden çizilerek ön inkübasyona bırakılmış, daha sonra *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* ve *Botrytis cinerea* kültürlerinden alınan fungal diskler ikili kültür petrilere bakterilerin çizildiği noktadan 4 cm uzağına yerleştirilerek inkübasyon için gelişmeye bırakılmıştır. Kontrol olarak sadece fungus ekimi yapılmıştır. Değerlendirmeler ikili kültür testlemelerinde olduğu gibi yapılmış ve patojen gelişiminin antagonist bakteri izolatları tarafından engellenmeleri (%) hesaplanmıştır.

Her bakteri-fungus kombinasyonu için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

## Antagonist Bakteri İzolatların Fungus Hifleri Üzerinde Oluşturduğu Morfolojik Değişikliklerin Belirlenmesi

Antagonist izolatın bulunduğu petrilere geliştirilen

fungusların miselleri üzerinde meydana gelebilecek morfolojik değişiklikler Nomarski-faz kontrastlı ışık mikroskobu (Olympus BX-51, Tokyo, Japan) altında belirlenmiştir.

*In vitro* ikili kültür testlemeleri sırasında bazı petrilere gelişen fungus hiflerinde gözlenen morfolojik değişikliklerin mikroskop incelemeleri uygulamalardan 7 gün sonra, doğrudan besi ortamı üzerinde gelişen miseller üzerinde yapılmıştır. Muamele görmüş fungal yapıları Nomarski-faz kontrastlı ışık mikroskobunda incelemek için %50 glycerol içinde preparatları hazırlanmış, lacto phenol-trypan blue ile boyanarak yapısal değişiklikler belirlenmiştir (Soylu ve ark., 2010).

## Deneme Deseni ve İstatistik Analizler

Tüm denemeler tesadüf blokları deneme desenine göre kurulmuş olup, patojen gelişiminin engellenme oranları % oranlarına çevrilmeden SPSS istatistik programı (SPSS Statistics 17.0) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile Varyans Analizi yapılmış ve izolatlar arasındaki farklılık Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi (Duncan's Multiple Range Test) ile tespit edilmiştir ( $p \leq 0.05$ ).

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Vermikomposttan İzole Edilen Antagonist Bakteri İzolatların Karakterizasyonu ve Tanılanması

Vermikompostlardan seçici ve genel besi yeri üzerinde yapılan izolasyonlarda genel popülasyonu temsil eden farklı morfolojik yapıda 49 bakteriyel izolat elde edilmiştir (Çizelge 1). Bakteriyel izolatlar arasından 13 izolat tütünde HR pozitif veya patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklüğe neden olmaları sebebiyle bitki patojeni olarak kabul edilmiş ve bu yüzden de denemelerden çıkartılmıştır. HR ve patates dilimi yumuşak çürüklük testinde negatif sonuç veren toplam 36 izolattan 28 izolatın tanısı yapılabilmiş, 8 izolatın teşhisi FAME analizleri sonucu kütüphanede herhangi bir tür ile eşleşmemiştir. FAME analizi yapılmış türlerin teşhisleri MALDI-TOF analizler ile teyit edilmiştir. Elde edilen izolatların cins düzeyinde bakıldığında büyük bir kısmının *Bacillus* spp. (23 adet ile toplam izolatın %82.1) cinsi içerisinde yer almıştır (Çizelge 1).

Teşhisi yapılabilen 28 bakteriyel izolat arasından *Bacillus* spp. ait olarak 12 adet *Bacillus pumilis* (BV1-2, BV1-3, BV1-4, BV1-8, BV1-14, BV1-15, BV2-f, V2-g, BV3-C, BV3-D, BV3-G, BV3-K), 4 adet *Bacillus cereus* (BV1-16, BV2-e, BV2-h, BV3-B), 2 adet *Bacillus licheniformis* (BV3-H, BV3-L), 2 adet *Bacillus megaterium* (BV2-a, BV2-a), 2 adet *Bacillus thuringiensis-israelensis* (BV1-13, BV2-d), 1 adet *Bacillus subtilis* (BV1-12) izolatı tanımlanmıştır. *Bacillus* spp. yanısıra diğer aday antagonistlerden 1 adet *Virgibacillus pantothenicus* (BV1-1), 1 adet *Acetobacter pasteurianus* (BV1-6), 1 adet

*Photorhabdus luminescens-luminescens* (BV3-A), 1 adet *Stenotrophomonas maltophilia* (BV1-7), 1 adet ise *Salmonella typhimurium* (BV1-10) izolatu izole edilerek tanılamaları yapılmıştır.

### Aday Antagonist Bakterilerin *in vitro* Biyokontrol Etkinliklerinin Belirlenmesi

Tanısı yapılan 28 aday antagonistlerin farklı hastalık etmenlerine karşı gösterdiği antagonistik etkinliği ikili kültür testlemeleriyle belirlenmiştir (Çizelge 2, Şekil 1). Test edilen 28 izolatu *in vitro* antagonistik etkinliği test edildiği fungal türlere göre değişiklik göstermiştir.

Çizelge 1. Vermikompost gübresinden izole edilen FAME ve MALDI-TOF ile tanısı yapılan antagonist bakteri izolatları

Table 1. Antagonist bacterial isolates which obtained from vermicompost and identified by FAME and MALDI-TOF

İzolat No	Tür Adı
BV1-1	<i>Virgibacillus pantothenticus</i>
BV1-2	<i>Bacillus pumilus</i>
BV1-3	<i>Bacillus pumilus</i>
BV1-4	<i>Bacillus pumilus</i>
BV1-6	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
BV1-7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
BV1-8	<i>Bacillus pumilus</i>
BV1-10	<i>Salmonella typhimurium</i>
BV1-12	<i>Bacillus subtilis</i>
BV1-13	<i>Bacillus thuringiensis-israelensis</i>
BV1-14	<i>Bacillus pumilus</i>
BV1-15	<i>Bacillus pumilus</i>
BV1-16	<i>Bacillus cereus</i>
BV2-a	<i>Bacillus megaterium</i>
BV2-b	<i>Bacillus megaterium</i>
BV2-d	<i>Bacillus thuringiensis-israelensis</i>
BV2-e	<i>Bacillus cereus</i>
BV2-f	<i>Bacillus pumilus</i>
BV2-g	<i>Bacillus pumilus</i>
BV2-h	<i>Bacillus cereus</i>
BV3-A	<i>Photorhabdus luminescens-luminescens</i>
BV3-B	<i>Bacillus cereus</i>
BV3-C	<i>Bacillus pumilus</i>
BV3-D	<i>Bacillus pumilus</i>
BV3-G	<i>Bacillus pumilus</i>
BV3-H	<i>Bacillus licheniformis</i>
BV3-K	<i>Bacillus pumilus</i>
BV3-L	<i>Bacillus licheniformis</i>

Test edilen aday antagonistlerin *S. sclerotiorum*'un misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan etkinliğine bakıldığında izolatlar arasında en etkili izolatu %75.43 engelleme oranı ile *Bacillus pumilus* BV1-8 izolatu olduğu, bu izolatu %72.97 engelleme oranı ile *Bacillus megaterium* BV2-b ve %72.15 oranlarla *Bacillus pumilus* BV1-2 ve BV1-3 izolatlarının izlediği tespit edilmiştir. *S. sclerotiorum* misel gelişimini en düşük oranda engelleyen aday

antagonist izolat ise %1.72 oranla *Acetobacter pasteurianus* BV1-6 izolatu olmuştur (Çizelge 2, Şekil 1).

