



Bu makaleye şu şekilde atıf yapılır: Karaca, K., İphar, M., Eltem, R. (2025). Çeşitli *Trichoderma* İzolatlarının Bazı İnsan ve Bitki Patojeni Bakteriler Üzerindeki Antibakteriyel Etkisinin *in vitro* Koşullarda Taranması, *Mantar Dergisi*, 16(1)34-41

Geliş(Received) :24.12.2024

Kabul(Accepted) :09.01.2025

Araştırma Makalesi

Doi: 10.30708/mantar.1606682

Çeşitli *Trichoderma* İzolatlarının Bazı İnsan ve Bitki Patojeni Bakteriler Üzerindeki Antibakteriyel Etkisinin *in vitro* Koşullarda Taranması

Kemal KARACA^{1*}, Melise İPHAR², Rengin ELTEM³

*Sorumlu yazar: kemalkaraca1@gmail.com

¹ Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, 35100, İzmir, Türkiye / kemalkaraca1@gmail.com 

² Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 35100, İzmir, Türkiye / melisekkaya@gmail.com 

³ Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 35100, İzmir, Türkiye / rengin.eltem@ege.edu.tr 

Öz: Küresel çapta antibakteriyel direncin giderek artması büyük bir halk sağlığı sorununu oluşturmaktadır. Dolayısıyla bakteriyel enfeksiyonların tedavi edilmesi ve önlenmesi için etkili yeni antibakteriyel bileşiklere duyulan ihtiyaç büyük ölçüde artmaktadır. Bu noktada devreye biyolojik mücadele kavramı girmektedir. Özellikle *Trichoderma* Pers. türü funguslar bu biyolojik mücadelede büyük rol oynamaktadırlar. Tarımsal üretimde ve insan enfeksiyonlarında patojenlerle mücadele ile hastalık kontrolünü sağlamada *Trichoderma* spp. gibi biyolojik mücadele etmenlerinin etkilerinin incelenmesi önemli bir alanı oluşturmaktadır. Çalışmanın amacı bazı bitki ve insan patojeni bakterilere karşı daha önceki çalışmalar kapsamında izole edilmiş yerel ve özgün *Trichoderma* izolatlarının metabolitlerinin *in vitro* koşullarda antibakteriyel etkilerinin belirlenmesidir. *Trichoderma* izolatları (n=30) arasından antibakteriyel etkiye sahip *Escherichia coli*'ye karşı 11, *Staphylococcus aureus*'a karşı 6, *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı 18, *Pseudomonas cichorii*'ye karşı 5 ve *P. syringae* pv. *tomato*'ya karşı 20 adet izolat tespit edilmiştir. Çalışmamız *Trichoderma* izolatlarından elde edilecek antibakteriyel metabolitlerin patojenler ile mücadelede potansiyelinin olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Trichoderma*, Antibakteriyel etki, Fitopatojen, İnsan patojeni

Screening of Antibacterial Effects of Various *Trichoderma* Isolates on Some Human and Plant Pathogenic Bacteria Under *in vitro* Conditions

Abstract: The increasing global antibacterial resistance constitutes a major public health issue. Consequently, there is a substantial growing need for effective new antibacterial compounds for the treatment and prevention of bacterial infections. This is where the concept of biological control comes into play. In particular, fungi of the *Trichoderma* Pers. species play a significant role in this biological control. Investigating the effects of biological control agents such as *Trichoderma* spp. in combating pathogens and controlling diseases in both agricultural production and human infections represents an important area of research. The aim of this study is to determine the antibacterial effects of metabolites from previously isolated local and unique *Trichoderma* isolates against some plant and human pathogenic bacteria under *in vitro* conditions. Among the *Trichoderma* isolates (n=30) tested, 11 showed antibacterial activity against



CC BY 4.0 Uluslararası Lisansı altında lisanslanmıştır / Licensed under the CC BY 4.0 International License.

Atıflamada APA stili kullanılmıştır, iThenticate ile taranmıştır. / APA style was used in citation, plagiarism was checked with iThenticate.

Escherichia coli, 6 against *Staphylococcus aureus*, 18 against *Pseudomonas aeruginosa*, 5 against *Pseudomonas cichorii*, and 20 against *P. syringae* pv. *tomato*. Our study shows that antibacterial metabolites obtained from *Trichoderma* isolates have the potential to control of pathogens.

