

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BAKTERİ TÜRLERİNDE OKSİN, GİBBERELLİN
VE ABSİSİK ASİT ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ

Asuman KARADENİZ

T1115

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

2000

BAZI BAKTERİ TÜRLERİNDE OKSİN, GİBBERELLİN
VE ABSİSİK ASİT ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ

Asuman KARADENİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2000

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BAKTERİ TÜRLERİNDE OKSİN, GİBBERELLİN
VE ABSİSİK ASİT ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ

Asuman KARADENİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tezo/6/2000 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (95) not takdir edilerek
Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ş. Fatih TOPCUOĞLU.....
(Danışman)
Prof. Dr. Mustafa GÖKÇEOĞLU.....
Yrd. Doç. Dr. Salih ÜLGER.....

ÖZET

BAZI BAKTERİ TÜRLERİNDE OKSİN, GIBBERELLİN VE ABSİSİK ASİT ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ

Asuman KARADENİZ

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ş. Fatih TOPCUOĞLU

Mayıs 2000, 39 sayfa

Bu çalışmada çalkalamalı inkübasyon ortamında, Brain Heart Infusion Broth (BHI) besiyerinde üretilen *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus* ve *Escherichia coli* bakterilerinin hücre dışı kültür ortamında serbest-, bağlı- ve toplam- formlarda içsel oksin (indol-3-asetik asit, IAA), gibberellin (GA₃) ve absisik asit (ABA) miktarları saptanmıştır. Optimum üreme koşullarında üreme eğrisi belirlenen bakterilerin logaritmik (primer) ve durgun (sekonder) üreme dönemlerindeki hücre dışı kültür filtratı örnekleri hormon analizi için ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerine tabi tutulmuştur.

İçsel -IAA, -GA₃ ve -ABA miktarlarının belirlenmesinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği kullanılmıştır.

Çalışmanın sonunda *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus* ve *Escherichia coli* bakterilerinin bir metabolit olarak IAA, GA₃ ve ABA sentezledikleri ve sentezlenen bu bitkisel hormonların hem serbest hem de bağlı formlarda bulunduğu gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Bakteri, Oksin, Gibberellin, Absisik Asit, Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi.

JÜRİ: Prof. Dr. Ş. Fatih TOPCUOĞLU

Prof. Dr. Mustafa GÖKÇEOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Salih ULGER

ABSTRACT

DETERMINATION OF AUXIN, GIBBERELLIN AND ABSCISIC ACID PRODUCTION IN SOME BACTERIA

Asuman KARADENİZ

M Sc in Biology

Adviser: Prof. Dr. Ş. Fatih TOPCUOĞLU

May 2000, 39 pages

In this study some species of bacteria (*Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Escherichia coli*) cultured in shaking culture medium (Brain Heart Infusion Broth, BHI) of which levels of endogenous forms of free-, bound- and total- auxin (indole-3-acetic acid, IAA), gibberellin (GA₃) and abscisic acid (ABA) have been examined. External culture filtrate samples in the exponential (primary) and the stationary (secondary) growth phases of bacteria which determined their growth curve in the optimum conditions processed extraction and purification for the analysis of the hormones.

High performance liquid chromatography (HPLC) technique has been used to determine the amounts of endogenous auxin (indole-3-acetic acid, IAA), gibberellin (GA₃) and abscisic acid (ABA).

At the end of the study, it has been showed that bacteria which have been used in this study synthesized IAA, GA₃ and ABA as metabolite and these plant hormones which have been synthesized, were both free and bound forms.

KEY WORDS: Bacteria, Auxin, Gibberellin, Abscisic Acid, High Performance Liquid Chromatography.

COMMITTEE: Prof. Dr. Ş. Fatih TOPCUOĞLU

Prof. Dr. Mustafa GÖKÇEOĞLU

Assist. Prof. Dr. Salih ÜLGER

ÖNSÖZ

Bitki büyüme ve gelişmesinde rol oynayan en önemli içsel faktör bitki büyüme maddeleridir. Hormon olarak da adlandırılan bu maddelerin keşfi hayvanlarınkı ile aynı zamana, hatta daha öncelere rastlamaktadır. Charles Darwin daha 1880'lerde bu maddelerin bitki içinde varolduğunu gözlemiştir. Günümüzde ise bitki fizyolojisi alanında yapılan araştırmaların çoğu bu büyüme maddelerinin etkinlikleri üzerinde yoğunlaşmıştır.

Ekonomisi tarıma dayanan, sınırlı tarım alanlarına ve artan nüfusa sahip olan herhangi bir ülkenin refahı için bitkisel kaynaklardan mümkün olduğu kadar çok verim elde etmek zorunlu hale gelmiştir. Dünyada artan nüfusun besin gereksinimlerini karşılamak ve uygun olmayan tarım alanlarından en verimli şekilde yararlanmak zorunluluğu araştırmacıları bu yönde çalışmalar yapmaya teşvik etmektedir. Bitki büyüme maddelerinin bitkiler üzerindeki etkilerinin çok çeşitli olması onların tarım alanlarında yaygın biçimde kullanılmasına neden olmakta ve bu durum tarımsal çalışmalar için büyük önem taşımaktadır.

Günümüze kadar yüksek organizasyonlu bitkiler, funguslar, yosunlar ve likenlerden başka bakterilerin de bitki büyüme hormonlarından oksin (indol-3-asetik asit, IAA) ve gibberellin (GA_3) sentezlediklerine dair kanıtlar bulunmaktadır. Ancak bakterilerde büyüme hormonlarından oksin ve gibberellin varlığı rapor edilmesine karşın absisik asit (ABA)'in varlığı konusunda yayınlanmış bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bakteri türlerinde IAA, GA_3 ve ABA üretimi, izolasyonu ve miktar tayini ve buna bağlı olarak en yüksek IAA, GA_3 ve ABA düzeylerinin elde edilebileceği bakteri türlerinin belirlenmesine katkı getirebilmek amacıyla yapılan bu çalışmada bazı bakterilerde ABA'nın varlığına kanıt sunmuş ve yüksek düzeyde IAA, GA_3 ve ABA sentezleyen bakteri sayısının artırılmasına katkı getirmiş bulunmaktayız. Ayrıca bakterilerin kısa sürede üretilebilirliği ve sentetik hormonların yurtdışından pahalıya ithal edildiği de gözönüne alınırsa bakterilerin doğal olarak sentezlediği bitki büyüme hormonlarının elde edilmesi ülkemiz ekonomisine de katkı getirecektir.

Bana bu konuda çalışma olanağı veren ve her konuda içten ilgi ve yardımlarını gördüğüm değerli hocam sayın Prof. Dr. Ş. Fatih TOPCUOĞLU'na, (Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü), bakteriyolojik çalışmalarda

yardımlarını esirgemeyen değerli hocam sayın Dr. Süheyla İNAN'a (Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü), çalışmanın başlangıcından itibaren bölüm olanaklarını sunan değerli hocam sayın Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN'a (Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) konusunda büyük yardımlarını gördüğüm sayın Arş. Gör. Yüksel KELEŞ'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) yüksek lisans tez çalışmamı parasal olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığı'na ve çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan sevgili ablam sayın Şirin KARADENİZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Oksin'lerden İndol-3-Asetik Asit (IAA).....	1
1.2 Gibberellin'lerden GA ₃	3
1.3 Absisik Asit (ABA).....	4
2. MATERYAL VE METOT.....	7
2.1 Çalışmada Kullanılan Bakteriler.....	7
2.2 Bakteri Üreme Eğrisinin Çıkarılması İşlemleri.....	8
2.3 IAA, GA ₃ ve ABA Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması İşlemleri.....	15
2.4 Evaporasyon İşlemleri.....	18
2.5 İnce Tabaka Kromatografisi İşlemleri.....	18
2.6 IAA, GA ₃ ve ABA Bölgelerinin Ultraviyole (UV) Işığı Altında Belirlenmesi.....	19
2.7 IAA, GA ₃ ve ABA Bölgelerinin Kazınması ve Silikajelden Süzülmesi İşlemleri.....	19
2.8 IAA, GA ₃ ve ABA Miktarlarının HPLC Tekniği ile Belirlenmesi İşlemleri.....	20
2.9 İstatistiksel Analizler.....	20
3. BULGULAR.....	27
3.1 Bakterilerde IAA, GA ₃ ve ABA Miktarları.....	27
3.1.1 IAA miktarı.....	27
3.1.2 GA ₃ miktarı.....	29
3.1.3 ABA miktarı.....	30
4 TARTIŞMA VE SONUÇ.....	32
KAYNAKLAR.....	36
ÖZGEÇMİŞ.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

ml	mililitre
μ l	mikrolitre
mg	miligram
μ g	mikrogram
rpm	santrifüjleme sırasında dakikadaki devir sayısı
$^{\circ}$ C	santigrat derece
M	molarite
ng	nanogram
nm	nanometre
N	normalite
Rf	oransal akışkanlık
λ	dalga boyu
pH	asitlik derecesi

Kısaltmalar

IAA	indol-3-asetik asit
GA ₃	gibberellik asit
ABA	absisik asit
HCl	hidroklorik asit
NaOH	sodyum hidroksit
H ₂ SO ₄	sülfürik asit
HPLC	high performance liquid chromatography (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi)
TLC	thin layer chromatography (ince tabaka kromatografisi)
N. Agar	nutrient agar
BHI	brain hearth infusion broth
NaCl	sodyum klorür
HDKF	hücre dışı kültür filtratı
BHT	bütillenmiş hidroksi toluen

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. İndol-3-Asetik Asit	2
Şekil 1.2. Gibberellik Asit	3
Şekil 1.3. Absisik Asit	4
Şekil 2.1. <i>Proteus mirabilis</i> 'in Zamana Karşı Üreme Durumu	9
Şekil 2.2. <i>Proteus vulgaris</i> 'in Zamana Karşı Üreme Durumu	10
Şekil 2.3. <i>Bacillus megaterium</i> 'un Zamana Karşı Üreme Durumu	11
Şekil 2.4. <i>Bacillus cereus</i> 'un Zamana Karşı Üreme Durumu	12
Şekil 2.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin Zamana Karşı Üreme Durumu	13
Şekil 2.6. <i>Escherichia coli</i> 'nin Zamana Karşı Üreme Durumu	14
Şekil 2.7. Bitkisel Hormonlardan IAA, GA ₃ ve ABA için Ekstraksiyon Şeması	16
Şekil 2.8. Standart-Sentetik IAA Kromatogramı	21
Şekil 2.9. <i>Proteus vulgaris</i> 'in Sekonder Metabolizma Dönemi 12 Saat'te Serbest-IAA Kromatogramı	22
Şekil 2.10. Standart-Sentetik GA ₃ Kromatogramı	23
Şekil 2.11. <i>Bacillus megaterium</i> 'un Primer Metabolizma Dönemi 6 Saat'te Bağlı-GA ₃ Kromatogramı	24
Şekil 2.12. Standart-Sentetik ABA Kromatogramı	25
Şekil 2.13. <i>Proteus mirabilis</i> 'in Primer Metabolizma Dönemi 6 Saat'te Serbest-ABA Kromatogramı	26
Şekil 3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türlerinin Primer ve Sekonder Metabolizma Dönemlerindeki Toplam-IAA Miktarları	29
Şekil 3.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türlerinin Primer ve Sekonder Metabolizma Dönemlerindeki Toplam-GA ₃ Miktarları	30
Şekil 3.3. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türlerinin Primer ve Sekonder Metabolizma Dönemlerindeki Toplam-ABA Miktarları	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1	Proteus mirabilis'in Zamana Karşı Üreme Durumu	9
Çizelge 2.2	Proteus vulgaris'in Zamana Karşı Üreme Durumu	10
Çizelge 2.3	Bacillus megaterium'un Zamana Karşı Üreme Durumu	11
Çizelge 2.4	Bacillus cereus'un Zamana Karşı Üreme Durumu	12
Çizelge 2.5	Klebsiella pneumoniae'nin Zamana Karşı Üreme Durumu	13
Çizelge 2.6	Escherichia coli'nin Zamana Karşı Üreme Durumu	14
Çizelge 3.1	Çalışmada Kullanılan Bakteri Türlerinin Primer ve Sekonder Metabolizma Dönemlerinde Hücre Dışı Kültür Filtratı Örneklerinde Bulunan Serbest-, Bağlı- ve Toplam-IAA, -GA ₃ ve -ABA Eşdeğer Miktarları	28

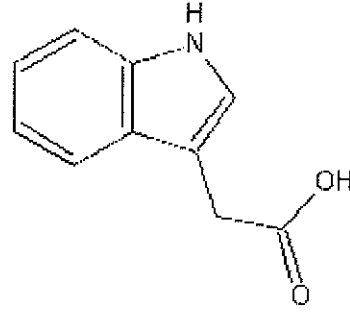
1. GİRİŞ

Bitki büyüme ve gelişmesinde rol oynayan en önemli içsel faktörlerden birisi olan bitki büyüme hormonlarının keşfi ile bitki büyümesini ve büyüme ile ilgili birçok faaliyeti kontrol altına almak mümkün olmuştur. Bitki büyüme maddelerinin bitkiler üzerindeki etkilerinin çok çeşitli olması onların tarım alanlarında yaygın biçimde kullanılmasına neden olmakta ve bu durum tarımsal çalışmalar için büyük önem taşımaktadır. Oksin, gibberellin ve absisik asit bitki büyüme ve gelişmesinin regülasyonunda büyük önemi olan ve doğal olarak oluşan bitki büyüme maddeleridir. Özellikleri ve etki tarzları dikkate alındığında bitki büyüme maddeleri üç grup altında toplanır (Topcuoğlu ve Ünyayar 1995).

- a) Organ yapıcılar: Örneğin florigen ve rizokalin.
- b) Yara hormonları: Örneğin travmatin
- c) Büyüme hormonları:
 - i) Stimülatörler: Örneğin oksinler, gibberellinler, sitokininler.
 - ii) İnhibitörler: Örneğin absisik asit

1.1 . Oksin'lerden İndol-3-Asetik Asit (IAA)

60 yıldan beri yapılan fizyolojik çalışmalar, embriyogenezden senesense kadar bitki gelişiminin her bir evresinin düzenlenmesinden bitki büyüme maddesi olan indol-3-asetik asit (IAA)'ın sorumlu olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 1.1). IAA'nın kapalı formülü $C_{10}H_9NO_2$ olup molekül ağırlığı 175.2'dir. Oksinler yüksek organizasyonlu bitkilerde esas olarak gövde ve kök ucu gibi meristematik dokularda, genç yapraklarda, kotiledonlarda, çiçek ve meyvelerde sentezlenmektedir (Salisbury ve Ross 1992, Palavan-Ünsal 1993). Roberts ve Hooley ve Kawaguchi, IAA'nın bir amino asit olan triptofan'dan sentezlendiğini ve biyosentezinde tek bir yolun olmadığını göstermişlerdir (Topcuoğlu ve Ünyayar 1995).