Test edilen aday antagonistlerin *M. phaseolina*'nın misel gelişiminin engellenmesi üzerine etkinliğine bakıldığında izolatlar arasında en etkili izolatu %65.83 engelleme oranı ile *Bacillus pumilus* BV1-8 izolatu olduğu, bu izolatu %61.67 engelleme oranı ile *Virgibacillus pantothenticus* BV1-1 ve %57.5 oranlarla *Bacillus pumilus* BV2-g izolatlarının izlediği tespit edilmiştir. *M. phaseolina* misel gelişimini en düşük oranda engelleyen aday antagonist izolat ise %1.72 oranla *Stenotrophomonas maltophilia* BV1-7 izolatu olmuştur (Çizelge 2, Şekil 1).

Test edilen aday antagonistlerin *B. cinerea*'nın misel gelişiminin engellenmesi üzerine etkinliğine bakıldığında izolatlar arasında en etkili izolatu %57.18 engelleme oranı ile *Bacillus pumilus* BV3-C izolatu olduğu, bu izolatu %56.34 engelleme oranı ile *Bacillus subtilis* BV1-12 ve %53.82 oranlarla *Bacillus megaterium* BV2-b izolatlarının izlediği tespit edilmiştir. *B. cinerea*'nın misel gelişimini en düşük oranda engelleyen aday antagonist izolat ise %3.44 oranla *Acetobacter pasteurianus* BV1-6 izolatu olmuştur (Çizelge 2, Şekil 1).

Test edilen aday antagonistlerin *V. dahliae*'nin misel gelişiminin engellenmesi üzerine etkinliğine bakıldığında izolatlar arasında en etkili izolatu %58.74 engelleme oranı ile *Bacillus subtilis* BV1-12 izolatu olduğu, bu izolatu %56.57 engelleme oranı ile *Bacillus licheniformis* BV3-L ve %52.23 oranlarla *Bacillus cereus* BV1-16 izolatlarının izlediği tespit edilmiştir. *V. dahliae*'nin misel gelişimini en düşük oranda engelleyen aday antagonist izolat ise %2.28 oranla *Stenotrophomonas maltophilia* BV1-7 izolatu olmuştur (Çizelge 2).

İkili kültür testlemelerinde etkinlikleri belirlenen farklı türlere ait bakteri izolatların genel olarak değerlendirildiğinde *Bacillus* spp. bağlı izolatların genel anlamda test edilen tüm fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimi üzerine olan antagonistik etkinliğinin yüksek düzeyde olduğu, *Acetobacter pasteurianus* ve *Stenotrophomonas maltophilia* izolatların ise etkinliğinin oldukça düşük düzeyde engelleme gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2). *Bacillus pumilus* BV1-8 izolatu en güçlü antagonistik etkinliği *S. sclerotiorum* ve *M. phaseolina* etmenlerine karşı göstermiştir. Bir başka *B. pumilus* izolatu BV1-12, *V. dahliae* etmenine karşı en yüksek etkinlik gösterirken, yaprak kökenli hastalık etmeni olan *B. cinerea*'ya karşı *B. subtilis* BV1-12 izolatu en etkili izolat olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2).

Çalışmada elde edilen izolatlar tür düzeylerinde incelendiğinde endospor üretme kabiliyetinde olan *Bacillus* spp. ait izolatların (özellikle *Bacillus subtilis*,

*B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. pumilis*, *B. cereus*) test edilen fungal etmenlerin yanısıra farklı konukçu bitkilerde diğer tohum, toprak ve yaprak kökenli hastalık fungal ve bakteriyel etmenlerine karşı yüksek düzeylerde antagonistik etkinlikler gösterdiği, antagonistik etkinliklerin genelde antimikrobiyal bileşiklerin (siderofor, proteaz, amonyak gibi) yanısıra, biyosümfektant, antimikrobiyal peptidler, mikolotik enzimlerden chitinaz,  $\beta$ -1,3-glucanase and  $\beta$ -1,4-glucanase gibi enzimlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Huang and Chen, 2004; Soylu ve ark., 2005; Araujo ve ark. 2005;

Chung ve ark., 2008; Singh ve ark., 2008; Chaiharn ve ark., 2008; Gupta ve ark.,2006; Senthilkumar ve ark., 2009; Kumar ve ark., 2012; Kara ve ark., 2016; Aktan, 2018; Soylu ve ark., 2018; Bozkurt ve Soylu, 2019; Duman ve Soylu, 2019).

### Ön İnkübasyon Süresinin Bakterilerin Antagonist Potansiyelleri Üzerine Olan Etkinliği

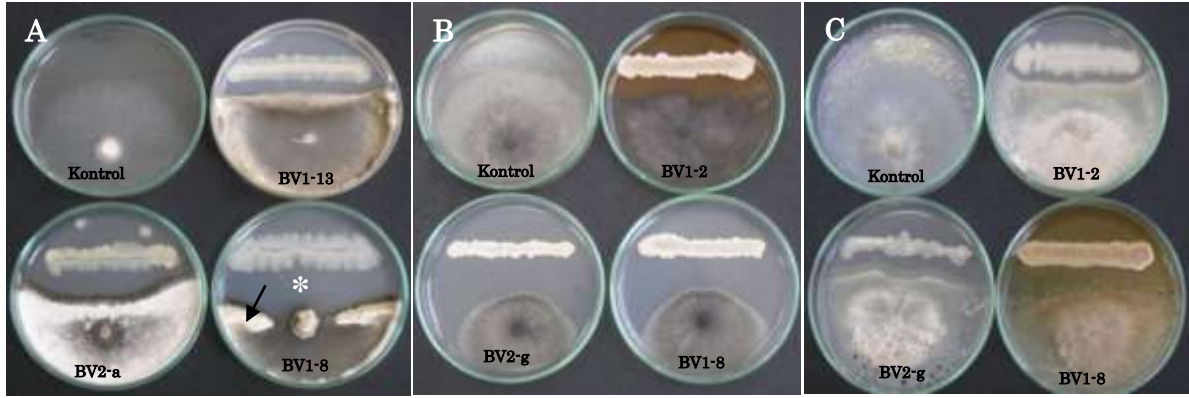
Antagonist bakteri izolatlarının ön inkübasyon süresiyle antagonistik potansiyelleri arasındaki ilişki, fungal etmenlere karşı en yüksek düzeyde etkinliği