Keywords: *Trichoderma*, Antibacteria effect, Phytopathogen, Human pathogen

Giriş

Bakteriyel enfeksiyonlar ve enfeksiyon kaynaklı hastalıklarla mücadelede, antimikrobiyal direnç yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkili Dünya çapında bir sorundur. Hayvanlar, insanlar ve bitkilerde çeşitli enfeksiyonlara neden olan çoklu ilaç dirençli (Multidrug Resistant, MDR) patojenlerin gelişmesi problemi yanlış antibiyotik kullanımı, mevcut etkili ilaç kıtlığı ve iklim değişikliği ile ortaya çıkmaktadır. Çoklu ilaca dirençli gram pozitif ve negatif bakteriler konvansiyonel antimikrobiyallerle tedavi edilmesi zor ve hatta tedavi edilemeyen enfeksiyonlarla sonuçlanmaktadır. Bu patojenler ile mücadelede yeni tedavi seçeneklerinin ve alternatif antimikrobiyal tedavilerin geliştirilmesini amaçlı yeni terapötik bileşiklerin araştırılması için mikrobiyal kaynaklar öne çıkmaktadır (Frieri ve ark., 2017; Saravanakumar ve ark., 2018). Mikroorganizmalar arasında funguslar ve özellikle yeşilküf olarak bilinen *Trichoderma* Pers. türlerinin antibakteriyel, antiviral, antitümör, antikanser, antioksidan ve antifungal aktivitelere sahip metabolitleri ürettiği iyi bilinmektedir (Saravanakumar ve ark., 2018; Sesli ve ark., 2020; Dang ve ark., 2022; Maral Gül ve Eltem, 2022). Farklı ekolojik koşullara uyum sağlama kapasiteleri ile Dünyada çeşitli habitatlarda yaygın olarak bulunan *Trichoderma* türleri çok çeşitli alanlarda geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir. *Trichoderma* türleri özellikle peptit zinciri, peptaiboller, terpenler, lakkaz, selüloz, butenolidler, epipolitiiodoksopiperazinler, tiosilvatinler, pironlar, soricillinoidler, terpenoidler, gliotoksin, gliovirin, poliketidler gibi çeşitli bileşik sınıfına ait sekonder metabolitler ve enzimlerin üretimi ile birçok önemli bakteri, maya ve filamentli fungusa karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Zhang ve ark., 2017; Leylaie ve Zafari, 2018; De Tommaso ve ark., 2020; Baazeem ve ark., 2021; Dang ve ark., 2022).

Staphylococcus aureus, bağışıklık sisteminden kaçma yeteneğine sahip, enfeksiyonu sonucu yüzeysel deri lezyonlarından derin yerleşimli apselere ve yaşamı tehdit eden sepsise neden olmasıyla bilinen fırsatçı bir insan ve hayvan patojenidir (Genç ve Kaya, 2015; Pollitt ve ark., 2018). *Pseudomonas aeruginosa*, konağın savunmasını zayıflattıktan sonra kalıcı olabilmek için adapte olarak gelişen kronik bakteriyel enfeksiyonların başında gelen fırsatçı bir insan ve hayvan patojenidir. Antibiyotik direnci *P. aeruginosa*'da yatay gen transferi yoluyla dirençli genlerin kazanılmasından ziyade

mutasyonel olaylar tarafından gerçekleşir (Garcia-Clemente ve ark., 2020). *Escherichia coli*, insanlarda ve hayvanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilmesi ve aynı zamanda farklı konakçıların yerli mikrobiyotasının önemli bir bölümünü temsil etmesi nedeniyle mikrobiyoloji dünyasında özel bir yere sahip bir bakteridir. Son yıllarda *E. coli* izolatlarında artan sayıda direnç geni tanımlanmış ve bu direnç genlerinin birçoğu yatay gen transferi ile elde edilmiştir. Genel olarak, *E. coli*'deki antimikrobiyal direnç, dünya çapında hem insanlarda hem de hayvanlarda en büyük zorluklardan biri olarak kabul edilmektedir (Poirel ve ark., 2018). *Pseudomonas cichorii*, domates ve marul da dahil olmak üzere ekonomik açıdan önemli birçok bitkiyi enfekte ettiği bilinen ilk kez hindibada hastalık etmeni olarak bildirilmiş olan gram negatif, bitki patojenik bir bakteridir (Liyama ve ark., 2021). *P. syringae* pv. *tomato*, domateste bakteriyel benek hastalığına neden olan bitki artıklarında, toprakta ve yaprak yüzeylerinde bulunan bir saprofittir ancak diğer *P. syringae* suşlarına kıyasla zayıf bir epifittir (Cerna-Vargas ve ark., 2019).