Şekil 1.1 İndol-3-Asetik Asit

Günümüzde sadece yüksek organizasyonlu bitkilerin (Palavan-Ünsal 1993), fungusların (Topcuoğlu ve Unyayar 1995, Unyayar vd 1996, Özcan 1997), liken ve yosunların (Ergün 1997) değil bakterilerin de (Martinez-Toledo vd 1988, Davies 1995) oksin (IAA) içerdikleri saptanmıştır. Örneğin Sequeira ve Williams (1964), bitki patojeni olan *Pseudomonas solanacearum*'la enfekte olan tütün bitkisiyle yaptıkları bir çalışmada enfekte olmuş tütün bitkilerinde IAA miktarını enfekte olmamış tütün bitkilerine oranla daha fazla bulmuşlardır. Fett vd (1987) de, bitki patojeni olan *Pseudomonas* ve *Xanthomonas*'larda oksin üretildiği sonucuna varmışlardır. Diğer bir çalışmada ise *Bradyrhizobium japonicum* genotip II suşunun kültür ortamında 20 µM'dan fazla IAA'ya rastlanmıştır (Minamisava ve Fukai 1991). Oberhansli vd (1991) ise yaptıkları bir çalışmada *Pseudomonas fluorescens*'te triptofan yan zincir oksidaz (TSO) ve triptofan transaminaz enzimleri aracılığıyla IAA sentezlendiğini ortaya çıkarmışlardır. Libbert vd (1969) de, epifitik bakterilerle enfekte olmuş ve olmamış bezelye gövdesinde IAA miktarlarını araştırmışlar ve enfekte olmuş bezelye gövdesinden ekstrakte edilen IAA'nın mikrobiyal orijinli olduğunu ifade etmişlerdir. Ergün (1997) tarafından bildirildiğine göre Tucker ve Blakesley vd, IAA'nın keşfinden sonra bu maddenin serbest ve bağlı (glukoz, amino asit ve myoinositol gibi bileşiklere) formlarda bitkilerde yaygın olduğunu birçok araştırmalarla kanıtlamışlardır.

IAA inaktivasyonunun üç şekilde olduğu ileri sürülmektedir (Palavan-Ünsal 1993):

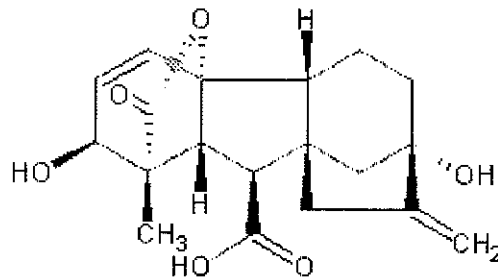
1. Fotooksidasyon ile.
2. Enzimatik oksidasyon ile
3. Bağlı forma dönüşerek.

Topcuoğlu ve Ünyayar, IAA'nın içsel maksimum absorpsiyon dalga boyunun kullanılan yöntemlere göre yüksek organizasyonlu bitkilerde 224 nm, 225 nm, 282 nm ve 285 nm, funguslarda 222 nm ve 280 nm, Epstein vd, bakterilerde 220 nm olduğunu bildirmektedir (Ergün 1997).

1.2 .Gibberellin'lerden Gibberellik Asit (GA₃)

Gibberellinler 1920'lerden beri bir bitki büyüme hormonu olarak bilinmektedir. Sponsel ve Graebe, 1990 yılına kadar çeşitli funguslar ve bitkilerde 84 adet gibberellin keşfedildiğini belirtmişlerdir (Ergün 1997). Bunlar GA₁, GA₈₄ şeklinde ifade edilir. Bütün gibberellinler ent-gibberellan iskeletinden türevlenmektedir. Gibberellinler kimyasal olarak diterpenlerdir. Diterpenler bitkilerde doğal olarak meydana gelen terpenoidlerden türevlenirler. Gibberellinlerin yüksek bitkilerde en çok bulunan çeşidi olan gibberellik asit (GA₃)'in kapalı formülü C₁₉H₂₂O₆ olup molekül ağırlığı 346.4'tür (Şekil 1 2)

Genellikle yüksek organizasyonlu bitkilerde gibberellin biyosentezi çeşitli organlarda olmaktadır. Örneğin embriyo, genç yapraklar, gelişmekte olan meyve ve tohum, uzamakta olan gövde apikal bölgesi ve köklerdir. Yüksek organizasyonlu bitkilerde ve funguslarda gibberellinin mevalonik asit'ten sentezlendiği ve biyosentezinde tek bir yolun olmadığı bildirilmektedir. Farklı gibberellinler farklı biyosentez yollarıyla sentezlenir ancak günümüzde sentez yolları henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Palavan-Ünsal 1993).



Şekil 1. 2. Gibberellik Asit

Gibberellinlerin inaktivasyonu konusu da henüz tam aydınlığa kavuşturulamamıştır. Literatür bilgilerine göre gibberellin inaktivasyonu, gibberellinlerin ya karbon iskeletinin modifikasyonu ile ya da hücre bileşiklerine (örneğin şeker ve protein) bağlanması ile olur (Palavan-Ünsal 1993).

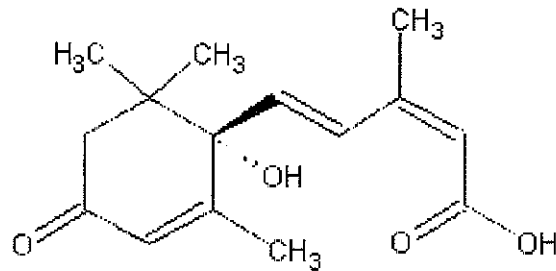
Cihangir ve Aksöz ile Topcuoğlu ve Ünyayar içsel GA₃'ün maksimum absorpsiyon dalga boyunun 254 nm olduğunu rapor etmektedirler (Ergün 1997)

Günümüzde sadece yüksek organizasyonlu bitkilerin (Palavan-Ünsal 1993, Davies 1995), fungusların (Topcuoğlu ve Ünyayar 1995, Ünyayar vd 1996, Özcan 1997), liken ve yosunların (Ergün 1997) değil bakterilerin de (Bottini vd 1989, Rademacher 1994) gibberellin içerdikleri saptanmıştır.

Bakterilerde gibberellin biyosentezlediğine dair yapılan bazı çalışmalardan örneğin *Azotobacter chroococcum*'un GA₃ (Martinez-Toledo vd 1988), *Rhizobium phaseoli*'nin GA₁, GA₄, GA₉ ve GA₂₀, *Azospirillum lipoferum* ve *A. brasilense*'nin GA₁ ve GA₃ (Rademacher 1994) tipi gibberellin sentezlediği bildirilmektedir.

1.3. Absisik Asit (ABA)

ABA'nın bitki büyüme ve gelişmesinin regülasyonunda büyük önemi olan ve doğal olarak oluşan bir bitki büyüme inhibitörü olduğu Topcuoğlu (1987) tarafından ifade edilmektedir. ABA'nın doğal olarak oluşan formu (S)-(+)-absisik asit'tir (Şekil 1.3) Sentetik rasemik absisik asit ise (RS)-(\pm)-absisik asit'tir.



Şekil 1.3. Absisik Asit

Wareing ve Phillips ile Topcuoğlu, ABA'nın bir sesquiterpenoid olduğunu ve hem optik hem de geometrik izomerizm gösterdiğini belirtmektedir (Ergün 1997) Yine aynı araştırmacılar ABA molekülünün asimetrik bir karbon atomu içerdiğinden ya D (+) ya da L (-) formunda olmak üzere optik olarak izomerizm gösterdiğini ve doğal olarak oluşan ABA'nın daima (+) formda olduğunu bildirmektedirler (Ergün 1997) Milborrow, Phillips ve Topcuoğlu'nun bildirdiklerine göre ise ABA'nın cis ve trans olmak üzere iki geometrik izomeri vardır. Pek çok bitkide ABA'nın doğal olarak oluşan izomeri cis-ABA olup, literatürde sadece ABA olarak belirtilmektedir (Ergün 1997) ABA'nın kapalı formülü $C_{15}H_{20}O_4$ olup molekül ağırlığı 264'tür

Ergün (1997)'ün bildirdiğine göre Loveys, ABA'nın, kök, meyve, tohum embriyosu ve yapraklarda özellikle kloroplastlarda sentezlendiğini ifade etmektedir. Ayrıca ABA'nın diğer plastidlerde de sentezlendiği rapor edilmektedir (Salisbury ve Ross 1992). Topcuoğlu (1987)'na göre, ABA biyosentezine ilişkin olarak iki yol tartışılmaktadır.

1. ABA doğrudan doğruya mevalonik asitten sentezlenmektedir.
2. ABA, karotenoid biyosentez yoluyla veya karotenoid ürünlerin oluşumuyla ya da başka bir deyişle violaksantin dahil ilgili ksantofillerin enzimatik oksidasyonu veya fotooksidasyonunun bir yıkım ürünü olarak meydana gelmektedir

Günümüzde ABA'nın mevalonik asitten sentezlendiği fikri halen kabul edilmiş durumdadır. Bununla beraber ABA biyosentezinde çoğu kademe hala açığa kavuşturulamamıştır.

ABA'nın iki yoldan inaktive olduğu, başka bir deyişle ABA metabolizmasının yıkım ürünlerinin, ABA'nın ya okside olmuş (fazeik asit, dihidrofazeik asit) ya da bağlı (şeker ve protein gibi bileşiklere) formları olduğu Topcuoğlu (1987) tarafından bildirilmektedir.

Addicott ve Lyon'a göre ABA'nın maksimum absorpsiyon dalga boyu ortamın pH'sına göre değişmektedir. Yüksek organizasyonlu bitkilerde maksimum absorpsiyon asidik koşullarda 252 nm ile 262 nm arasında, bazik koşullarda ise 245 nm'de ölçülmektedir (Ergün 1997)

Günümüze kadar yüksek organizasyonlu bitkilerde (Salisbury ve Ross 1992, Palavan-Ünsal 1993, Davies 1995), funguslarda (Topcuoğlu ve Ünyayar 1995, Ünyayar

vd 1996, Özcan 1997), liken ve yosunlarda (Ergün 1997), ABA sentezlendiğine dair kanıtlar olmasına rağmen bakterilerde ABA'nın varlığına dair yayınlanmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Büyüme hormonlarının (IAA, GA₃ ve ABA) taşınması konusundaki en önemli bulgu bitki içinde ksilem ve floem dokuları ile taşınmalarıdır. Ayrıca iletim demetleri dışında parankima hücrelerinde de taşındıkları belirlenmiştir (Palavan-Ünsal 1993). Bu da bize bitki hormonlarının sentez bölgesinden bitkinin diğer kısımlarına taşınmasının enerji gerektiren aktif metabolizma ve pasif difüzyon olayı ile organların dikey eksenini ve yatay eksenini boyunca olduğunu ifade etmektedir.

Büyüme hormonları çok çeşitli fizyolojik etkilere sahiptir. Bu etkileri konsantrasyonlarına, çevresel faktörlere, bitki türlerine ve bitkinin yaşına bağlı olarak değişebilmektedir. Başlıca fizyolojik etkileri; hücre bölünmesi, hücre uzaması ve genişlemesi, morfogenez, tohum ve tomurcuk dormansisi, embriyo gelişimi ve tohum çimlenmesi, çiçeklenme, büyüme, meyve oluşumu, gelişimi ve olgunlaşması, partenokarpik meyve oluşumu, apikal dominansi, senesens, kloroplast gelişimi ve klorofil sentezi, nükleik asit ve protein sentezi, enzim sentezi ve aktivasyonu, tuber oluşumu, kök oluşumu, kambiyal aktivite, absisyon, strese adaptasyon mekanizması, osmoregülasyon, böceklerde gelişme, fekondite, yumurta verimi ve açılımı üzerine etkileri sayılabilir (Topcuoğlu 1987, Salisbury ve Ross 1992, Palavan-Ünsal 1993, Topcuoğlu ve Ünyayar 1995).

Günümüzde bitki hormonları bitki dokularından, funguslardan, likenlerden, yosunlardan ve bakterilerden dietileter, metanol veya etil asetat gibi organik çözücülerle ekstre edilerek elde edilmektedir. Ayrıca ultraviyole (UV) ve infrared spektroskopisi, gaz kromatografisi, gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi, ince tabaka kromatografisi (TLC) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) vb hassas fiziko-kimyasal teknikler kullanılmaktadır (Allen vd 1981, Wang 1982, Rachev vd 1993, Ünyayar vd 1996, Ergün 1997).

2. MATERYAL VE METOT

2.1.Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Çalışmada kullanılan bakteriler (*Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus* ve *Escherichia coli*), T. C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'nden (Ankara) temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan bakterilerin özellikleri aşağıda verilmiştir (Kreig 1984, Sneath 1986, Stanier 1986, Tortora vd 1995, Bilgehan 1996, Ünlütürk ve Turantaş 1998)

Proteus mirabilis ve *Proteus vulgaris*: Gram (-), sporsuz, fakültatif anaerobik ve fermentatif bakterilerdir. Çubuk şeklinde olup kapsülsüz ve oldukça hareketlidirler. İnsan ve hayvan bağırsağında, lağım sularında, kirli sularda, kokuşmuş organik maddelerde, toprakta ve gübrede bulunurlar. 37°C'de iyi ürerler. Katı besiyeri üzerinde (Nutrient Agar) bir buğu şeklinde ve konsantrik halkalar oluşturarak ürerler.

Klebsiella pneumoniae: Gram (-) sporsuz, fakültatif anaerobik ve fermentatif bakterilerdir. Çubuk şeklinde olup kapsüllü ve hareketsizdirler. İnsan ve hayvan bağırsağında, üst solunum yollarında, toprakta, suda, hububat tohumlarında, taze ve dondurulmuş gıdalarda bulunurlar. 37°C'de ve pH 7'de iyi ürerler. Sıvı besiyerinde homojen bir bulanıklık ve dipte mukoz bir çökelti yaparak ürerler. Nutrient agarda büyük sarımsak renkte koloniler yaparlar.

Bacillus megaterium ve *Bacillus cereus*: Gram (+), sporlu, aerobik veya fakültatif anaerobik, büyük hücreli basillerdir. Değişik çevresel koşullara karşı oldukça dirençli oldukları için değişik kaynaklarda üreyebilirler. Toprakta ve bitkilerde de bulunabilen patojen olmayan organizmalardır. 30 °C'de ve pH 4.9-9.3 arasında iyi ürerler. *B. cereus* ayrıca sütte yaygın olarak bulunur, sıvı besiyerinde yoğun bulanık bir çökelti yaparak ürer.

Escherichia coli: Gram (-), fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde bakterilerdir. İnsan ve hayvan bağırsağında yaygın olarak bulunurlar. 37°C'de ve pH 7.2'de agar üzerinde nemli, gri, parlak yüzeyli koloniler yaparak ürerler.

2.2. Bakteri Üreme Eğrisinin Çıkarılması İşlemleri

Çalışmada kullanılan *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus* ve *Escherichia coli* bakterilerinin primer metabolit ürettikleri logaritmik üreme fazı ve sekonder metabolit ürettikleri durgun üreme fazının belirlenmesi için bakterilerin üreme eğrisi çıkarılmıştır (Çizelge 2 1, 2 2, 2 3, 2 4, 2 5, 2 6 ve Şekil 2 1, 2 2, 2 3, 2 4, 2 5, 2 6).