Çizelge 2. Vermikompostlardan elde edilen farklı bakteri izolatlarının *in vitro* koşullarda fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimini engelleme potansiyeli

Table 2. Potential of different bacterial isolates obtained from vermicomposts to suppress mycelial growth of fungal disease agents in vitro conditions

Bakteri İzolatları	Fungal Misel Gelişimi (cm) ve % Engelleme							
	<i>M. phaseolina</i>		<i>S. sclerotiorum</i>		<i>B. cinerea</i>		<i>V. dahliae</i>	
	MG (cm)	% MGE	MG (cm)	% MGE	MG (cm)	% MGE	MG (cm)	% MGE
BV1-1	1.53 <sup>ab</sup>	<b>61.67</b>	1.87 <sup>c-e</sup>	54.14	2.47 <sup>cd</sup>	37.87	1.53 <sup>a-c</sup>	50.05
BV1-2	1.77 <sup>a-d</sup>	55.83	1.13 <sup>ab</sup>	<b>72.15</b>	2.13 <sup>a-c</sup>	46.26	1.57 <sup>a-c</sup>	48.97
BV1-3	2.20 <sup>d-g</sup>	45.00	1.13 <sup>ab</sup>	<b>72.15</b>	2.27 <sup>bc</sup>	42.91	1.50 <sup>ab</sup>	51.14
BV1-4	2.50 <sup>f-h</sup>	37.50	1.33 <sup>ab</sup>	67.24	2.07 <sup>a-c</sup>	47.94	1.63 <sup>a-d</sup>	46.80
BV1-6	3.10 <sup>i</sup>	22.50	4.00 <sup>l</sup>	1.72	3.83 <sup>h</sup>	3.44	1.50 <sup>ab</sup>	51.14
BV1-7	3.93 <sup>j</sup>	1.67	3.67 <sup>kl</sup>	9.91	3.33 <sup>fg</sup>	16.04	3.00 <sup>kl</sup>	2.28
BV1-8	1.37 <sup>a</sup>	<b>65.83</b>	1.00 <sup>a</sup>	<b>75.43</b>	2.07 <sup>a-c</sup>	47.94	2.23 <sup>f-h</sup>	27.25
BV1-10	3.43 <sup>i</sup>	14.17	3.50 <sup>jk</sup>	14.00	2.80 <sup>de</sup>	29.47	2.67 <sup>i-k</sup>	13.14
BV1-12	1.97 <sup>b-e</sup>	50.83	2.13 <sup>ef</sup>	47.58	1.73 <sup>a</sup>	<b>56.34</b>	1.27 <sup>a</sup>	<b>58.74</b>
BV1-13	2.13 <sup>c-g</sup>	46.67	1.93 <sup>de</sup>	52.50	2.87 <sup>d-f</sup>	27.79	2.00 <sup>d-g</sup>	34.85
BV1-14	2.17 <sup>c-g</sup>	45.83	1.17 <sup>ab</sup>	71.33	2.13 <sup>a-c</sup>	46.26	1.73 <sup>b-e</sup>	43.54
BV1-15	2.03 <sup>c-f</sup>	49.17	1.27 <sup>ab</sup>	68.88	2.33 <sup>bc</sup>	41.23	1.70 <sup>b-e</sup>	44.63
BV1-16	2.67 <sup>h</sup>	33.33	3.63 <sup>kl</sup>	10.73	3.53 <sup>gh</sup>	11.00	1.47 <sup>ab</sup>	<b>52.23</b>
BV2-a	1.90 <sup>b-e</sup>	52.50	1.40 <sup>a-c</sup>	65.60	1.97 <sup>a-c</sup>	50.46	1.93 <sup>c-f</sup>	37.02
BV2-b	1.87 <sup>b-e</sup>	53.33	1.10 <sup>ab</sup>	<b>72.97</b>	1.83 <sup>ab</sup>	<b>53.82</b>	2.23 <sup>f-h</sup>	27.25
BV2-d	2.30 <sup>e-h</sup>	42.50	1.83 <sup>c-e</sup>	54.95	2.30 <sup>bc</sup>	42.07	2.03 <sup>d-g</sup>	33.77
BV2-e	2.07 <sup>c-g</sup>	48.33	3.30 <sup>jk</sup>	18.92	2.13 <sup>a-c</sup>	46.26	2.03 <sup>d-g</sup>	33.77
BV2-f	1.97 <sup>b-e</sup>	50.83	2.07 <sup>d-f</sup>	49.22	2.03 <sup>a-c</sup>	48.78	2.23 <sup>f-h</sup>	27.25
BV2-g	1.70 <sup>a-c</sup>	<b>57.50</b>	1.60 <sup>b-d</sup>	60.69	2.47 <sup>cd</sup>	37.87	2.07 <sup>e-g</sup>	32.68
BV2-h	2.67 <sup>h</sup>	33.33	3.47 <sup>jk</sup>	14.82	3.27 <sup>e-g</sup>	17.72	2.40 <sup>g-i</sup>	21.82
BV3-A	2.07 <sup>c-g</sup>	48.33	2.20 <sup>e-g</sup>	45.95	2.90 <sup>d-f</sup>	26.95	2.23 <sup>f-h</sup>	27.25
BV3-B	2.17 <sup>c-g</sup>	45.83	3.03 <sup>jk</sup>	25.47	2.93 <sup>d-f</sup>	26.11	2.80 <sup>j-l</sup>	8.79
BV3-C	2.17 <sup>c-g</sup>	45.83	2.27 <sup>e-h</sup>	44.31	1.70 <sup>a</sup>	<b>57.18</b>	2.60 <sup>h-j</sup>	15.31
BV3-D	1.97 <sup>b-e</sup>	50.83	2.30 <sup>e-i</sup>	43.49	2.17 <sup>a-c</sup>	45.42	2.20 <sup>f-h</sup>	28.34
BV3-G	2.07 <sup>c-g</sup>	48.33	2.43 <sup>f-i</sup>	40.21	2.20 <sup>a-c</sup>	44.58	2.03 <sup>d-g</sup>	33.77
BV3-H	2.53 <sup>gh</sup>	36.67	2.63 <sup>g-j</sup>	35.30	2.93 <sup>d-f</sup>	26.11	1.50 <sup>ab</sup>	51.14
BV3-K	2.13 <sup>c-g</sup>	46.67	2.70 <sup>h-j</sup>	33.66	2.07 <sup>a-c</sup>	47.94	2.00 <sup>d-g</sup>	34.85
BV3-L	2.13 <sup>c-g</sup>	46.67	2.77 <sup>ij</sup>	32.02	2.80 <sup>de</sup>	29.47	1.33 <sup>ab</sup>	<b>56.57</b>
Kontrol	4.00 <sup>j</sup>	-	4.07 <sup>l</sup>	-	3.97 <sup>h</sup>	-	3.07 <sup>l</sup>	-