Literatür incelendiğinde *Trichoderma* türlerinin çeşitli patojen bakterilere karşı antibakteriyel özelliklerine dair çok az çalışmaya rastlanmaktadır. Yapılan çalışma kapsamında yerel kaynaklardan izole edilmiş 30 adet özgün *Trichoderma* izolatlarının kültür sıvısından etil asetat ile elde edilen ekstraktların yaygın hastalık etmeni insan patojeni *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* test bakterileri ile ekonomik değere sahip bitkileri enfekte eden bitki patojeni *P. cichorii* ve *P. syringae* pv. *tomato* test bakterileri üzerindeki antibakteriyel aktiviteleri agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Materyal ve Metot

Kullanılan mikroorganizmalar

Bu çalışmada Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü "Endüstriyel Mikrobiyoloji Fungus Kültür Koleksiyonunda" bulunan daha önceki çalışmalar kapsamında farklı bölgelerdeki toprak ve şapkalı mantar kompostlarından izole edilmiş 30 adet *Trichoderma* izolatu test bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite tayininde kullanılmıştır (Pehlivan ve ark., 2021; Turgay ve ark., 2023). Test bakterileri olarak bu çalışmada iki adet bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ve *P. cichorii* ile insan patojeni *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* ATCC 19142 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 33592 kullanılmıştır.

Test bakterilerinin aktivasyonu ve bakteri süspansiyonlarının hazırlanması

Aktifleştirilip saflık kontrolü gerçekleştirilen test bakterileri Nutrient Agar besiyeri içeren petri plakalarına çizgi ekim tekniği ile ekilerek insan patojeni bakteriler 37°C'de, bitki patojeni bakteriler ise 28°C'de 48 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda her bir test bakterisinin saf kolonilerinden bir öze dolusu örnek alınarak 10 ml Nutrient Broth içeren test tüplerine inoküle edilmiştir. İnsan ve bitki patojeni bakteriler sırasıyla 37°C ve 28°C'de inkübatörde bir gece inkübe edilmiştir (Phupiewkham ve ark., 2015; Anwar ve Iqbal, 2017). İnkübasyon sonrası sıvı bakteri kültürleri 9000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatant atılmış ve pelet üzerine 10 ml fosfat tampon tuz çözeltisi (Phosphate-Buffered Saline, PBS) eklenip vortekslenerek peletin PBS içinde çözünmesi sağlanmıştır. Süspansiyon tekrar 9000 rpm 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. PBS ile santrifüjlenerek yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Bakteri süspansiyonu hazırlarken istenen bakteri sayısını elde edebilmek için McFarland 0.5 Bulanıklık Standardı kullanılmıştır. 10^8 koloni oluşturan birim (kob)/ml yoğunlukta süspansiyonlar elde edildikten sonra, bunlardan seri seyreltmeler gerçekleştirilerek 10^6 kob/ml yoğunlukta süspansiyonlar elde edilmiştir (Kalyoncu ve ark., 2010; Afandi ve Doğruman-Ala, 2019).

Trichoderma izolatlarının aktivasyonu ve metabolitlerin ekstraksiyon ile eldesi

Trichoderma izolatları Patates Dekstroza Agar (PDA) ortamı içeren petri plakalarında 5-7 gün süresince 28°C'de inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen *Trichoderma* izolatlarından alınan agar diskler 250 ml'lik erlenler içerisindeki 50 ml Sabouraud Dextrose Broth (SDB) besiyerine inoküle edilerek 180 rpm karıştırma hızında 28°C'de 7 gün boyunca çalkalanmalı inkübatörde inkübe edilmişlerdir (Sargin ve ark., 2013; Saleh ve ark., 2011). Yedi günlük inkübasyonu tamamlanan *Trichoderma* izolatlarının kültür sıvıları hücrelerden vakum filtrasyon yöntemiyle ayrılmıştır. Vakum filtrasyonun ardından toplanan süpernatantlara iki farklı ekstraksiyon metodu uygulanmıştır. Her iki yöntemde de ilk olarak süpernatantlara %10 oranında metanol eklenerek hafif bir şekilde çalkalanmıştır. Daha sonra etil asetat ekstraksiyon metodu için 1:1 oranında etil asetat eklenerek 5 dk boyunca çalkalanmıştır. Diğer metot olan metanol ekstraksiyonu için de 1:1 oranında metanol eklenerek 5 dakika çalkalama gerçekleştirilmiştir. Çalkalama sonunda ayırma hunileri muslukları kapalı konumda faz ayırımı oluşması için 5 dk boyunca sabitlenmiştir. Faz ayırımı gerçekleştirildikten sonra ekstraktları içeren üst faz toplanmış ve falkonlara alınmıştır. Son olarak toplanan ekstraktlar 0.45 µm steril şırınga filtresinden geçirilerek steril falkonlara alınmış ve

çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır (Kalyoncu ve ark., 2010; Sharma ve ark., 2016; Saravanakumar ve ark., 2018).