Üreme eğrisinin çıkarılması için canlı hücre sayımı, mikroskopik sayım, filtrasyon ile sayım ve absorbans ölçümü, gibi yöntemler vardır (Tortora vd 1995).

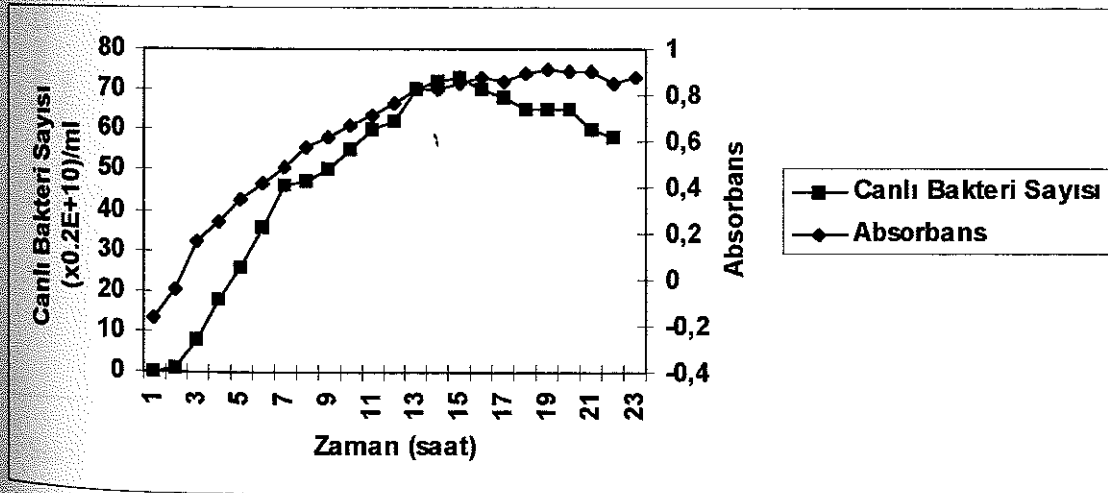
Çalışmamızda üreme eğrisinin çıkarılması için canlı hücre sayımı ve absorbans ölçümü yöntemleri kullanılmıştır (Öksüzoğlu 1997).

İçinde 20 ml sıvı üreme ortamı Brain Hearth Infusion Broth (BHI) bulunan 50 ml'lik erlenlere, master plaklardan özeyle ekim yapıp, gecelik kültür bakterilerin optimum üreme sıcaklığında 110 rpm'de çalkalanarak üretilmiştir. Ertesi sabah absorbansı yaklaşık 0,1 olan gecelik kültürden 0,5 ml'lik örnekler alınarak içinde 20 ml sıvı üreme ortamı (BHI) bulunan erlenlere ekim yapılmıştır. Optimum üreme sıcaklığında ve 175 rpm'de çalkalanarak üretilen bakteri kültüründen belirli aralıklarla (her saat başı) örnekler alınıp UV spektrofotometrede (Jenway marka) absorbansı ölçülmüştür. Bunun yanısıra alınan örnekler belirli oranlarda %0,9 serum fizyolojik ile sulandırılarak, nutrient agarlı plaklara 0,005 ml spot şekilde ekilmiştir. Plaklar bir gece bakterilerin optimum üreme sıcaklığında inkübe edilmiş ve ertesi gün koloni sayımı yapılmıştır. Bir mililitredeki canlı bakteri sayısı: sulandırma faktörü \times plaktaki koloni sayısı $\times 2 \times 10^2$ formülü ile hesaplanmıştır. Sulandırma faktörü (kolonilerin kolayca sayılabilmesi için gereken sulandırma sayısı) herbir bakteri türüne ait kolonilerin yapısına ve sayısına göre belirlenmiştir.

Örneğin *Proteus mirabilis* için sulandırma faktörü 10^7 dir. 10 saatteki plakadaki koloni sayısı ise 55'tir. O halde *P. mirabilis* için 10 saatteki canlı bakteri sayısı: $10^7 \times 55 \times 2 \cdot 10^2 = 11 \times 10^{11}$ 'dir. Bu ifade Microsoft Excel 97 bilgisayar programında $55 \times 0.2E+10$ şeklinde gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. *Proteus mirabilis*'in Zamana Karşı Üreme Durumu

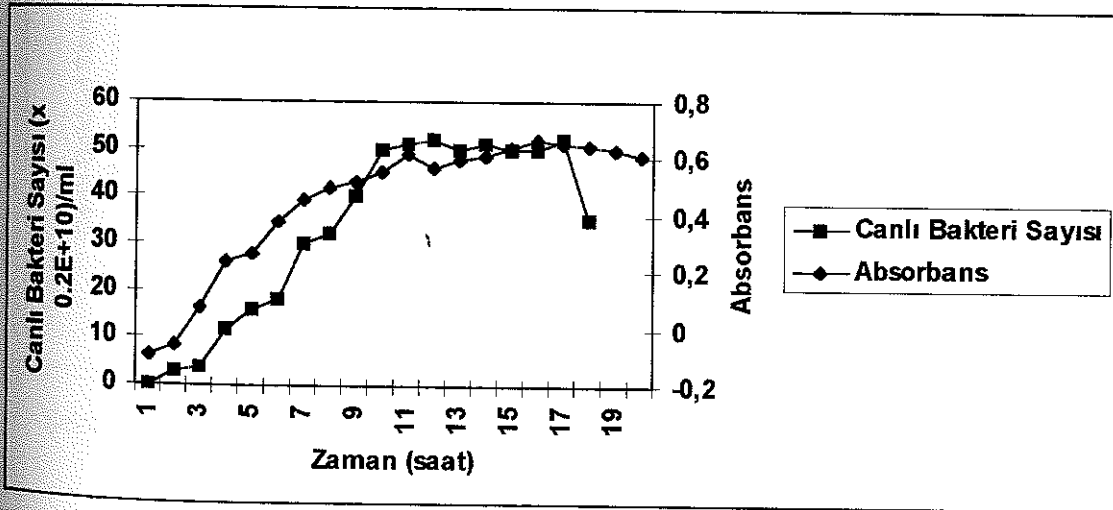
Zaman (saat)	Absorbans ($\lambda= 491 \text{ nm}$)	Canlı Bakteri Sayısı x (0,2E+10)/ml
1	-0.166	0
2	-0.046	1
3	0.169	8
4	0.253	18
5	0.344	26
6	0.415	36
7	0.489	46
8	0.570	47
9	0.615	50
10	0.667	55
11	0.716	80
12	0.764	82
13	0.825	70
14	0.824	72
15	0.854	73
16	0.876	70
17	0.862	68
18	0.899	81
19	0.913	65
20	0.901	65
21	0.908	60
22	0.855	65
23	0.881	62



Şekil 2.1. *Proteus mirabilis*'in Zamana Karşı Üreme Durumu

Çizelge 2.2. *Proteus vulgaris*'in Zamana Karşı Üreme Durumu

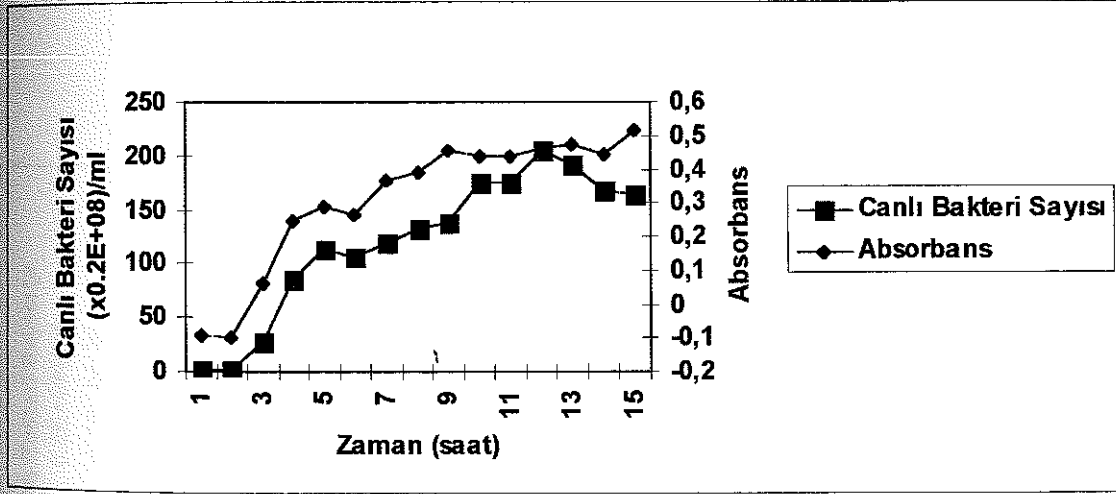
Zaman (saat)	Absorbans ($\lambda= 530 \text{ nm}$)	Canlı Bakteri Sayısı x ($0,2E+10$)/ml
1	-0.095	0
2	-0.062	3
3	0.073	4
4	0.234	12
5	0.264	16
6	0.379	14
7	0.458	30
8	0.497	32
9	0.520	40
10	0.554	50
11	0.619	56
12	0.589	52
13	0.594	44
14	0.610	42
15	0.641	45
16	0.665	48
17	0.655	52
18	0.643	35
19	0.633	33



Şekil 2.2. *Proteus vulgaris*'in Zamana Karşı Üreme Durumu

Çizelge 2.3. *Bacillus megaterium*'un Zamana Karşı Üreme Durumu

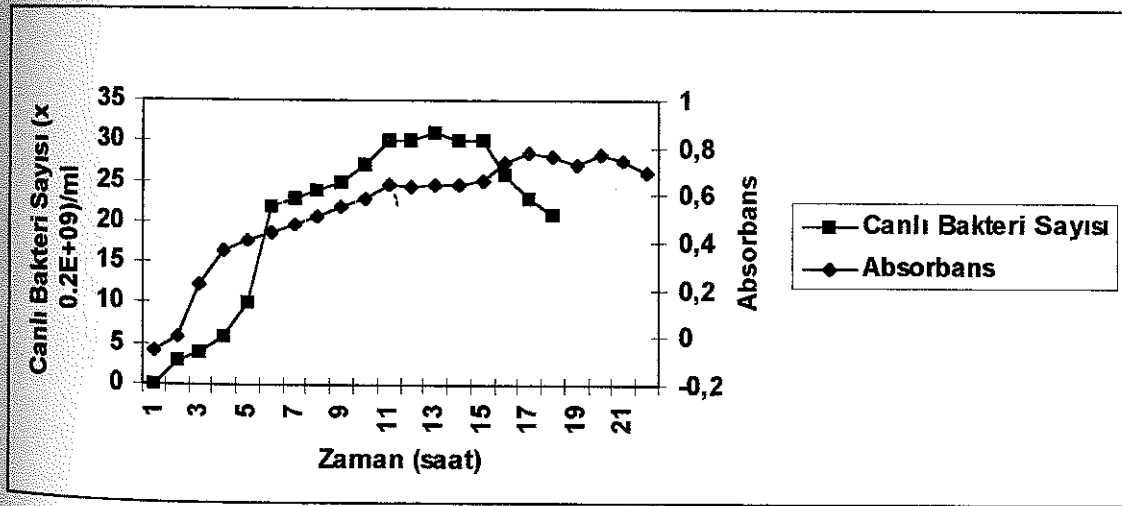
Zaman (saat)	Absorbans ($\lambda = 545 \text{ nm}$)	Canlı Bakteri Sayısı x ($0,2E+08$)/ml
1	-0.091	0
2	-0.097	0
3	0.060	28
4	0.246	85
5	0.287	113
6	0.265	107
7	0.370	120
8	0.389	133
9	0.454	138
10	0.440	175
11	0.440	175
12	0.446	205
13	0.472	190
14	0.447	167
15	0.516	209



Şekil 2.3 *Bacillus megaterium*'un Zamana Karşı Üreme Durumu

Çizelge 2.4. *Bacillus cereus*'un Zamana Karşı Üreme Durumu

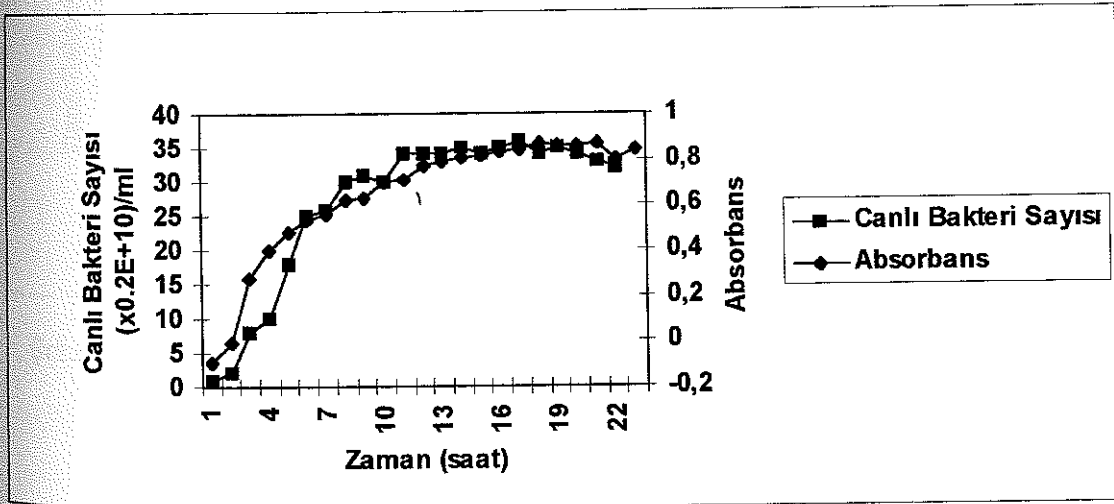
Zaman (saat)	Absorbans ($\lambda= 580 \text{ nm}$)	Canlı Bakteri Sayısı x (0,2E+09)/ml
1	-0.057	0
2	0.004	3
3	0.224	4
4	0.362	6
5	0.412	10
6	0.440	24
7	0.478	27
8	0.512	24
9	0.556	25
10	0.588	27
11	0.648	30
12	0.610	30
13	0.646	25
14	0.644	25
15	0.665	30
16	0.738	26
17	0.780	26
18	0.766	26