Aynı sütun içerisinde yer alan ortalama misel gelişim (MG) değerlerin yanındaki aynı harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi,  $P < 0.05$ ). MGE: Misel Gelişimin Engellenmesi



Şekil 1. *In vitro* ikili kültür testlerinde farklı antagonist bakteri izolatların *S. sclerotiorum* (A), *M. phaseolina* (B) ve *B. cinerea* (C) fungal etmenlerinin misel gelişimini (ok) engelleme potansiyelleri. Bakteri izolatu ile fungus misel gelişimi arasındaki engelleme bölgesi (\*) bakteri izolatlarına göre değişiklik göstermiştir.

Figure 1. Potential inhibition of mycelial growth (arrow) of *S. sclerotiorum* (A), *M. phaseolina* (B) and *B. cinerea* (C) fungal agents by different antagonist bacteria isolates in *in vitro* dual culture test. The inhibition region (\*) between the bacterial isolate and fungal mycelium development varied according to bacterial isolates.

Çizelge 3. Fungal etmenlerin misel gelişiminin (cm) engellenmesi (%) üzerine antagonist bakteri izolatlarının ön inkübasyon sürelerinin etkisi

Table 3. Effect of preincubation times on suppression (%) of mycelial growth (cm) of fungal disease agents by antagonist bacterial isolates

Fungal Etmenler	Ön inkübasyon süresi (saat)	Bakteriyel İzolatlar, Fungal Misel Gelişimi (cm) ve % Engelleme					
		BV1-12		BV1-13		BV3-K	
		MG (cm)	MGE (%)	MG (cm)	MGE (%)	MG (cm)	MGE (%)
<i>M. phaseolina</i>	Kontrol	3.97 <sup>f</sup>	-	3.97 <sup>f</sup>	-	3.97 <sup>f</sup>	-
	1	2.57 <sup>e</sup>	35.35	2.40 <sup>de</sup>	39.55	2.23 <sup>cd</sup>	43.74
	24	2.13 <sup>bc</sup>	46.26	2.23 <sup>cd</sup>	43.74	2.17 <sup>b-d</sup>	45.42
	48	2.07 <sup>bc</sup>	47.94	2.17 <sup>b-d</sup>	45.42	2.10 <sup>bc</sup>	47.10
	72	1.83 <sup>a</sup>	53.82	2.03 <sup>a-c</sup>	48.78	1.97 <sup>ab</sup>	50.46
<i>S. sclerotiorum</i>	Kontrol	4.00 <sup>f</sup>	-	4.00 <sup>f</sup>	-	4.00 <sup>f</sup>	-
	1	2.37 <sup>c</sup>	40.83	2.27 <sup>c</sup>	43.33	2.93 <sup>e</sup>	26.67
	24	2.27 <sup>c</sup>	43.33	2.20 <sup>c</sup>	45.0	2.87 <sup>de</sup>	28.33
	48	2.17 <sup>bc</sup>	45.83	1.87 <sup>a</sup>	53.33	2.83 <sup>de</sup>	29.17
	72	1.93 <sup>ab</sup>	51.67	1.80 <sup>a</sup>	55.0	2.63 <sup>d</sup>	34.17
<i>B. cinerea</i>	Kontrol	4.00 <sup>g</sup>	-	4.00 <sup>g</sup>	-	4.00 <sup>g</sup>	-
	1	2.13 <sup>cd</sup>	46.67	3.13 <sup>f</sup>	21.67	2.27 <sup>d</sup>	43.33
	24	1.97 <sup>bc</sup>	50.83	3.07 <sup>f</sup>	23.33	2.20 <sup>cd</sup>	45.0
	48	1.80 <sup>ab</sup>	55.0	2.93 <sup>ef</sup>	26.67	2.10 <sup>cd</sup>	47.5
	72	1.67 <sup>a</sup>	58.33	2.73 <sup>e</sup>	31.67	1.93 <sup>a-c</sup>	51.67

Her fungal etmen için hesaplanan ortalama misel gelişim (MG) değerlerinin yanındaki aynı harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi,  $P < 0.05$ ). MGE: Misel Gelişimin Engellenmesi

belirlenen farklı *Bacillus* türlerine ait izolatlardan *B. subtilis* BV1-12, *Bacillus thuringiensis-israelensis* BV1-13 ve *Bacillus pumilis* BV3-K ile *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* ve *B. cinerea* etmenlerine karşı araştırılmıştır.

Test edilen fungal etmenlerden *V. dahliae*'nin besi ortamında diğer etmenlere kıyasla oldukça yavaş gelişmesi nedeni ile bu çalışmada yer almamıştır. Elde edilen sonuçlar ön inkübasyon süresiyle (1, 24, 48 ve 72 saat) bakterilerin antagonistik potansiyelleri arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu, her 3 aday

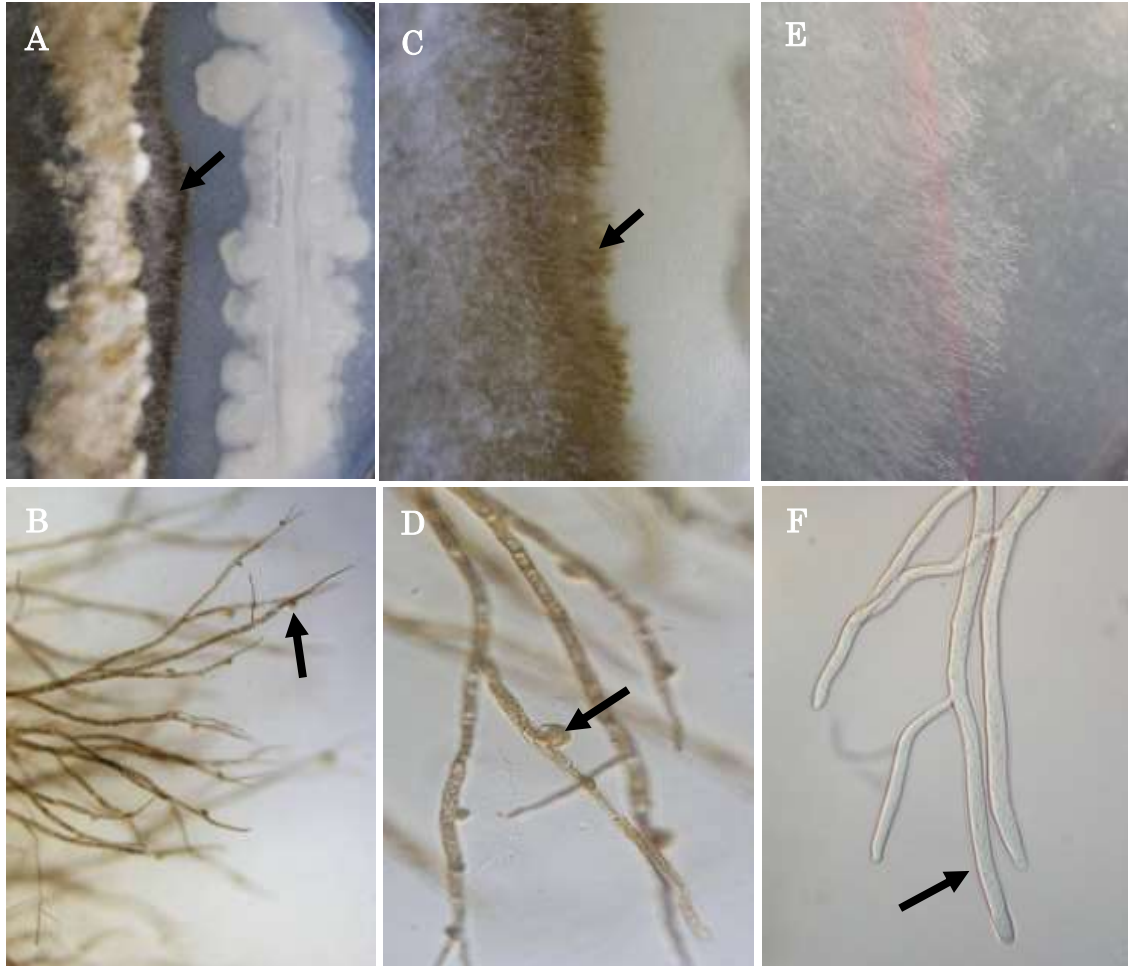
antagonist izolatın fungal gelişimini engelleme etkinliğinin ön inkübasyon süresinin uzunluğuna bağlı olarak arttığı göstermiştir (Çizelge 3)..

Ön inkübasyon süresinin, üretilen antifungal bileşiklerin konsantrasyonlarının yükselmesine katkıda bulunarak fungal etmenlerin miselyal gelişimlerinin engellenmesinde rol oynadığı yapılan diğer patojen-antagonist çalışmalarında da bildirilmiştir (Yoshida ve ark., 2001; Tekin ve ark., 2004; Soylu ve ark., 2005; Yılmaz, 2008; Sönmez, 2018).

### Antagonist Bakteri İzolatların Fungus Hiflerinin Morfolojik Yapılarında Meydana Getirdiği Değişikliklerin Belirlenmesi

Bazı aday antagonist bakteri izolatların ikili kültür petrilerinde engelleme bölgesine yakın noktalardaki fungus hiflerinin morfolojik yapılarında önemli değişikliklere neden olmuştur. Özellikle *Bacillus subtilis* BV1-12, *Bacillus thuringiensis-israelensis* BV1-13 ve *Bacillus megaterium* BV2-a, *Bacillus cereus* BV2-e izolatları fungal hastalık etmeni *S. sclerotiorum* hifleri üzerinde engelleme noktalarına yakın yerlerde kararmalara neden olduğu net bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 2). Bu bölgelerden alınan misellerden yapılan preparatlar faz kontrastlı ışık mikroskobu altında incelendiğinde, engelleme noktalarına yakın yerlerdeki fungus hiflerinde kararma (Şeki 2A ve C), kıvrılma, sitoplazmik içerikte pıhtılaşma (koagilasyon), vakuolleşme, sitoplazmik içeriğin dışarıya boşalması (Şekil 2B ve D) ve sonuçta hifsel erimeler gibi morfolojik

bozulmalar ve anormallikler gözlenmiştir. İnkübasyon süresi arttıkça (inkübasyonun 10. gününde), sitoplazması boşalmış misellerin tamamen koyulaşıp, şiddetli deforme olarak nekrotik bir misel haline dönüşmüş morfolojik yapısal değişiklikler görülmüştür (Şekil 2A-D). Bu tür petrilerdeki engelleme bölgelerindeki morfolojik bozulmaların gözlendiği hiflerin bulunduğu yerlerden alınan misellerin tekrar bakterisiz PDA besi ortamı içeren petrilere konulduğunda çimlenememesi hiflerin tamamen canlılığını yitirdiğinin en kesin delili olmuştur. Yapılan önceki çalışmalarda farklı fungal türlerin hiflerinde gözlenen yapısal değişikliklerinden sorumlu olan mekanizmaların başında bu çalışmada da tanılanmış aynı türlere ait bakteri izolatlarınca oluşturulan chitinases, dehydrogenase,  $\beta$ -1,3-glucanase,  $\beta$ -1,4-glucanase, lipases, phosphatases, proteases gibi ekstraselüler hücre duvarını yıkan mikotik enzimlerden kaynaklandığı bildirilmiştir.



Şekil 2. *In vitro* ikili kültür testlerinde antagonist bakteri izolatı *Bacillus megaterium* BV2-a (A) ve *Bacillus thuringiensis-israelensis* BV1-13 (C) izolatlarının engelleme bölgelerine yakın noktalardaki *S. sclerotiorum* miselleri üzerinde neden olduğu kararma (A ve C) ve sitoplazmik içeriğin dışarı boşalması (B ve D) şeklindeki morfolojik değişiklikler (ok). (E ve F) Kontrol petrilerinde sağlıklı gelişen misellerin görünümü (ok).