Şekil 2.4 *Bacillus cereus*'un Zamana Karşı Üreme Durumu

Çizelge 2.5. *Klebsiella pneumoniae*'nin Zamana Karşı Üreme Durumu

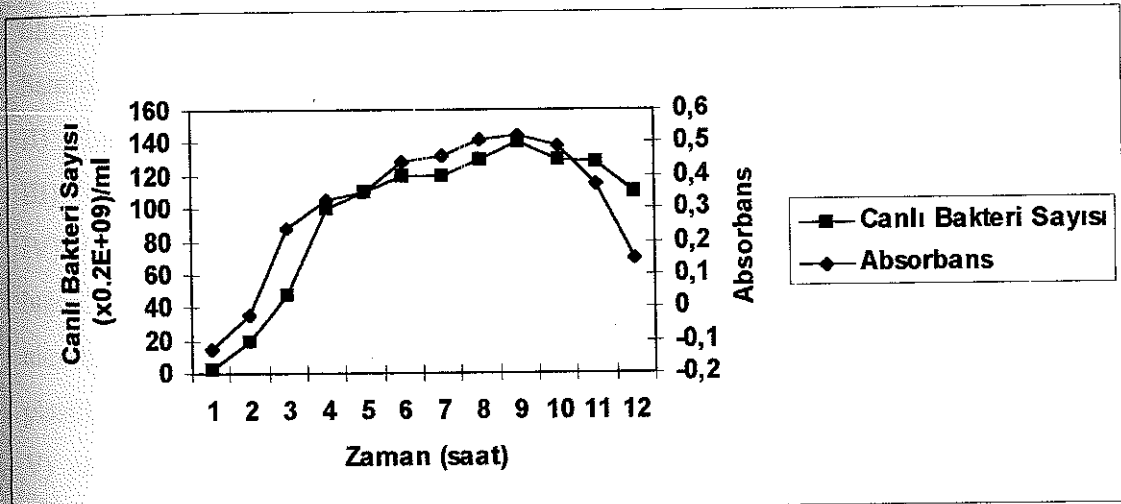
Zaman (saat)	Absorbans ($\lambda= 505 \text{ nm}$)	Canlı Bakteri Sayısı x ($0,2E+10$)/ml
1	-0.093	1
2	-0.007	2
3	0.280	8
4	0.401	10
5	0.477	18
6	0.531	25
7	0.557	26
8	0.617	30
9	0.626	31
10	0.699	30
11	0.710	34
12	0.757	34
13	0.791	34
14	0.809	32
15	0.814	34
16	0.835	40
17	0.845	44
18	0.865	34



Şekil 2.5 *Klebsiella pneumoniae*'nin Zamana Karşı Üreme Durumu

Çizelge 2.6. *Escherichia coli*'nin Zamana Karşı Üreme Durumu

Zaman (saat)	Absorbans ($\lambda= 506 \text{ nm}$)	Canlı Bakteri Sayısı x ($0,2E+09$)/ml
1	-0.126	3
2	-0.022	20
3	0.238	48
4	0.324	100
5	0.347	110
6	0.443	120
7	0.459	120
8	0.511	180
9	0.520	140
10	0.488	130
11	0.372	156
12	0.147	160



Şekil 2.6. *Escherichia coli*'nin Zamana Karşı Üreme Durumu

2.3. IAA, GA₃ ve ABA Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması İşlemleri

IAA, GA₃ ve ABA ekstraksiyonu ve saflaştırılması işlemleri Topcuoğlu ve Ünyayar (1995) ve Ünyayar vd (1996)'ne göre yapılmıştır. Bakterilerin hücre dışı kültür filtratı örneklerine ait materyalde IAA, GA₃ ve ABA ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan yöntem sırasıyla aşağıdaki gibi uygulanmıştır (Şekil 2.7) Deneyler üçer tekrarlı olarak yapılmıştır.

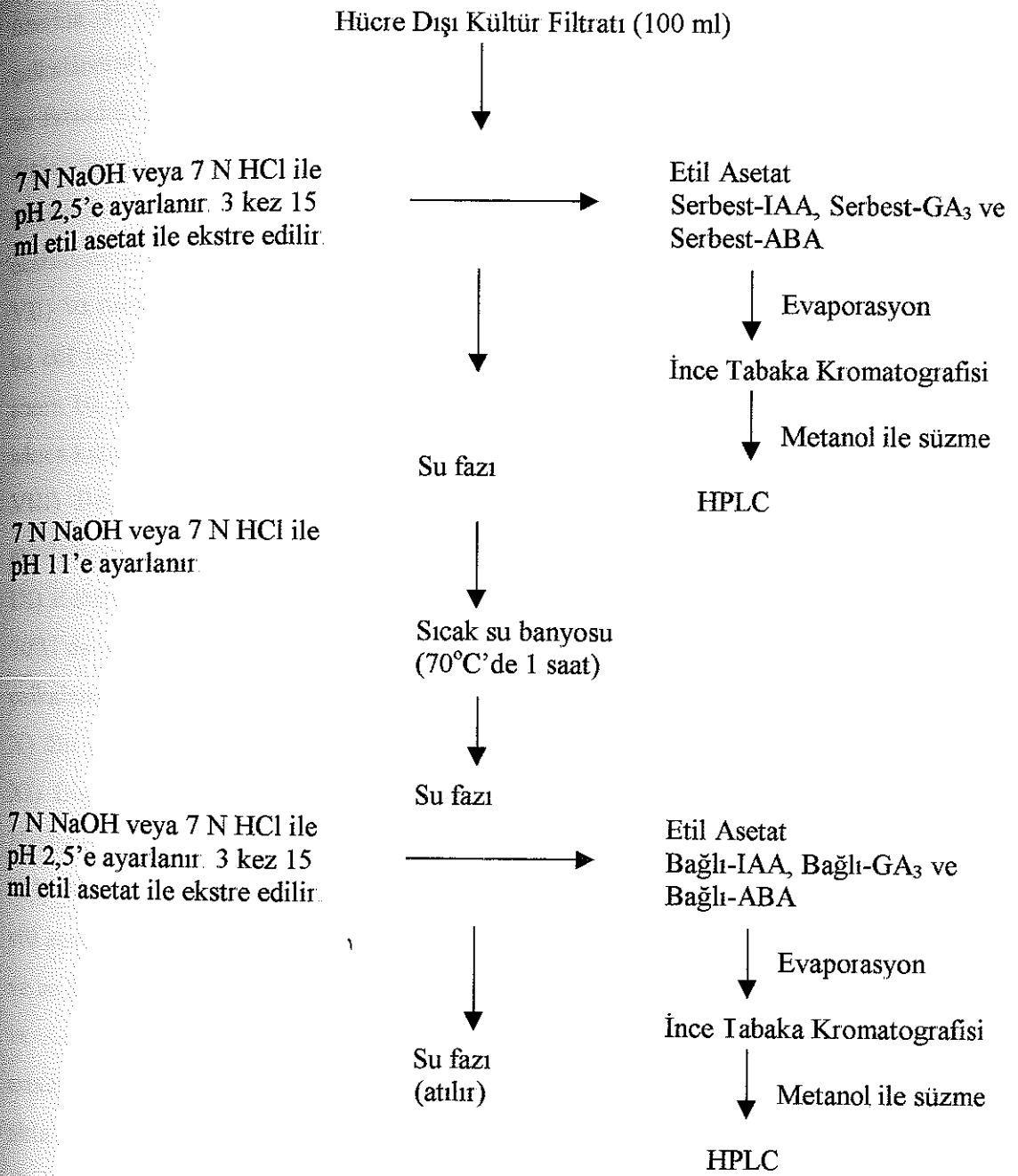
I) 100'er ml hücre dışı kültür filtratı örnekleri alınmış, her bir erlene antioksidan madde olarak 1 mg bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) konulmuştur. Büyüme hormonlarının ışıktan etkilenmemesi için erlenlerin etrafı alüminyum folyo ile sarılmıştır. Erlen içerisindeki hücre dışı kültür filtratı örnekleri 3600 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve bu hücre dışı kültür filtratı (HDKF)'na ait 100 ml süpernatant alınarak ekstraksiyon işlemi için kullanılmıştır. Santrifüj tüpü dibinde kalan tortu atılmıştır.

II) HDKF örneğinin pH'sı 7N HCl ve 7N NaOH kullanılarak 2.5'e ayarlanmıştır.

III) HDKF örneği 250 ml'lik ayırma hunisine alınmıştır.

IV) 100 ml'lik cam ekstraksiyon balonları hazırlanmıştır. Bunun için, ekstraksiyon balonları etil asetat ile çalkalanarak temizlenmiş ve ağızları açık kalacak şekilde dış tarafı alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Ekstraksiyon balonunun dik durabilmesi için de uygun plastik kaplara yerleştirilmiştir.

V) pH'sı 2.5'e ayarlanan ve 250 ml'lik ayırma hunilerine alınan herbir örnek üzerine 15 ml etil asetat konulmuştur. Bu ayırma hunileri kuvvetli olarak 3-4 kez çalkalanarak etil asetat ve su fazlarının homojen bir şekilde birbirine karıştırılması ve böylelikle su fazındaki IAA, GA₃ ve ABA'nın etil asetat fazına geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra, dinlenme sırasında etil asetat ve su fazları birbirinden net olarak ayrılmıştır. Ayırma hunisindeki musluk yardımıyla, altta kalan su fazı bir behere, üstteki etil asetat fazı ise daha önceden hazırlanan etiketli ekstraksiyon balonuna alınmıştır.



Şekil 2 7. Bitkisel Hormonlardan IAA, GA₃ ve ABA İçin Ekstraksiyon Şeması (Topcuoğlu ve Ünyayar 1995'ten değiştirilerek).

VI) Behere alınan ve pH'sı 2.5'e ayarlanmış su fazı tekrar ayırma hunisine alınmış ve üzerine 15 ml etil asetat konmuştur. Ayırma hunisi tekrar kuvvetli olarak 3-4 kez çalkalanarak etil asetat ve su fazının homojen bir şekilde birbirine karışması ve böylelikle su fazındaki IAA, GA₃ ve ABA'nın etil asetat fazına geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra dinlenme sırasında etil asetat ve su fazı birbirinden net olarak ayrılmıştır. Ayırma hunisindeki musluk yardımıyla, altta kalan su fazı bir behere, üstteki etil asetat fazı ise aynı ekstraksiyon balonuna alınmıştır.

VII) VI tekrarlanmıştır. Böylece 3 kez ekstraksiyon sonucu ekstraksiyon balonuna alınan bu etil asetat fazları içindeki IAA, GA₃ ve ABA, serbest-IAA, -GA₃, ve -ABA'dır. Daha sonra bu şekildeki ekstraksiyon balonlarının ağızları parafilmle ve alüminyum folyo ile sıkıca kapatıldıktan sonra +4°C'de evaporasyon işlemine kadar saklanmıştır.

VIII) Beherde kalan su fazlarının pH'sı 7N HCl veya 7N NaOH kullanılarak 11'e ayarlanmıştır.

IX) Beherlerin ağızları fazla sıkı olmamak üzere alüminyum folyo ile kapatılarak bir saat 70°C'de su banyosunda bırakılmış ancak beherler bu süre içerisinde her 10 dakikada bir çalkalanmıştır.

X) Bir saat sonra beherler sıcak su banyosundan çıkartılmış ve soğumaya bırakılmıştır.

XI) Bağlı-IAA, -GA₃ ve -ABA ekstraksiyonu için, beherde kalan su fazının pH'sı 7N NaOH ve 7N HCl kullanılarak 2.5'e ayarlanmıştır.

XII) pH'sı 2.5'e ayarlanan ve 250 ml'lik ayırma hunisine alınan su fazının üzerine 15 ml etil asetat konmuştur. Ayırma hunisi tekrar kuvvetli olarak 3-4 kez çalkalanarak etil asetat ve su fazının homojen bir şekilde birbirine karışması ve böylelikle su fazındaki IAA, GA₃ ve ABA'nın etil asetat fazına geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra dinlenme sırasında etil asetat ve su fazı birbirinden net olarak ayrılmıştır. Ayırma hunisindeki musluk yardımıyla, altta kalan su fazı bir behere, üstteki etil asetat fazı ise başka bir ekstraksiyon balonuna alınmıştır.

XIII) Behere alınan ve pH'sı 2.5'e ayarlanmış su fazı tekrar ayırma hunisine alınmış ve üzerine 15 ml etil asetat konmuştur. Ayırma hunisi tekrar kuvvetli olarak 3-4 kez çalkalanarak etil asetat ve su fazının homojen bir şekilde birbirine karışması ve böylelikle su fazındaki IAA, GA₃ ve ABA'nın etil asetat fazına geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra

dinlenme sırasında etil asetat ve su fazı birbirinden net olarak ayrılmıştır. Ayırma hunisindeki musluk yardımıyla, altta kalan su fazı bir behere, üstteki etil asetat fazı ise aynı ekstraksiyon balonuna alınmıştır

XIV) XIII tekrarlanmıştır. Böylece 3 kez ekstraksiyon sonucu ekstraksiyon balonuna alınan bu etil asetat fazları içindeki IAA, GA₃ ve ABA, bağlı-IAA, -GA₃ ve -ABA'dır. Daha sonra bu şekildeki ekstraksiyon balonlarının ağızları parafilmle ve alüminyum folyo ile sıkıca kapatıldıktan sonra +4°C'de buzdolabında evaporasyon işlemine kadar saklanmıştır.

XV) Beherde kalan su fazları atılmıştır.

2.4. Evaporasyon İşlemleri

Ekstraksiyon balonlarında bulunan serbest-IAA, -GA₃ ve -ABA ile bağlı-IAA, -GA₃ ve -ABA içeren kombine etil asetat fazları rota-evaporatör (Bibby marka) aleti ile 45°C'de su banyosu içinde tamamen kuruyuncaya kadar evapore edilmiştir. Evaporasyon işlemi sonunda örneklerin ince tabaka kromatografisi işlemleri yapılmıştır.

2.5. İnce Tabaka Kromatografisi İşlemleri

I) İnce tabaka kromatografisi cam plakları (20 x 20 cm) inorganik bir floresans bileşik içeren silikajel GF₂₅₄ (Merck) ile 0,25 mm kalınlığında kaplandıktan sonra aktivasyonu için 100°C'de 1 saat etüvde kurutulmuştur

II) Cam plakalar kenarlarından 2 mm kazınarak IAA, GA₃, ve ABA karışımı ekstraktın bant halinde ve 10⁻² M standart sentetik -IAA (Sigma I-2886), -GA₃ (Sigma G-7645) ve -ABA'nın (Sigma A-1049) nokta halinde uygulanabileceği şekilde iki bölüme ayrılmıştır

III) Ekstraksiyon balonlarında bulunan IAA, GA₃, ve ABA karışımı ekstraktlar her defasında 0.5 ml metanol ile çözülerek, iki defa çok ince uçlu pastör pipeti yardımıyla etiketlerine göre cam plakalar üzerine bant oluşturularak tatbik edilmiştir. Ayrıca, her cam plaka üzerine nokta halinde 10⁻² M standart sentetik -IAA, -GA₃ ve -ABA üstüste gelecek şekilde sırası ile ikişer damla uygulanmıştır

IV) Bu cam plakalar, içerisinde isopropanol: amonyak: distile su (10:1:1 v/v/v) karışımı solvent bulunan ince tabaka kromatografisi tankı içine yerleştirilmiştir. Cam plakalar, solvent sistemi tatbik noktasından itibaren 11 cm yükselinceye kadar tankın içinde bekletilmiştir. Solvent sisteminin yükselmesi tamamlandığında cam plakalar tanktan çıkarılmış ve bir vantilatör karşısında kurutulmuştur.