Figure 2. Morphological changes in the (B and D) release of cytoplasmic content (arrow) and (A and C) darkening (arrow) on *S. sclerotiorum* mycelia at points close to the inhibition sites caused by antagonist bacterial isolates *Bacillus megaterium* BV2-a (A) and *Bacillus thuringiensis-israelensis* BV1-13 (C) in vitro dual culture tests. (E and F) The appearance of healthy mycelia in control petri plates (arrow).



Antagonist bakteriler tarafından salgılan ve hücrede deformasyona neden olan antifungal metabolit(ler)in fungus miselleri üzerinde “geri dönüşümsüz hücre membran zararlanmasına” (Irreversible Membran Damage, IMD) neden olmak suretiyle hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. IMD za rarlanması sonucu hücre içinde biriken veya sentezlenen antimikrobiyal sekonder bileşikler sonucunda hücre karararak nekrotikleşir, organeller hücre içinde bütünlüğünü ve fonksiyonelliğini kaybeder, hücre içinde vakuolleşmeler görülerek sonuçta hücre canlılığını yitirir (Woods ve ark., 1988). Bu tür bakteri izolatlarca oluşturulan mikototik enzimler aralarında *Botrytis cinerea* ve *Sclerotinia sclerotiorum* yer aldığı *Macrophomina phaseoli*, *Sclerotium rolfii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* sp., *Sclerotium rolfii*, *Rhizoctonia solani* ve *Pythium ultimum* gibi toprak ve yaprak kökenli önemli bitki hastalık etmenlerinin gelişimini baskılamada rol oynadığı yapılan önceki birçok çalışmada bildirilmiştir (Huang ve Chen, 2004; Araujo ve ark., 2005; Gupta ve ark., 2006; Chung ve ark., 2008; Singh ve ark., 2008; Chaiharn ve ark., 2008; Senthilkumar ve ark., 2009; Xiao ve ark., 2009; Kumar ve ark., 2012; Kara ve ark., 2016; Jadhav ve ark., 2017; Yang ve ark., 2018; Aktan, 2018; Soylu ve ark., 2018; Sönmez, 2018).

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Kompostlar ve kompost karışımları mikrobiyal ve besin yönünden oldukça zengin ve etkili biyokontrol etmeni mikroorganizmalara konukçuluk eden organik materyallerdir. Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan sebzelerin önemli fungal hastalık etmenleri olan *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina*, *V. dahliae* gibi etkin bir mücadele imkanı bulunmayan veya *B. cinerea* gibi sık sık pestisit uygulamasından dolayı ilaçlara direnç geliştiren etmenlerin mücadelesinde antagonistik potansiyele sahip mikroorganizmaların etkin bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Yapılan *in vitro* etkinlik çalışmalarında özellikle *Bacillus* spp. bağlı antagonist izolatların patojen gelişimini oldukça etkili bir şekilde baskılamış olması, bu izolatlarının hastalık etmenlerinin farklı sebzelerde sebep olduğu kayıpları engellemede kullanılabilir bir araca doğrudan (biyolojik preparat) dönüştürülebileceği düşünülmektedir.

Kompostlardan izole edilen mikroorganizmaların laboratuvar koşullarında geliştirilen mikroorganizmalara oranla gerek ortama daha hızlı adaptasyon sağlaması gerekse minimum düzeyde yetiştirme şartlarına ihtiyaç duyulması nedeniyle biyolojik mücadeledeki başarı şanslarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Larkin ve ark., 1996; Sönmez, 2018). Pek çok *Bacillus* spp., antimikrobiyal bileşikler üretmelerinin yanı sıra, olumsuz çevre

koşullarına dayanıklı spor oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Bu sporlar kolaylıkla uygun teknolojilerle biyolojik preparatlara dönüştürülerek birçok bitki hastalığının kontrolünde kullanılabilir (Emmert ve Hendelsmann, 1999). Bu antagonistlerin test edildikleri hastalık etmenlerine karşı *in vivo* koşullarda etkinliklerinin araştırılmasıyla biyolojik preparat olarak kullanıma en uygun olan izolatın seçimi mümkün olacaktır. Ayrıca yapılacak çalışmalar ile antagonist bakteri biyokontrol etmenlerin hastalığı çıkışını engellemede kullandıkları mekanizmaların belirlenmesi üzerine çalışmaların sürdürülmesi projenin yaygın etkisini daha da arttıracaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından finansal olarak desteklenmiştir (Proje Numarası: BAP-189).

## Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

## KAYNAKLAR

- Ahmad F, Babalola OO, Tak HI 2012. Potential of MALDI-TOF Mass Spectrometry as a Rapid Detection Technique in Plant Pathology: Identification of Plant-Associated Microorganisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404:1247–1255.
- Aktan ZC 2018. Badem Ağaçlarında Sorun Olan Toprak Kökenli Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı Antagonist ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakterilerin *in vitro* Etkinliklerinin Belirlenmesi. Hatay Mustafa Kemal Üniv Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 102 sy.
- Anonim 2018. TÜİK Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim tarihi 02.08.2019)
- Arancon NQ, Edwards CA, Atiyeh R, Metzger JD 2004a. Effects of Vermicomposts Produced from Food Waste on the Growth and Yields of Greenhouse Peppers. *Bioresource Technology*, 93: 139–144.
- Araujo FF, Henning AA, Hungria M 2005. Phytohormones and Antibiotics Produced by *Bacillus subtilis* and Their Effects on Seed Pathogenic Fungi and on Soybean Root Development. *World Journal of Microbiology and*

- Biotechnology, 21(8-9): 1639-1645.
- Atiyeh RM, Subler S, Edwards CA, Bachman G, Metzger JD, Shuster W 2000. Effects of Vermicomposts and Composts on Plant Growth in Horticultural Container Media and Soil. *Pedobiologia*, 44: 579-590.
- Barocio-Ceja NB, Ceja-Torres LF, Morales-Garcia JL, Silva-Rojas HV, Flores-Magallon R, Ochoa-Estrada S 2013. *In vitro* Biocontrol of Tomato Pathogens Using Antagonists Isolated from Chicken-Manure Vermicompost. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 82: 15-22.
- Boehm MJ, Madden LV, Hoitink HAJ 1993. Effect of Organic Matter Decomposition Level on Bacterial Species Diversity and Composition in Relationship to *Pythium* Damping-Off Severity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 4171-4179.
- Bozkurt İA, Soylu S 2019. Elma Kök Uru Hastalığı Etmeni *Rhizobium radiobacter*'e Karşı Epifit ve Endofit Bakteri İzolatlarının Antagonistik Potansiyellerinin Belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16: 348-361.
- Cavigelli MA, Thien SJ, 2003. Phosphorus Bioavailability Following Incorporation of Green Manure Crops. *Soil Science Society American Journal*, 67:1186-1194.
- Chaiharn M, Chunhaleuchanon S, Kozo A, Lumyong S 2008. Screening of Rhizobacteria for Their Plant Growth Promoting Activities. *KMITL Science and Technology Journal*, 8(1): 18-23.
- Chung SH, Kong HS, Buyer JS, Lakshman DK, Lydon J, Kim SD, Roberts DP 2008. Isolation and Partial Characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for Suppression of Soil Borne Pathogens of Cucumber and Pepper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 115-123.
- Conklin AE, Erich MS, Liebman M, Lambert D, Gallandt ER, Halteman WA 2002. Effects of Red Clover (*Trifolium pratense*) Green Manure and Compost Soil Amendments on Wild Mustard (*Brassica kaber*) Growth and Incidence of Disease. *Plant and Soil*, 238: 245-256.
- Devi OG, Dutta BK, Das AK 2013. *In vitro* Solubilisation of Rock Phosphate and Biocontrol of Tea Pathogens by Microorganisms Isolated from Vermicompost. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7: 759-765.
- Duman K, Soylu S. 2019. Characterization of Antagonistic and Plant Growth-Promoting Traits of Endophytic Bacteria Isolated From Bean Plants Against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bitki Koruma Bülteni*, 59 (3): 59-69.
- Edwards CA, Arancon NQ 2004. Interactions among Organic Matter Earthworms and Microorganisms in Promoting Plant Growth. In: *Functions and Management of Organic Matter in Agro ecosystems*. C.A. Edwards (Editor in Chief), F. Magdoff, R. Weil (Eds.) Crc Press, Boca Raton, pp. 327- 376.
- Emmert EAB, Handelsman J, 1999. Biocontrol of Plant Disease: A (Gram -) Positive Perspective. *FEMS Microbiological Letters*, 171: 1-9.
- Gamliel A, Stapleton JJ 1993. Effect of Chicken Compost or Ammonium Phosphate and Solarization on Pathogen Control, Rhizosphere Microorganisms and Lettuce Growth. *Plant Disease*, 77: 886-891.
- Gamliel A, Stapleton JJ, 2012. Combining Soil Solarization with Organic Amendments. In: Gamliel A., Katan J. (eds). *Soil Solarization: Theory and Practice*, pp. 109-120. APS Press, USA.
- Gupta CP, Kumar B, Dubey RC, Maheshwari DK 2006. Chitinase Mediated Destructive Antagonistic Potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 against *Sclerotinia sclerotiorum* Causing Stem Rot of Peanut. *BioControl*, 51: 821-835.
- Hadar Y 1991. Control of Soil-Borne Diseases Using Suppressive Compost in Container Media. *Phytoparasitica*, 19: 167.
- Huang CJ, Chen CY 2004. Gene Cloning and Biochemical Characterization of Chitinase CH from *Bacillus cereus* 28-9. *Annals of Microbiology*, 54(3): 289-297.
- Hoitink HJ, Harry AJ, Zhang W 1997. Making Compost to Suppress Plant Disease. *BioCycle*, 38(4): 40.
- Jadhav HP, Shaikh SS, Sayyed RZ 2017. Role of Hydrolytic Enzymes of Rhizoflora in Biocontrol of Fungal Phytopathogens: An Overview. In: *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation* (pp. 183-203). Springer, Singapur.
- Kale RD, Mallesh BC, Bano K, Bagyaraj DJ 1992. Influence of Vermicompost Application on the Available Macronutrients and Selected Microbial Populations in a Paddy Fields. *Soil Biology and Biochemistry*, 24: 1317-1320.
- Kara M, Soylu EM, Kurt Ş, Soylu S 2016. Determination of Antagonistic Efficiency of Endophytic Bacteria Against Gray Mold Disease Agent *Botrytis cinerea* *in vitro* conditions. Turkey 6<sup>th</sup> Plant Protection Congress with International Participation, 5-8 September 2016 Konya, TURKEY, p. 156.
- Katan J 1999. The Methyl Bromide Issue: Problems and Potential Solutions. *Journal of Plant Pathology*, 81: 153-159.
- Katan J, Shtienberg D, Gamliel A 2012. The Integrated Management Concept in the Context of Soilborne Pathogens and Soil Disinfestation. In: Gamliel A., Katan J. (eds). *Soil Solarization: Theory and Practice*, pp. 91-97. APS Press, USA.
- Katan J 2017. Diseases Caused by Soilborne Pathogens: Biology, Management and Challenges. *Journal of Plant Pathology*, 99(2): 305-315.
- Kiran ÖF, Ertunç F 1998. Detection of the Diseases of Solanaceous Plants in Van Province. *Journal of*