2.6. IAA, GA₃ ve ABA Bölgelerinin Ultraviyole (UV) Işığında Belirlenmesi

IAA, GA₃ ve ABA bölgelerinin belirlenebilmesi için plakalar karanlık odada 254 nm dalga boyundaki UV ışığında incelenmiştir. Plaka üzerinde mavi floresan renk veren ekstrakta ait IAA bölgesi ile standart sentetik IAA bölgesi ve mor floresan renk veren ekstrakta ait ABA bölgesi ile standart sentetik ABA bölgesi kıyaslanmış ve her iki IAA ve ABA bölgelerinin aynı Rf değerini verdiği gözlenmiştir. Numunelerdeki GA₃ bölgelerinin UV ışığında belirlenmesi için plaka üzerinde standart sentetik GA₃'ün tatbik edildiği bölüme %5 konsantre sülfürik asit (H₂SO₄) içeren etanol çözeltisi püskürtülerek standart sentetik GA₃ bölgesi görünür hale getirilmiştir. Mavi-yeşil renk veren standart sentetik GA₃ bölgesi belirlenerek elde edilen Rf değerine göre ekstrakta ait GA₃ bölgesi belirlenmiştir.

2.7. IAA, GA₃ ve ABA Bölgelerinin Kazınması ve Silikajelden Çözünmesi İşlemleri

UV ışığında belirlenen IAA, GA₃ ve ABA bölgeleri, standart sentetik-IAA, -GA₃ ve -ABA bölgelerinin altından ve üstünden geçen birer çizgi ile işaretlenmiştir. Cam plakalar üzerindeki işaretli IAA, GA₃ ve ABA bölgelerini içeren silikajel uygun bir kazıyıcı yardımıyla kazınarak her biri ayrı ayrı temiz bir kağıt üzerine alınmıştır. Kağıt üzerine alınan silikajel, boğaz kısımlarına cam pamuğu yerleştirilmiş pastör pipetlerine boşaltılmıştır. Pastör pipetlerindeki silikajelden 2 ml metanol geçirilerek IAA, GA₃ ve ABA 10 ml'lik etiketli cam tüplere alınmıştır. Cam tüpler içindeki metanol bir vantilatör karşısında uçurularak serbest- ve bağlı-IAA, -GA₃ ve -ABA kuru olarak elde edilmiştir.

İçinde kuru halde IAA, GA₃ ve ABA ekstraktı bulunan cam tüpler alüminyum folyoya sarılarak HPLC'de okununcaya kadar derin dondurucuda -15°C'de saklanmıştır.

2.8. IAA, GA₃ ve ABA Miktarlarının HPLC Tekniği ile Belirlenmesi

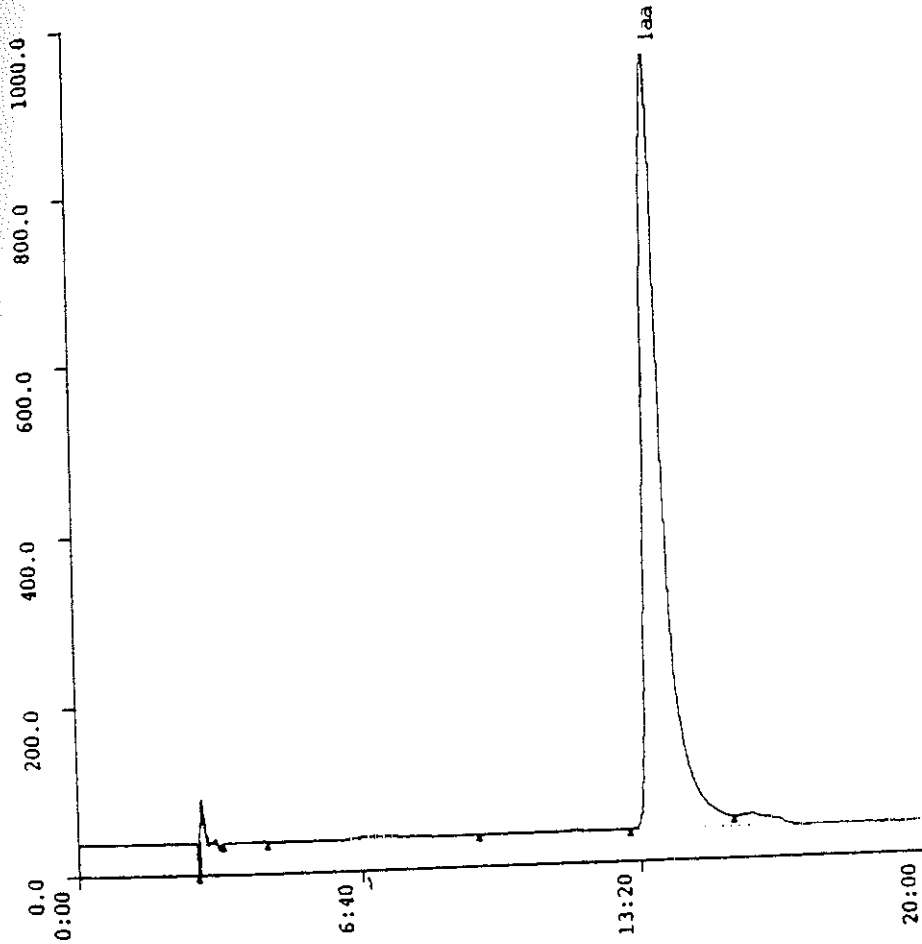
Cam tüpler içerisinde kuru halde bulunan IAA, GA₃ ve ABA ekstraktları 0,1 ml metanol ile çözülerek 0,45 µm por hacimli enjeksiyon filtreleriyle filtre edilmiştir. Toplam 216 adet örneğin herbiri zıt faz HPLC'ye (Cecil 1100 Series, HPLC kolonu: Supelcosil LC-18, 25 cm x 4,6 mm, 5 µm) 5 µl enjekte edilmiştir. Sürükleyici faz (bitki büyüme hormonlarının HPLC kolonunda sürüklenmesini sağlayan solvent) olarak IAA için metanol ve %1'lik asetik asit çözeltisi (35:65 v/v), GA₃ için metanol ve bidistile su (30:70 v/v, fosforik asitle pH 3'e ayarlanmıştır) ve ABA için metanol ve 0,1 M asetik asit çözeltisi (55:45 v/v) kullanılmıştır. Sürükleyici fazda kullanılan metanol HPLC çalışmaları için hazırlanmış saflıktadır. Ultraviyole (UV) maksimum absorpsiyon dalga boyları, IAA için 280 nm, GA₃ için 208 nm ve ABA için 265 nm'ye ayarlanmıştır (Ülger vd 1999).

IAA, GA₃ ve ABA miktarları elde edilen piklerin alanı üzerinden µg/100ml olarak hesaplanmıştır. Bazı standart sentetik ve örnek IAA, GA₃ ve ABA kromatogramları Şekil 2.8, 2.9, 2.10, 2.11, 2.12 ve 2.13'te gösterilmiştir. Bakterilere ait oksin, gibberellin ve absisik asit miktarları standart sentetik -IAA, -GA₃ ve -ABA'ya eşdeğer olarak ifade edilmiştir (Çizelge 2.7).

2.9. İstatistiksel Analizler

Verilerin ortalamaları (\bar{x}) ve standart hata (S_x) değerleri hesaplanmıştır (Özdamar 1989). Bu hesaplamalarda Microsoft Excel 97 bilgisayar programı kullanılmıştır.

Cgm - qqq000.^PM ID - iaalSTANDARD recorded - 24/04/100 02:24:32
 printed - 24/04/100 02:40:38 R Method - 1 P Method - 1

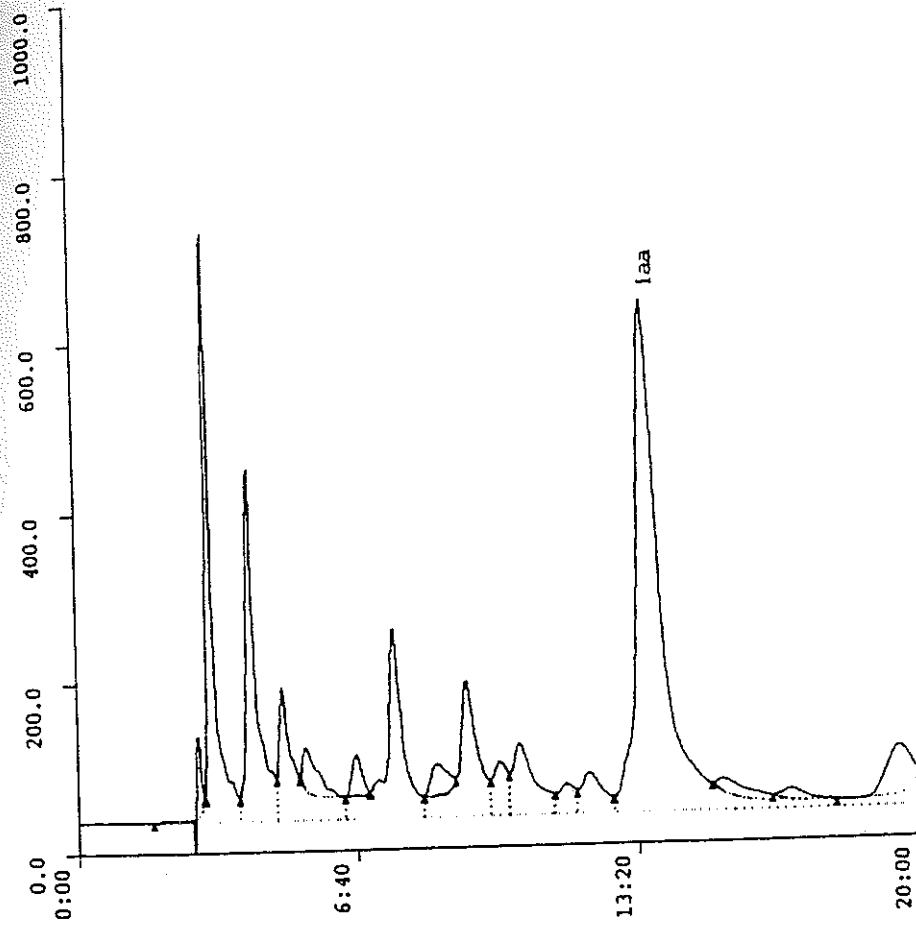


Results for Sample iaal (qqq000.^PM) STANDARD
 Recorded 24/04/100 02:24:32 Printed 24/04/100 02:40:39

No.	Time	Name	Area	Height	ppm Type
1	2:50.8	***	147068.80	52071	0.00 P P
2	7:03.6	***	375404.81	3556	0.00 B B
3	13:44.9	iaa	28933414.00	911935	2.00 B P

Şekil 2.8 Standart-Sentetik IAA Kromatogramı

qgm - qqq040.TPM ID - Pvulq12S3iaa UNKNOWN recorded - 24/04/100 03:28:33
 printed - 24/04/100 03:53:43 R Method - 1 P Method - 1

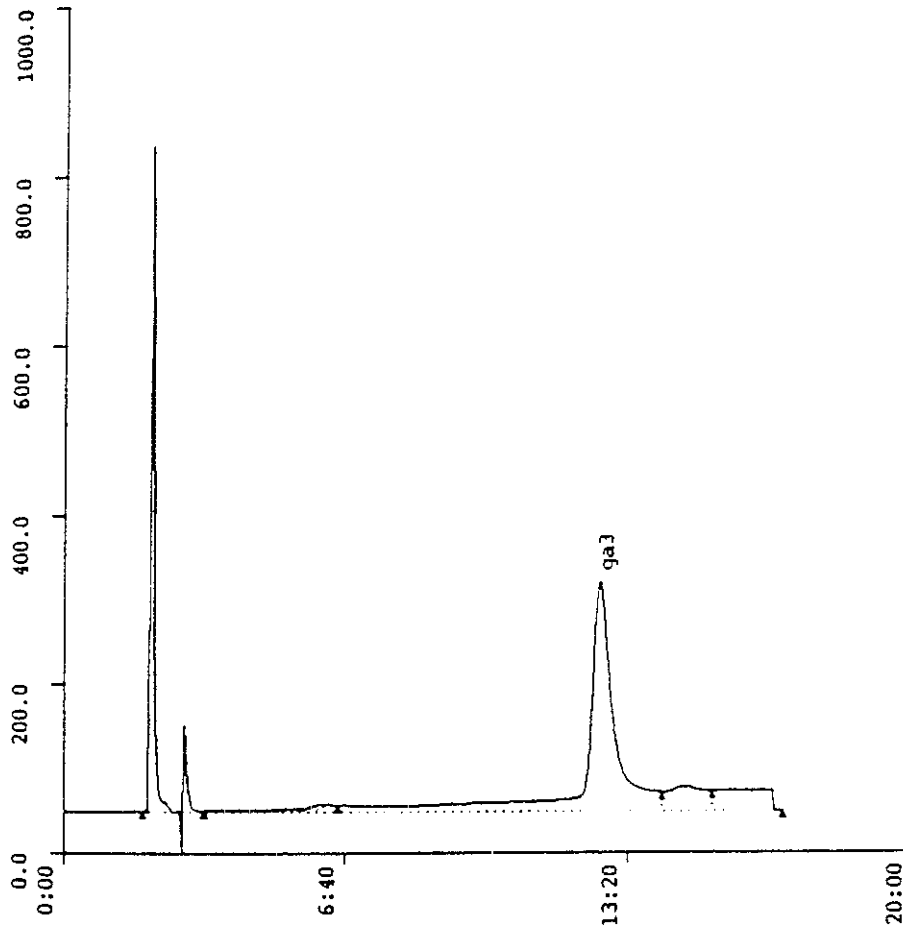


Results for Sample Pvulq12S3iaa (qqq040.TPM) UNKNOWN
 Recorded 24/04/100 03:28:33 Printed 24/04/100 03:53:44

No.	Time	Name	Area	Height	ppm	Type
1	2:52.8	***	522861.44	100776	0.00	PE
2	3:10.7	***	7823449.50	693809	0.00	EP
3	4:08.9	***	7087885.50	414589	0.00	PP
4	4:55.6	***	4911731.00	156761	0.00	PE
5	5:28.3	***	1208562.63	86891	0.00	EP
6	6:39.3	***	722226.75	75625	0.00	PE
7	7:33.1	***	5694326.00	223192	0.00	EP
8	8:32.0	***	977617.94	63723	0.00	PE
9	9:16.1	***	4178635.50	160492	0.00	EP
10	10:00.3	***	1457273.00	64534	0.00	PP
11	10:28.4	***	3152038.50	85339	0.00	PP
12	11:36.3	***	1006882.56	35539	0.00	PP
13	12:09.6	***	1795857.88	49268	0.00	PP
14	13:35.3	iaa	26298670.00	604175	1.97	PE

Şekil 2 9. *Proteus vulgaris*'in Sekonder Metabolizma Dönemi 12. Saat'te Serbest-
 IAA Kromatogramı

Çgm - uy010.7PM ID - ga2STANDARD recorded - 24/04/100 08:25:18
 printed - 24/04/100 08:42:24 R Method - 1 P Method - 1

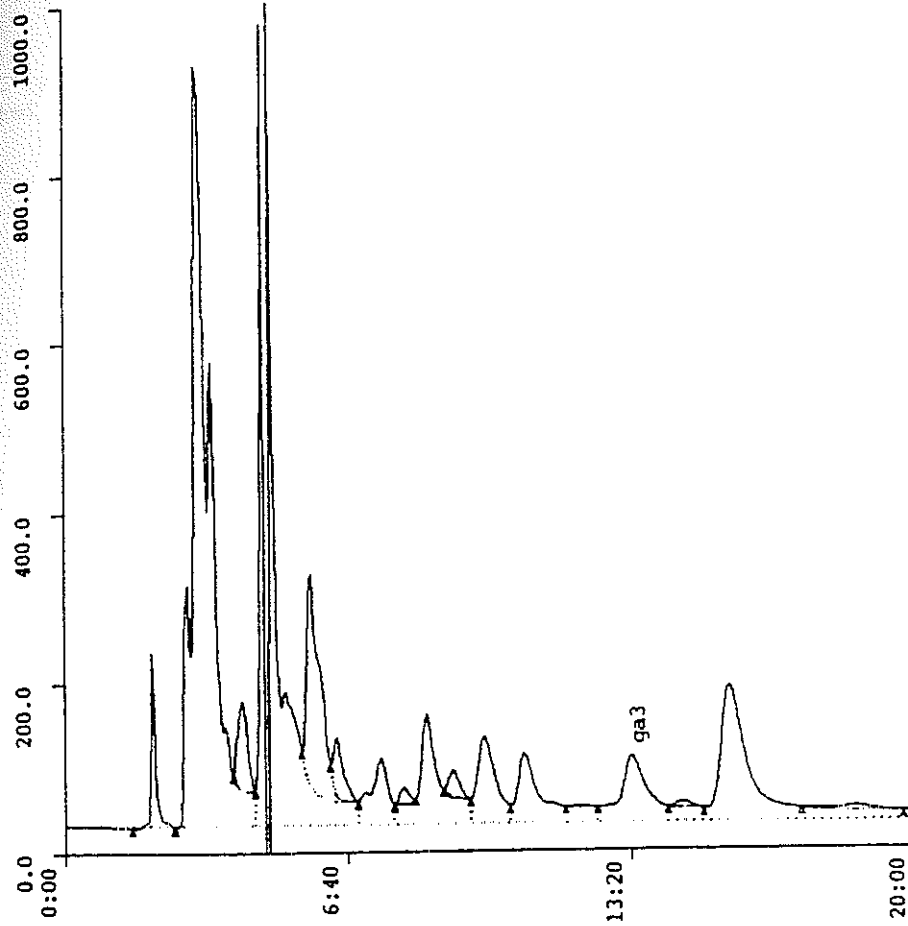


Results for Sample ga2 (uy010.7PM) STANDARD
 Recorded 24/04/100 08:25:18 Printed 24/04/100 08:42:25

No.	Time	Name	Area	Height	ppm	Type
1	2:04.2	***	4823644.50	787419	0.00	P P
2	6:10.0	***	279867.38	9038	0.00	P E
3	12:40.6	ga3	12794939.00	271449	0.40	E P
4	14:37.8	***	1797843.75	29393	0.00	P P
5	15:52.7	***	2061155.88	25320	0.00	P B

Şekil 2.10 Standart-Sentetik GA₃ Kromatogramı

Cgm - uy000.~PM ID - Bmega6B2ga UNKNOWN recorded - 24/04/100 09:09:51
 printed - 24/04/100 09:35:01 R Method - 1 P Method - 1

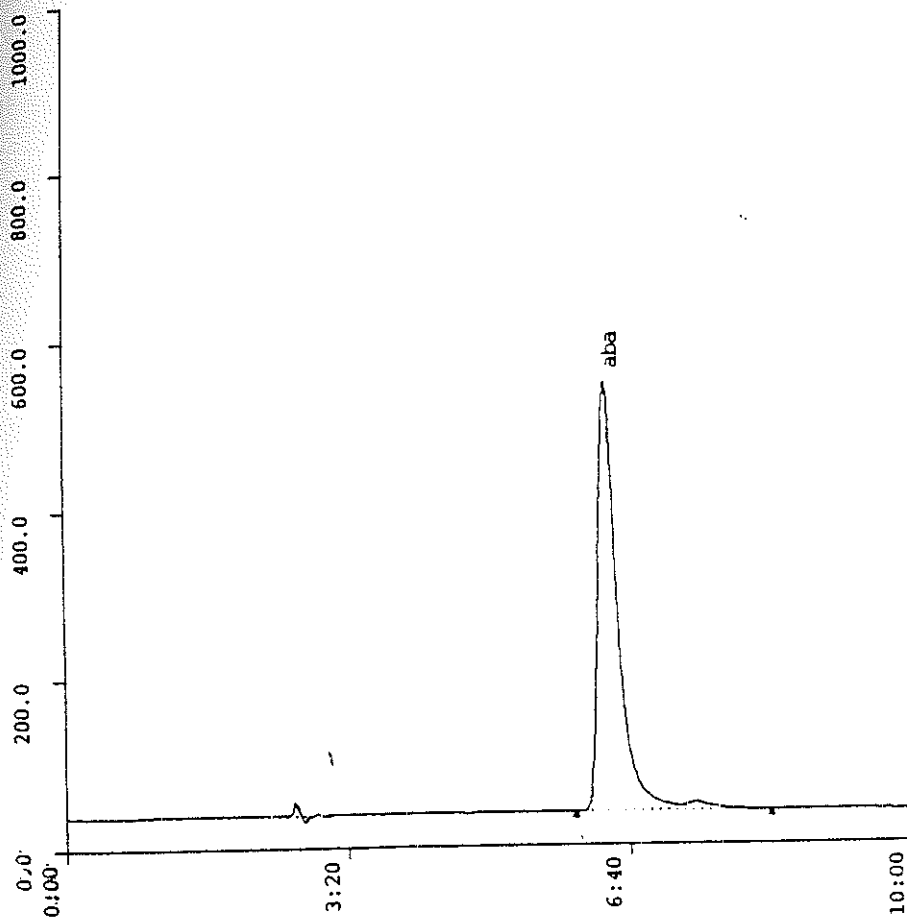


Results for Sample Bmega6B2ga (uy000.~PM) UNKNOWN
 Recorded 24/04/100 09:09:51 Printed 24/04/100 09:35:02

No.	Time	Name	Area	Height	ppm	Type
1	2:04.1	***	1266076.13	203957	0.00	P P
2	3:10.0	***	26362572.00	892845	0.00	P E
3	4:11.5	***	1561171.00	145569	0.00	E P
4	4:51.8	***	16077910.00	978049	0.00	P E
5	5:48.8	***	5425730.00	293739	0.00	E E
6	6:25.2	***	1017747.19	102878	0.00	E P
7	7:26.0	***	2278242.00	78102	0.00	P P
8	7:57.4	***	266799.53	43360	0.00	P E
9	8:31.3	***	4185307.00	128641	0.00	E E
10	9:07.8	***	516879.41	62417	0.00	E P
11	9:51.3	***	3033903.25	103498	0.00	P P
12	10:47.0	***	3773339.25	82111	0.00	P E
13	12:04.4	***	13503.50	19723	0.00	E P
14	13:20.6	ga3	4372929.50	78729	0.15	P B

Şekil 2 11. *Bacillus megaterium*'un Primer Metabolizma Dönemi 6. Saat'te Bağlı-GA₃ Kromatogramı

Con - tyt010.™PM ID - aba2STANDARD recorded - 23/04/100 19:24:38
Printed - 23/04/100 19:34:41 R Method - 1 P Method - 1

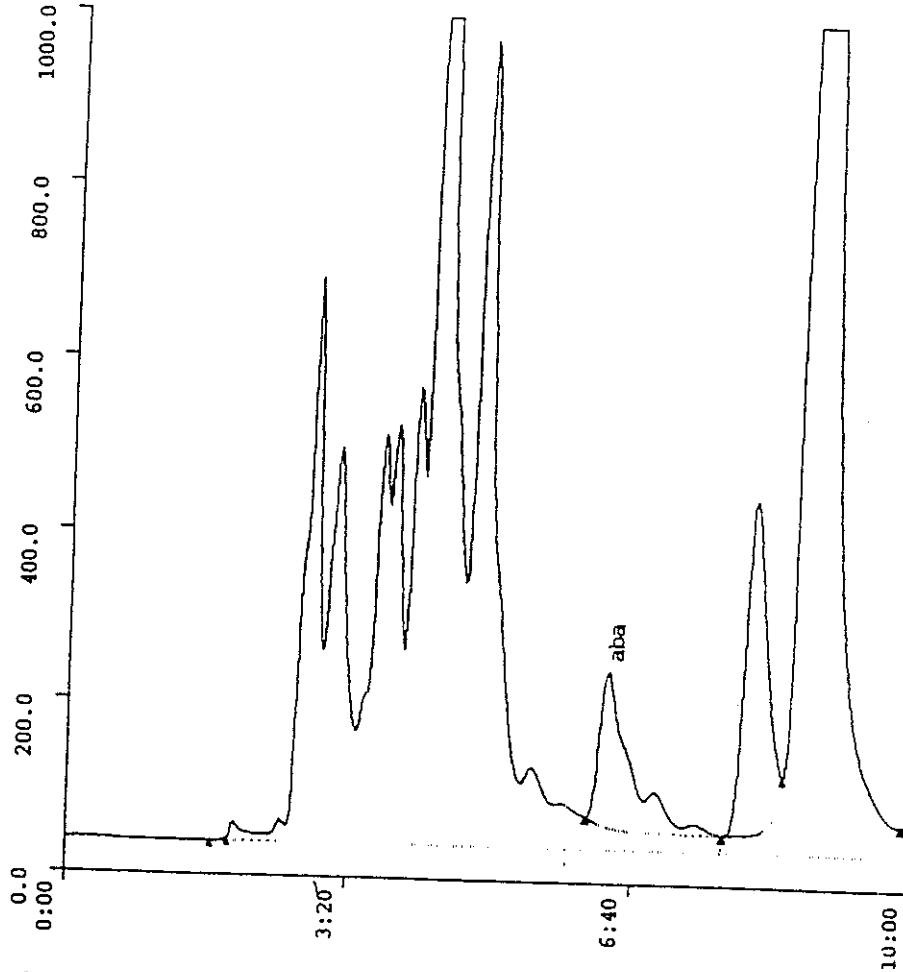


Results for Sample aba2 (tyt010.™PM) STANDARD
Recorded 23/04/100 19:24:38 Printed 23/04/100 19:34:42

No.	Time	Name	Area	Height	ppm Type
1	6:24.2	aba	8146554.00	509256	0.25 B B

Şekil 2.12. Standart Sentetik ABA Kromatogramı

Cgm - tyt060.PM ID - Pmir6Slaba UNKNOWN recorded - 23/04/100 21:21:52
printed - 23/04/100 21:46:58 R Method - 1 P Method - 1



Results for Sample Pmir6Slaba (tyt060.PM) UNKNOWN
Recorded 23/04/100 21:21:52 Printed 23/04/100 21:46:59

No.	Time	Name	Area	Height	ppm	Type
1	1:59.6	***	-22108.80	22430	0.00	B E
2	4:49.2	***	72540360.00	933614	0.00	E E
3	6:22.7	aba	4493961.00	205779	0.14	E P
4	8:03.8	***	6867533.50	412303	0.00	P E
5	8:38.4	***	34795756.00	1039681	0.00	E E
6	10:09.9	***	887100.06	41861	0.00	E E

Şekil 2 13 *Proteus mirabilis*'in Primer Metabolizma Dönemi 6. Saat'te Serbest-ABA Kromatogramı

3. BULGULAR

Bulgularımızdaki toplam-IAA, -GA₃ ve -ABA miktarları serbest- ve bağlı- IAA, -GA₃ ve -ABA değerlerinin toplamını ifade etmektedir.

3.1. Bakterilerde IAA, GA₃ ve ABA Miktarları

Çalışmada kullanılan çeşitli bakteri türlerinin primer ve sekonder metabolizma dönemlerindeki hücre dışı kültür filtratı örneklerinde bulunan serbest-, bağlı- ve toplam- IAA, -GA₃ ve -ABA eşdeğer miktarları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

3.1.1. IAA miktarı

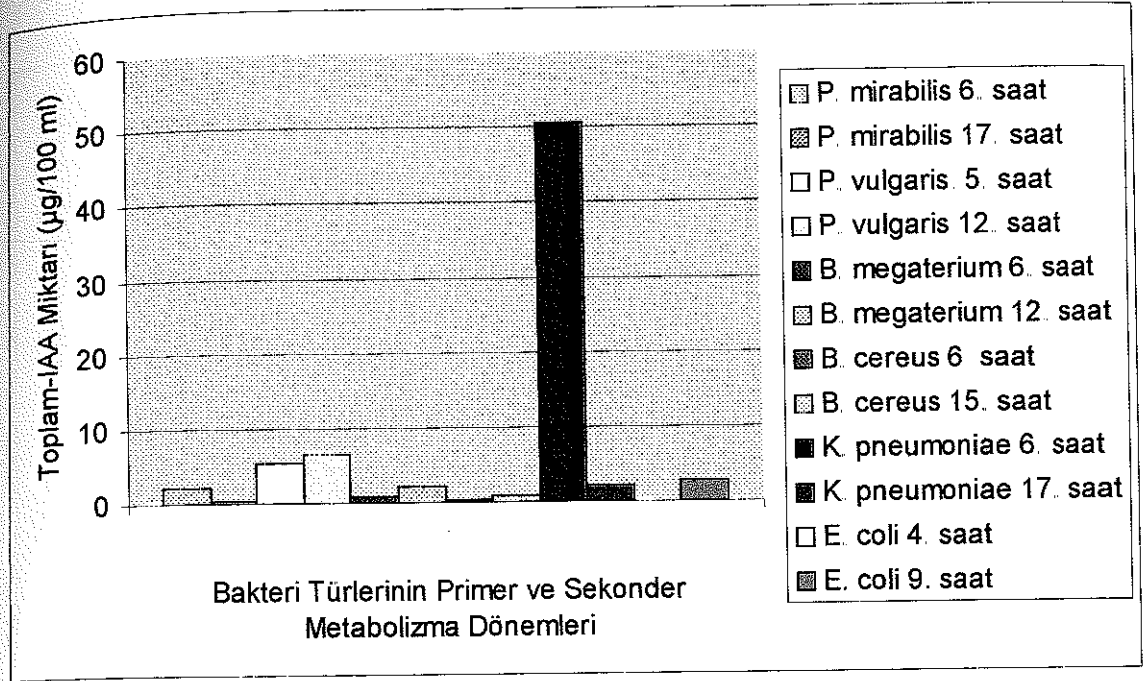
Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1'de görüldüğü gibi, çalışmada kullanılan bakteri türlerinin primer ve sekonder dönemlerindeki hücre dışı kültür filtratı örneklerinde bulunan serbest- bağlı- ve toplam-IAA miktarları sırasıyla; *Proteus mirabilis*'te 6. saat'te 2,21 µg/100ml, bağlı formda belirlenememiştir ve 2,21 µg/100ml; 17 saat'te 0,03 µg/100ml, 0,14 µg/100ml, ve 0,17 µg/100ml; *P. vulgaris*'te 5. saat'te 4,75 µg/100ml, 0,59 µg/100ml ve 5,34 µg/100ml; 12. saat'te 6,08 µg/100ml, 0,41 µg/100ml ve 6,49 µg/100ml; *Bacillus megaterium*'da 6 saat'te 0,55 µg/100ml, 0,37 µg/100ml ve 0,92 µg/100ml; 12. saat'te 1,49 µg/100ml, 0,66 µg/100ml ve 2,15 µg/100ml; *B. cereus*'da 6. saat'te serbest formda belirlenememiştir, 0,18 µg/100ml ve 0,18 µg/100ml; 15. saat'te 0,54 µg/100ml, 0,25 µg/100ml ve 0,79 µg/100ml; *Klebsiella pneumoniae*'de 6 saat'te 49,56 µg/100ml, 1,12 µg/100ml ve 50,68 µg/100ml; 17 saat'te serbest formda belirlenememiştir, 2,19 µg/100ml ve 2,19 µg/100ml; *Escherichia coli*'de 4. saat'te 0,06 µg/100ml, bağlı formda belirlenememiştir ve 0,06 µg/100ml; 9. saat'te 1,87 µg/100ml, 0,73 µg/100ml ve 2,60 µg/100ml olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1'de görüldüğü gibi, toplam-IAA miktarı bakımından en yüksek değere *K. pneumoniae*'nin 6. saat örneklerinde rastlanırken en düşük değere *E. coli*'nin 4 saat örneklerinde rastlanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türlerinin Primer ve Sekonder Metabolizma Dönemlerinde Hücre Dışı Kültür Filtratu (HDKF) Örneklerinde Bulunan Serbest-, Bağlı- ve Toplam-IAA, -GA₃ ve -ABA Eşdeğer Miktarları (Değerler 3 Tekrarın Ortalaması±Standart Hata Olarak Verilmiştir).