- Turkish Phytopathology, 27: 105-111.
- Koivunen EE, Tully KL, Swett CL 2018. Co-Managing Soil and Plant Pathogens: Effects of Organic Amendments on Soil Fertility and Fungal Pathogen Survival. *Plant Soil*, 432:171–189.
- Kumar P, Dubey RC, Maheshwari DK 2012. *Bacillus* Strains Isolated from Rhizosphere Showed Plant Growth Promoting and Antagonistic Activity against Phytopathogens. *Microbiological Research*, 167: 493–499.
- Landa BB, Hervás A, Bettiol W, Jimenes-Dias RM 1997. Antagonist Activity of Bacteria from the Chickpea Rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. *Phytoparasitica*, 25: 305-318.
- Larkin, RP, Hopkins AD, Martin FN 1996. Suppression of *Fusarium* Wilt of Watermelon by Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and Other Microorganisms Recovered from A Disease-Suppressive Soil. *Phytopathology*, 86:812-819.
- Lelliott RA, Stead DE 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Disease of Plants. (T. F. PREECE, Editör). In: *Methods in Plant Pathology*, Blackwell Scientific Publications, 2: 176-177, Oxford.
- Litterick AM, Harrier L, Wallace P, Watson CA, Wood M 2004. The Role of Uncomposted Materials, Composts, Manures and Compost Extracts in Reducing Pest and Disease Incidence and Severity in Sustainable Temperate Agricultural and Horticultural Crop Production: A Review. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23: 453-479.
- Magid J, Henriksen O, Thorup-Kristensen K, Mueller T 2001. Disproportionately High N-Mineralisation Rates from Green Manures at Low Temperatures Implications for Modelling and Management in Cool Temperate Agro-Ecosystems. *Plant and Soil*, 228: 73-82.
- Malcolm GM, Kuldau GA, Gugino BK, Jimenez-Gasco M 2013. Hidden Host Plant Associations of Soilborne Fungal Pathogens: An Ecological Perspective. *Phytopathology*, 103: 538-544.
- Martin FN 2003. Development of Alternative Strategies for Management of Soilborne Pathogens Currently Controlled with Methyl Bromide. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 325-350.
- McDonald BA, Linde C 2002. Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential and Durable Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 349-379.
- Mihail JD 1992. *Macrophomina*. In: Singleton LL, Mihail JD, Rush CM (eds), *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. APS Press, Minnesota, pp 134-136.
- Nelson PE 1981. Life Cycle and Epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In: Mace EM, Bell AA, Beckman CH (eds) *Fungal Wilt Diseases of Plants*. pp 51-80.
- Noble R, Coventry E 2005. Suppression of Soil-Borne Plant Diseases with Composts: A Review. *Biocontrol Science and Technology*, 15: 3-20.
- Pandya U, Prakash S, Shende K, Dhuldhaj U, Saraf M 2017. Multifarious Allelochemicals Exhibiting Antifungal Activity from *Bacillus subtilis* MBCU5. *3 Biotech*, 7: 175.
- Pavlovic M, Konrad R, Iwobi AN, Sing A, Busch U, Huber I 2012. A Dual Approach Employing MALDI-TOF MS and Real-Time PCR for Fast Species Identification within the *Enterobacter cloacae* Complex. *FEMS Microbiology Letters*, 328: 46-53.
- Punja ZK, Rahe JE 1992. *Sclerotium*. In: Singleton LL, Mihail JD, Rush CM (eds), *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. APS Press, Minnesota, pp 166-170.
- Riggle D 1998. Vermicomposting Research and Education. *Biocycle*, 54-56.
- Sasser M 1990. Identification of Bacteria Through Fatty Acid Analyses. (Z Klement, K Rudolph, DC Sands, Editor). In: *Methods in Phytobacteriology*. Academia Kiado, Budapest, pp. 199– 204, Hungary.
- Senthilkumar M, Swarnlakshmi K, Govindasamy V, Lee YK, Annapurna K 2009. Biocontrol Potential of Soybean Bacterial Endophytes against Charcoal Rot Fungus *Rhizoctonia bataticola*. *Current Microbiology*, 58: 288-293.
- Singh N, Pandey P, Dubey RC, Maheshwari DK 2008. Biological Control of Root Rot Fungus *Macrophomina phaseolina* and Growth Enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by Rhizosphere Competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1669-1679.
- Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate SM, Dijst G 1997. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer, London.
- Soylu S, Kurt Ş 2001. Occurrence and Distribution of Fungal Diseases on Greenhouse Grown Pepper Plants in Hatay Province. *International XI<sup>th</sup> Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant*, pp 315-319 Antalya-Turkey.
- Soylu S, Soylu EM, Kurt Ş, Ekici ÖK 2005. Antagonistic Potentials of Rhizosphere-Associated Bacterial Isolates against Soil-Borne Diseases of Tomato and Pepper Caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8: 43-48.
- Soylu EM, Kurt Ş, Soylu S 2010. *In vitro* and *in vivo* Antifungal Activities of the Essential Oils of Various Plants against Tomato Grey Mould Disease Agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, 143:183-189.
- Soylu S, Kara M, Üremiş İ, Kurt Ş, Soylu EM, Uysal

- A 2018. Determination of Plant Growth Promoting Traits Of Bacterial Endophytes Isolated And Identified From Invasive Plant Water Hyacinth *Eichhornia crassipes* in Orontes River of Turkey. 1. International Mediterranean Symposium, 01-03 November 2018, Mersin/Turkey. pp 349-350.
- Sönmez E 2018. Fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) Sorun Olan Toprak Kökenli Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı Karıştırmalı Yığın Kompostlamasından Elde Edilen Bakterilerin *in vitro* Koşullarda Antagonistik Potansiyellerinin Araştırılması. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 67 sayfa.
- Szczech M, Rondomanâ Ski W, Brzeski MW, Smolinâ Ska U, Kotowski JF 1993. Suppressive Effect of a Commercial Earthworm Compost on Some Root Infecting Pathogens of Cabbage and Tomato. *Biological Agriculture and Horticulture*, 10: 47-52.
- Szczech MM 1999. Suppresiveness of Vermicompost against *Fusarium* Wilt of Tomato. *Journal of Phytopathology*, 147-155.
- Şimşek-Erşahin Y 2007. Vermikest ve Vermikest Hümik Fraksiyonlarının Hıyar (*Cucumis sativus* L.) Kök ve Gövde Çürüklük Etmenleri *Rhizoctonia solani* (Kühn) ve *Fusarium oxysporum* f.sp.*cucumerum* Üzerindeki Baskılama Etkisinin Belirlenmesi. GOP Üniversitesi Fen Bil Enstitüsü, Doktora Tezi, Tokat.
- Woods AM, Didehvar F, Gay JL, Mansfield JW 1988. Modification of the Host Plasmalemma in Haustorial Infections of *Lactuca sativa* by *Bremia lactucae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 33: 299-310.
- Xiao L, Xie CC, Cai J, Lin ZJ, Cheun YH 2009. Identification and Characterization of A Chitinase Producing *Bacillus* Showing Significant Antifungal Activity. *Current Microbiology*, 58(5): 528.
- Tekin Ş, Soylu EM, Soylu S2004. Rizosfer Bölgesi Topraklardan İzole Edilen Bakteri İzolatlarının Biberlerde Toprak Kökenli Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı Antagonist Potansiyellerin Belirlenmesi. *Türkiye 1. Bitki Koruma Kongresi*, 8-10 Eylül Samsun, sayfa 57.
- Yang MM, Xu LP, Xue QY, Yang JH, Xu Q, Liu HX, Guo JH 2012. Screening Potential Bacterial Biocontrol Agents towards *Phytophthora capsici* in Pepper. *European Journal of Plant Pathology*, 134(4): 811-820.
- Yılmaz S 2008. Domates Bitkilerinde Sorun Toprak Kökenli Bazı Fungal Hastalık Etmenleri ile Mücadelede Kök Bakterilerinin Kullanılma Potansiyellerinin Belirlenmesi. MKÜ Fen Bilimleri Enst, Yüksek Lisans Tezi,61 s.
- Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, Hatakeda K, Shirata A 2001. Antimicrobial Activity of Culture Filtrate *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry Leaves. *Phytopathology*, 91: 181-187.
- Yücel S 1994. Akdeniz Bölgesi Örtü Altı Sebze Alanlarında Görülen Fungal Hastalıklar. *Bitki Koruma Bülteni*, 34: 23-34.