* HDKF Örneklerinde Hormon Belirlenememiştir.

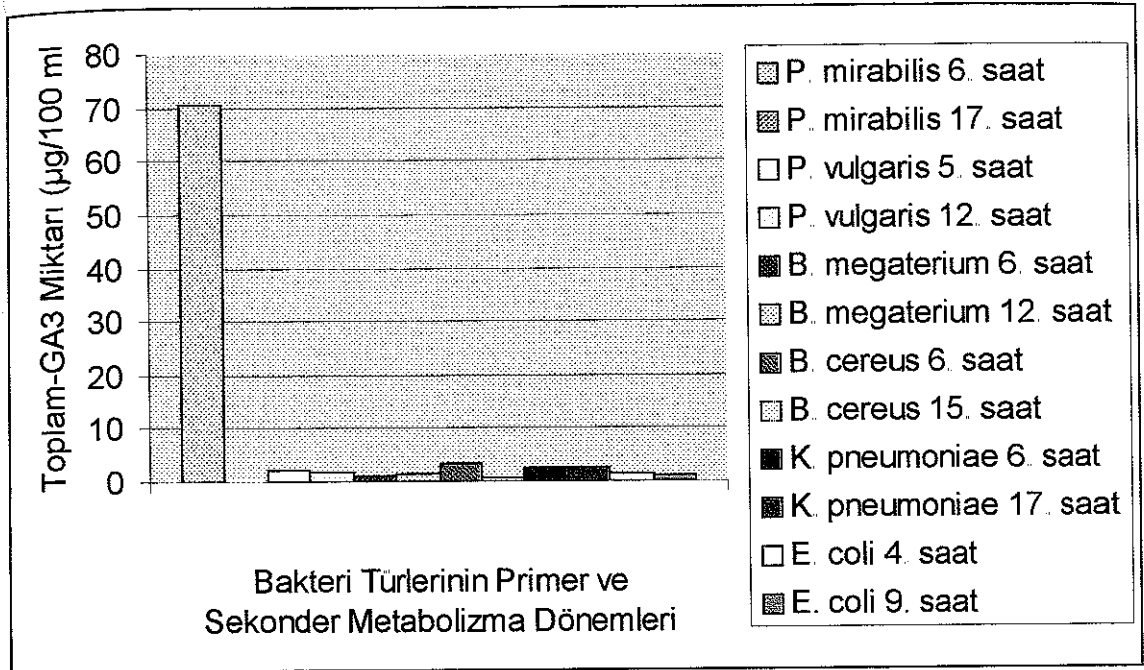
BÜYÜME HORMONLARI	BÜYÜME HORMONU FORMU	BÜYÜME HORMONLARININ EŞDEĞER MIKTARI (µg/100ml)																				
		P. mirabilis						P. vulgaris			B. megaterium			B. cereus			K. pneumoniae			E. coli		
		6. saat	17. saat	5. saat	12. saat	6. saat	12. saat	6. saat	6. saat	15. saat	6. saat	6. saat	17. saat	6. saat	4. saat	9. saat						
IAA	Serbest-IAA	2,21±1,18	0,03±0,03	4,75±1,47	6,08±0,00	0,55±0,12	1,49±0,26	*	0,54±0,06	49,56±19,88	*	0,06±0,01	1,87±0,16									
	Bağlı- IAA	*	0,14±0,02	0,59±0,11	0,41±0,03	0,37±0,21	0,66±0,09	0,18±0,02	0,25±0,00	1,12±0,22	2,19±0,25	*	0,73±0,08									
	Toplam-IAA	2,21±1,18	0,17±0,03	5,34±1,59	6,49±0,00	0,92±0,10	2,15±0,35	0,18±0,02	0,79±0,06	50,68±19,89	2,19±0,25	0,06±0,01	2,60±0,13									
GA ₃	Serbest-GA ₃	36,00±0,43	*	1,29±0,15	0,74±0,12	0,54±0,07	0,75±0,20	0,48±0,05	0,46±0,04	1,14±0,22	0,70±0,09	0,90±0,12	0,36±0,00									
	Bağlı-GA ₃	34,52±1,87	*	1,01±0,21	1,00±0,17	0,66±0,03	0,85±0,13	3,03±1,88	0,38±0,01	1,37±0,51	2,04±0,07	0,63±0,01	0,76±0,02									
	Toplam-GA ₃	70,52±1,87	*	2,30±0,35	1,74±0,17	1,20±0,07	1,60±0,22	3,51±1,84	0,84±0,03	2,51±0,52	2,74±0,06	1,53±0,10	1,12±0,02									
ABA	Serbest-ABA	4,20±1,75	*	0,44±0,02	*	0,03±0,00	0,04±0,01	0,03±0,01	*	0,08±0,03	0,46±0,07	1,36±0,81	*									
	Bağlı-ABA	*	*	*	*	0,03±0,00	0,03±0,00	*	*	0,13±0,03	0,45±0,03	0,09±0,00	0,09±0,00									
	Toplam-ABA	4,20±1,75	*	0,44±0,02	*	0,06±0,00	0,07±0,00	0,03±0,01	*	0,21±0,04	0,91±0,10	1,45±1,00	0,09±0,00									



Şekil 3.1 Çalışmada Kullanılan Bakteri Türlerinin Primer ve Sekonder Metabolizma Dönemlerindeki Toplam-IAA Miktarları

3.1.2. GA₃ miktarı

Çizelge 3.1 ve Şekil 3.2'de görüldüğü gibi, çalışmada kullanılan bakteri türlerinin primer ve sekonder dönemlerindeki hücre dışı kültür filtratı örneklerinde bulunan serbest- bağı- ve toplam- GA₃ miktarları sırasıyla; *Proteus mirabilis*'te 6. saat'te 36,00 µg/100ml, 34,52 µg/100ml ve 70,52 µg/100ml; 17. saat'te GA₃ belirlenememiştir; *P. vulgaris*'te 5 saat'te 1,29 µg/100ml, 1,01 µg/100ml ve 2,30 µg/100ml; 12 saat'te 0,74 µg/100ml, 1,00 µg/100ml ve 1,74 µg/100ml; *Bacillus megaterium*'da 6 saat'te 0,54 µg/100ml, 0,66 µg/100ml ve 1,20 µg/100ml; 12 saat'te 0,75 µg/100ml, 0,85 µg/100ml ve 1,60 µg/100ml; *B. cereus*'ta 6 saat'te 0,48 µg/100ml, 3,03 µg/100ml ve 3,51 µg/100ml; 15. saat'te 0,46 µg/100ml, 0,38 µg/100ml ve 0,84 µg/100ml; *Klebsiella pneumoniae*'de 6 saat'te 1,14 µg/100ml, 1,37 µg/100ml ve 2,51 µg/100ml; 17. saat'te 0,70 µg/100ml, 2,04 µg/100ml ve 2,74 µg/100ml; *Escherichia coli*'de 4 saat'te 0,90 µg/100ml, 0,63 µg/100ml ve 1,53 µg/100ml; 9 saat'te 0,36 µg/100ml, 0,76 µg/100ml ve 1,12 µg/100ml olarak bulunmuştur.

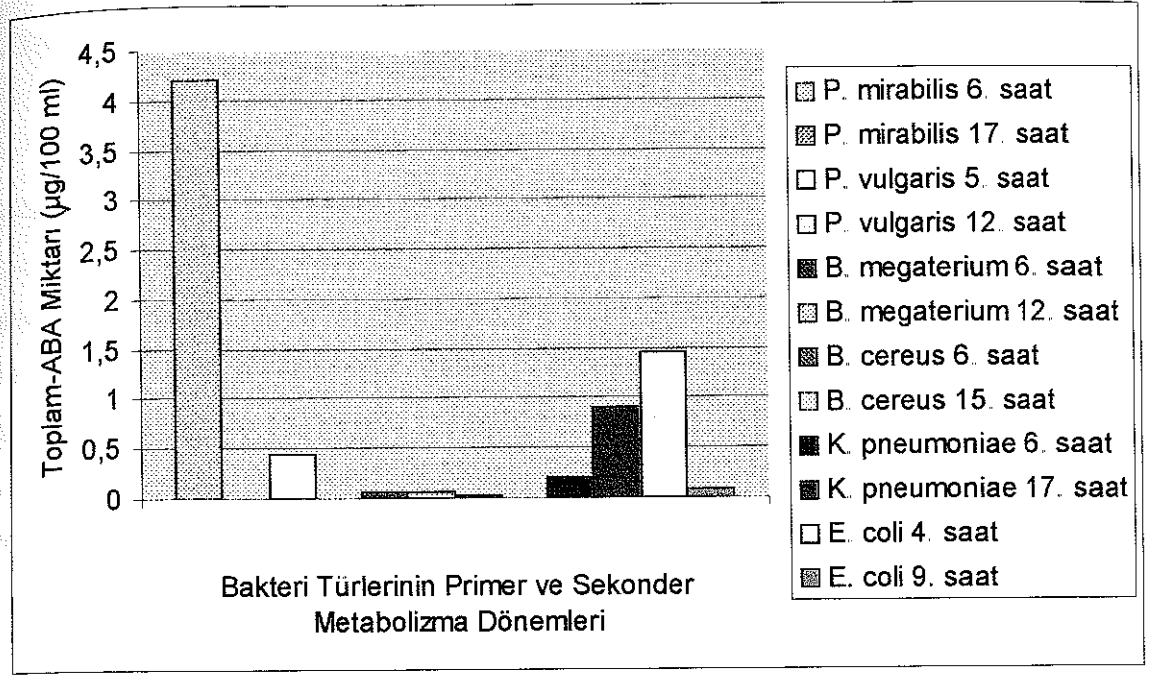


Şekil 3.2 Çalışmada Kullanılan Bakteri Türlerinin Primer ve Sekonder Metabolizma Dönemlerindeki Toplam-GA₃ Miktarları

Çizelge 3.1 ve Şekil 3.2’de görüldüğü gibi, toplam-GA₃ miktarı bakımından en yüksek değere *P. mirabilis*’in 6. saat örnekleri sahipken en düşük değere *B. cereus*’un 15. saat örneklerinde rastlanılmıştır. *P. mirabilis*’in 17. saat örneklerinde ise GA₃ belirlenememiştir.

3.1.3. ABA miktarı

Çizelge 3.1 ve Şekil 3.3’te görüldüğü gibi, çalışmada kullanılan bakteri türlerinin primer ve sekonder dönemlerindeki hücre dışı kültür filtratı örneklerinde bulunan serbest- bağlı- ve toplam- ABA miktarları sırasıyla; *Proteus mirabilis*’te 6. saat’te 4,20 µg/100ml, bağlı formda belirlenememiştir, 4,20 µg/100ml; 17 saat’te ABA belirlenememiştir; *P. vulgaris*’te 5 saat’te 0,44 µg/100ml, bağlı formda belirlenememiştir ve 0,44 µg/100ml; *P. vulgaris*’te 12. saat’te ABA belirlenememiştir;



Şekil 3.3. Çalışmada Kullanılan Bakteri Türlerinin Primer ve Sekonder Metabolizma Dönemlerindeki Toplam-ABA Miktarları

Bacillus megaterium'da 6. saat'te 0,03 µg/100ml, 0,03 µg/100ml ve 0,06 µg/100ml; 12 saat'te 0,04 µg/100ml, 0,03 µg/100ml ve 0,07 µg/100ml; *Bacillus cereus*'ta 6 saat'te 0,03 µg/100ml, bağlı formda belirlenememiştir, 0,03 µg/100ml; 15. saat'te ABA belirlenememiştir; *Klebsiella pneumoniae*'de 6. saat'te 0,08 µg/100ml, 0,13 µg/100ml ve 0,21 µg/100ml; 17 saat'te 0,46 µg/100ml, 0,45 µg/100ml ve 0,91 µg/100ml; *Escherichia coli*'de 4. saat'te 1,36 µg/100ml, 0,09 µg/100ml ve 1,45 µg/100ml; 9. saat'te serbest formda belirlenememiştir, 0,09 µg/100ml ve 0,09 µg/100ml olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.1 ve Şekil 3.3'te görüldüğü gibi, toplam-ABA miktarı bakımından en yüksek değere *P. mirabilis*'in 6 saat örnekleri sahipken en düşük değere *B. cereus*'un 6. saat örneklerinde rastlanılmıştır. *P. mirabilis*'in 17. saat, *P. vulgaris*'in 12 saat ve *B. cereus*'un 15. saat örneklerinde ise ABA belirlenememiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatür bilgilerine göre, çalışmamızda kullanılan bakteri türlerinde büyüme hormonlarından IAA, GA₃ ve ABA üretimi, izolasyonu ve miktar tayini konusunda dünyada henüz bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bakteri türlerinde IAA, GA₃ ve ABA üretimi, izolasyonu ve miktar tayini ve buna bağlı olarak en yüksek IAA, GA₃ ve ABA düzeylerinin elde edilebileceği bakteri türlerinin belirlenmesine katkı getirebilmek amacıyla yapılan bu çalışmada, bulgularımıza göre (Çizelge 3 1, Şekil 3 1, 3 2, 3 3) çalışmada kullanılan bakteri türlerinde IAA, GA₃ ve ABA üretiminin olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 3 1 ve Şekil 3 1'de de görüldüğü gibi, toplam-IAA miktarı en yüksek düzeyde *K. pneumoniae*'de 6 saat'te (50,68 µg/100ml) bulunurken, en düşük düzeyde *E. coli*'de 4. saat'te (0,06 µg/100ml) belirlenmiştir. Diğer bakteri türlerinde de değişik miktarlarda IAA saptanmıştır. *P. mirabilis*'in 6. saat örneklerinde ve *E. coli*'nin 4. saat örneklerinde bağlı formda, *B. cereus*'un 6. saat örneklerinde ve *K. pneumoniae*'nin 17. saat örneklerinde serbest formda IAA belirlenememiştir.

Oksinlerden IAA'nın değişik bakteri türlerinde varlığı çeşitli araştırmacılar (Martinez-Toledo 1988, Davies 1995) tarafından gösterilmiştir.

Örneğin bir çalışmada Fett vd (1987), % 0,05 triptofanlı ortamda *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*'in değişik suşlarının sıvı kültür ortamında 0,03 µg/ml – 6,37 µg/ml arasında IAA belirlemiştir. Başka bir çalışmada Minamisava ve Fukai (1991), *Bradyrhizobium japonicum* genotip II suşunun sıvı kültür ortamında 20 µM'dan fazla IAA'ya rastlamışlardır.

Wang vd (1982) yaptıkları bir çalışmada ise *Rhizobium leguminosarum*'un triptofanlı kültür ortamında 3,54 ng/cm³ – 849 ng/cm³, triptofansız kültür ortamında ise 0,25- 0,81 ng/cm³ düzeylerinde IAA bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda bakteri üretiminde kullanılan gerek katı (Nutrient Agar) gerekse sıvı (Brain Hearth Infusion Broth) besiyerlerinin bileşiminde triptofan bulunmadığı dikkate alınırsa çalışmamız sonucu bakterilerin üretmiş oldukları IAA miktarının Wang vd (1982)'nin buldukları miktarlardan daha fazla olduğunu söyleyebiliriz.

Sequeira (1964) adlı araştırmacı ise çalışmasında *Pseudomonas solanacearum*'la enfekte olan tütün bitkisinde IAA inhibitörlerinin bulunduğu ortamda IAA miktarını 0,60 µg/ml- 28,5 µg/ml arasında bulurken IAA inhibitörünün bulunmadığı ortamda IAA miktarını 30,5 µg/ml olarak bulmuştur.

Epstein vd (1991) *Agrobacterium rhizogenes*'le inoküle edilen havuç dokusunda IAA düzeyinde önemli bir artış olduğunu ortaya koymuşlardır. Kontrol grubunda IAA düzeyi 12,7±2,2 ng/g taze ağırlık iken test grubunda IAA düzeyi 31,5±1,9 ng/g taze ağırlık olarak bulunmuştur. Yani bakteriyel olarak sentezlenen IAA miktarının yaklaşık 20 ng/g taze ağırlık olduğu söylenebilir. Ancak inokülasyondan sonra gerçekleşen metabolik olayları düşünerek olursak IAA miktarındaki artışın bitkinin kendi metabolizmasının sonucu mu yoksa bakteriyel metabolizmanın sonucu mu olduğunu söylemek zor olabilir. Yine benzer bir çalışma da Schaerer ve Pilet (1993) tarafından yapılmıştır. Bu alışmada *Agrobacterium rhizogenes* tarafından transforme olmamış ve transforme olmuş (hairy root hastalığına yakalanmış) bitki kùltür ortamında IAA miktarları sırasıyla 8,5 ng/g kuru ağırlık ve 1334,3 ng/g kuru ağırlık olarak bulunmuştur.

Tüm bu çalışmalar da, çalışmamızda kullanılan bakteri türlerinin IAA üretimiyle ilgili bulgularımızı destekler niteliktedir.

Bakterilerde serbest- ve bağlı-GA₃ miktarları incelendiğinde *P. mirabilis*'in 17 saat örnekleri hariç diğer bütün türlerin primer ve sekonder metabolizma dönemlerinde GA₃ üretildiği sonucu ortaya çıkmaktadır. Çizelge 3 1 ve Şekil 3 2'de de görüldüğü gibi toplam-GA₃ miktarı bakımından en yüksek değere *P. mirabilis*'in 6 saat örnekleri (70,52 µg/100ml) sahipken en düşük değere *B. cereus*'un 15 saat örneklerinde (0,84 µg/100ml) rastlanılmıştır. Bakterilerde gibberellin varlığına dair pek fazla çalışmaya rastlanılmamıştır. Bakterilerde gibberellin varlığıyla ilgili yapılan çalışmalardan örneğin Bottini vd. (1989), *Azotobacter lipoferum* ile yaptıkları bir çalışmada gaz kromatografisi-kùtle spektroskopisi (GC-MS) tekniğini kullanmışlar ve bakterinin kùltür ortamında GA₁ ve GA₃ miktarlarını 20-40 pikogram/ml düzeyinde bulmuşlardır. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre, çalışmada kullanılan bakteri türlerinde bulunduğumuz gibberellin (GA₃) miktarlarının (2,30 µg/100ml, 2,51 µg/100ml, 2,74 µg/100ml, 3,51 µg/100ml) bu değerin yaklaşık 1000 katı olduğunu söyleyebiliriz.

Literatür bilgilerimize göre yüksek yapılı bitkilerde (Topcuoğlu 1987, Salisbury ve Ross 1992, Palavan-Ünsal 1993), funguslarda (Topcuoğlu ve Ünyayar 1995, Özcan 1997), liken ve yosunlarda (Ergün 1997) ABA varlığı rapor edilmesine karşın bakterilerde ABA'nın varlığına dair yayınlanmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamız sonucunda elde edilen bulgulara göre, çalışılan bakterilerde ABA sentezlendiğini ve bu bakterilerde ABA üretiminin miktar olarak en az diğer büyüme hormonları (IAA ve GA₃) kadar olduğunu söyleyebiliriz.

Literatür bilgilerimize göre araştırmacıların bakterilerden elde ettikleri IAA ve GA₃ miktarları ile çalışmamızda kullanılan bakteri türlerinden elde edilen IAA ve GA₃ miktarları arasındaki farklılığın materyal ve metod ile laboratuvar yöntemlerinden kaynaklanabileceğini söyleyebiliriz. Bununla ilgili olarak örneğin bitkisel hormonların ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan kimyasal maddelerin, hormon ayrışımının gerçekleştiği HPLC kolonu dolgu maddesinin, kullanılan sürükleyici fazın bileşiminin farklılığı gibi özellikler sayılabilir.

Çalışmamız sonucunda elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, çalışmamızdaki bakteri türlerinde oksin (IAA), gibberellin (GA₃) ve absisik asit (ABA)'in hem primer hem de sekonder metabolizma dönemlerinde üretildiğini ve üretilen bu büyüme hormonlarının serbest ve bağlı formlarda bulunduğunu söyleyebiliriz. Yine bu çalışmamızla çalışmada kullandığımız *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* bakterileri tarafından oksin (IAA), gibberellin (GA₃) ve absisik asit (ABA) üretildiği ilk kez tarafımızdan gösterilmiştir.

Çalışmada kullandığımız bakteri türlerinin literatür bilgilerimize göre oksin (IAA), gibberellin (GA₃) ve absisik asit (ABA)'in üretimi konusunda dünyada henüz çalışılmamış olması oksin (IAA), gibberellin (GA₃) ve absisik asit (ABA) ürettiği literatürde belirtilen bakterilerin çeşitliliğini arttırmaktadır.

Ayrıca büyüme hormonlarının tarımda yaygın olarak kullanıldığı ve hayvanlar özellikle insan üzerindeki potansiyel etkilerinin tartışma konusu olduğu günümüzde, bakterilerden elde edilen oksin (IAA), gibberellin (GA₃) ve absisik asit (ABA)'in biyolojik aktivitelerinin saptanması gerektiğine inanmaktayız. Çünkü bakteriler doğada çok miktarda bulunabilen ve kısa sürede üretilebilen organizmalar olduklarından bakterilerden elde edilen bu bitkisel hormonların olumlu biyolojik aktiviteleri

durumunda tarımsal alanlarda kullanılabilir özelliklerinden dolayı ülke ekonomisine de katkı getirecektir.

Günümüzde tarım alanlarında özellikle seracılıkta verimi arttırmak amacıyla yaygın olarak ve bilimsel denetimden yoksun ve aşırı dozda kullanılması sonucunda hayvanlar ve insanlar üzerinde karsinojenik ve toksik etkilerinin bulunduğu bildirilen sentetik-ticari büyüme hormonlarının yerine canlı organizmalardan elde edilen doğal büyüme hormonlarının kullanılmasının hayvan ve insan sağlığı üzerine olumlu katkı getireceğine inanmaktayız.

KAYNAKLAR

- ALLEN, M. F., MOORE, T. S., CHRISTENSEN, M. 1981 Phytohormone Changes in *Bouteloua gracilis* Infected by Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae II. Altered levels of Gibberellin-like Substances and Abscisic Acid in the Host Plant. Canadian Journal of Botany, 60: 468-471.
- BİLGEHAN, H. 1996 Klinik Mikrobiyoloji. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 629 ss.
- BOTTINI, R., FULCHIERI, M., PEARCE, D., PHARIS, R. P. 1989 Identification of Gibberellins A₁, A₃ and Iso-A₃ in Cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiology, 10: 45-47.
- DAVIES, P. J. 1995. Plant Hormones. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 833 pp.
- EPSTEIN, E., NISSEN, S. J., SUTTER, E. G. 1991 Indole-3-Acetic Acid and Indole-3-Butyric Acid in Tissues of Carrot Inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Growth Regulators, 10: 97-100.
- ERGÜN, N. 1997. Bazı Yosun ve Liken Türlerinde İçsel Büyüme Hormonlarının (Oksin, Gibberellin, Sitokin ve Absisik Asit) Üretimi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 75 ss.
- FETTİ, W. F., OSMAN, S. F., DUNN, M. F. 1987. Auxin Production by Plant-pathogenic *Pseudomonads* and *Xanthomonads*, Applied and Environmental Microbiology, 53: 1839-1845.
- KREIG, N. R. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1, Williams and Wilkins, USA, 964 pp.
- LIBBERT, E., DRAWERT, A., ROSWITHA, S. 1969. Pathways of IAA Production from Tryptophan by Plants and Their Epiphytic Bacteria: A Comparison I. IAA Formation by Sterile Pea Sections in Vivo as Influenced by IAA Oxydase Inhibitors and by Transaminase Coenzyme, Physiologia Plantarum, 22: 1217-1225.
- MARTINEZ-TOLEDO, M. V., MORENO, R. J., GONZALEZ-LOPEZ, J. 1988. Root Exudates of *Zea mays* and Production of Auxins, Gibberellins and Cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. Plant and Soil, 110: 149-152.
- MINAMISAWA, K. and FUKAI, K. 1991. Production of Indole-3-Acetic Acid by *Bradyrhizobium japonicum*: A Correlation with Genotype Grouping and Rhizobitoxine Production. Plant Cell Physiology, 32 (1): 1-9.

- OBERHANSKI, T., DEFAGO, G., HAAS, D. 1991. Synthesis in the Biocontrol Strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: Role of Tryptophan Side Chain Oxidase. Journal of General Microbiology, 137: 2273-2279.
- ÖKSÜZOĞLU, E. 1997. Bazı Bitki Büyüme Hormonlarının Mutajenitesinin Salmonella Mikrozom ve SOS Kromotest Sistemleriyle Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara, 85 ss.
- ÖZCAN, B. 1997. Zeytinyağı Fabrikası Atığında Üretilen *Lentinus tigrinus* ve *Laetiporus sulphureus* Funguslarında Kültür Periyoduna Bağlı Olarak Gibberellik Asit (GA₃), Absisik asit (ABA) ve Sitokinin (Zeatin) Üretimi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Antakya, 69 ss.
- ÖZDAMAR, K. 1989. Biyoistatistik. Bilim Teknik Yayınevi, Eskişehir, 433 ss.
- PALAVAN-ÜNSAL, N. 1993. Bitki Büyüme Maddeleri, İ. Ü. Basımevi ve Film Merkezi, İstanbul, 357 ss.
- RACHEV, R. C., PAVLOVA-ROUSEVA, R., BOJKOVA, S. V., GANCHEVA, V. K. 1993. Isolation of Gibberellic Acid Produced by *Fusarium moniliforme*. Journal of Natural Products, 56 (7): 1168-1170.
- RADEMACHER, W. 1994. Gibberellin Formation in Microorganisms, Plant Growth Regulation, 15: 303-314.
- SALISBURY, F. B. and ROSS, C. W. 1992. Plant Physiology, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, 682 pp.
- SCHAERER, S., PILET, P. E. 1993. Quantification of Indole-3-Acetic Acid in Untransformed and *Agrobacterium rhizogenes*-Transformed Pea Roots Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Planta, 189: 55-59.
- SEQUEIRA, L. 1964. Inhibition of Indole Acetic Acid Oxydase in Tobacco Plants Infected by *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, 54: 1078-1083.
- SEQUEIRA, L. and WILLIAMS, P. H. 1964. Synthesis of Indoleacetic Acid by *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, 54: 1240-1246.
- SNEATH, P. H. A. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2, Williams and Wilkins, USA, 1599 pp.
- STANIER, R. Y., INGRAHAM, J. L., WHEELIS, M. L., PAINTER, P. R. 1986. The Microbial World. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 07632, 689 pp.
- TOPCUOĞLU, Ş. F. 1987. Tuz Stresi Koşullarında Büyütülen Ayçiçeği (*Helianthus annuus*) Bitkisinde Yaşa Bağlı Olarak Absisik Asit (ABA) Seviyelerinin

Değişimi Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 216 ss

TOPCUOĞLU, Ş F, ÜNYAYAR, S. 1995. Beyaz Çürükçül Fungus *Phanerochaete chrysosporium* ME 446'da Bitki Büyüme Maddelerinin (Auxin, Gibberellin, Absisik Asit ve Sitokinin) Üretimi ve Biyolojik Aktivitelerinin Tayini. İnönü Üniversitesi Araştırma Fonu Proje No: İ Ü A F 93-19, Malatya, 161 ss.

TORTORA, G J, FUNKE, B. R., CASE, C. L. 1995. Microbiology. Fifth Edition, The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., Canada, 801 pp.

ÜLGER, S, BAKTIR, İ, KAYNAK, L. 1999. Zeytinlerde Periyodisite ve Çiçek Tomurcuğu Oluşumu Üzerine İçsel Büyüme Hormonlarının Etkilerinin Saptanması. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 23 (Ek Sayı 3), 619-623

ÜNLÜTÜRK, A, TURANTAŞ, F. 1998. Gıda Mikrobiyolojisi. Mengi Tan Basımevi, İzmir, 605 ss

ÜNYAYAR, S, TOPCUOĞLU, Ş F, ÜNYAYAR, A. 1996. A Modified Method for Extraction and Identification of Indole-3-Acetic Acid (IAA), Gibberellic Acid (GA₃), Abscisic Acid (ABA) and Zeatin Produced by *Phanerochaete chrysosporium* ME 446. Bulgarian Journal of Plant Physiology, 22 (3-4), 105-110.

WANG, T L, WOOD, E. A, BREWIN, N J. 1982. Growth Regulators, *Rhizobium* and Nodulation in Peas. Planta, 155: 345-349.

ÖZGEÇMİŞ

Asuman KARADENİZ 1973 yılında Eskişehir’de doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini Eskişehir’de tamamladı. 1993 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 1997 yılında biyolog ünvanıyla mezun oldu. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimini sürdürmekte olup Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.