Ekstraktların antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi

Trichoderma izolatlarının ekstraktlarının antibakteriyel aktivitelerini belirlemek için agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bakteri süspansiyonları Mueller Hinton Agar besiyeri bulunan petri plakalarına 100 µl aktarılarak steril eküvyon çubuğu yardımıyla petri plakanın tüm yüzeyine dağıtılmıştır. Aseptik koşullarda cam çubuk yardımıyla agar yüzeyinde birbirine eşit uzaklıkta 4 adet 8 mm çapında içi boş kuyucuklar açılmıştır. Açılan kuyucuklara 100 µl *Trichoderma* izolatına ait steril ekstraktlar eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak 50 mg/L konsantrasyonunda amfisilin, negatif kontrol olarak ise steril PBS, etil asetat ve metanol kullanılmıştır. Kuyucuklara yüklemeler tamamlandıktan sonra insan patojeni içeren petri plakaları 37°C'de, bitki patojeni içeren petri plakaları ise 28°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çap ölçümleri gerçekleştirilmiş ve kaydedilmiştir (Kalyoncu ve ark., 2010; Anwar ve Iqbal, 2017; Aytar ve ark., 2019; Baazeem ve ark., 2021).

İstatistiksel analizler

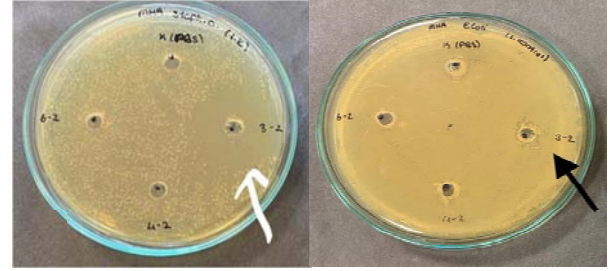
İstatistik analizler PASW Statistic paket programı kullanılarak Tukey testine ($P < 0.05$) göre varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilmiştir.

Bulgular

Antimikrobiyal direncin oluşması mikroorganizmaların doğası gereği doğal bir süreçtir ve tedavi süreçlerinin zorlaşmasına neden olmaktadır. Artan antimikrobiyal direnç problemi yeni antimikrobiyal bileşiklerin arayışını ortaya çıkarmıştır (Shruthi ve Sangeetha, 2022). Mikroorganizma kaynaklı antimikrobiyal bileşiklerin sentezi, ekstraksiyonu ve kullanımına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. *Trichoderma* türlerinin metabolitlerinin patojen bakteri, küf ve mayalar inhibe ettiği bilinmektedir ancak bunlar henüz klinik uygulamalarda kullanılmamıştır (Saravanakumar ve ark., 2018; Baazeem ve ark., 2021). Çalışmamızda yerel kaynaklardan izole edilen *Trichoderma* izolatlarının ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri yaygın insan ve hayvan hastalık etmeni patojen bakteriler ve önemli mahsullerin hastalık etmeni bitki patojen bakteriler üzerinde test edilmiştir. *Trichoderma* izolatlarının üretim sonrası ekstraksiyon aşamasında iki farklı çözgen kullanılmıştır. Çalışmada metanol ve etil asetat ile ekstraksiyon metotlarından elde edilen ekstraktların kullanıldığı agar kuyucuk difüzyon petri plakalarında metanol ile ekstrakte edilmiş olanlarda inhibisyon zonu

gözlenmezken, etil asetat ile ekstrakte edilenlerde inhibisyon zonu gözlenmiştir. *Trichoderma* izolatlarından etil asetat ile elde edilen ekstraktların agar kuyucuk difüzyon metodu sonucu insan patojenleri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 33592 ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarına ait çap ölçüm değerleri Tablo 1.'de verilmiştir. *Trichoderma* izolatlarından etil asetat ile elde edilen ekstraktların aktibakteriyel etkileri incelendiğinde gram negatif bakteriler üzerinde daha fazla etkili olduğu görülmektedir. Gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı sırasıyla 11 ve 18 adet izolat

etkiliyken, gram pozitif bakteri olan *S. aureus*'a karşı ise 6 adet izolat etkilidir. (Tablo 2).



Şekil 1. İnhibisyon zon görüntüleri a) *S. aureus*, b) *E. coli*

Tablo 1. *Trichoderma* izolatlarından etil asetat ile elde edilen ekstraktların insan patojen bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zon sonuçları

<i>Trichoderma</i> spp.	İnsan Patojeni Test Bakterileri		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Pozitif Kontrol (Amfisiilin)	21.0±1.0 mm	23.5±0.5 mm	24.0±1.0 mm
Negatif Kontrol (PBS)	-	-	-
Negatif Kontrol (Etil asetat)	-	-	-
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 3-2	14.0±2.0 mm ^a	31.0±1.0 mm ^a	-
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 4-2	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i> 6-2	-	-	-
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 6-5	-	-	-
<i>Trichoderma virens</i> 7-2	-	-	8.0±2.0 mm ^{efgh}
<i>Trichoderma afroharzianum</i> 7-4	-	-	-
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 8-3	-	-	-
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 8-7	-	-	-
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 11-2	-	-	12.0±0.5 mm ^{bcd}
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 12-2	5.0±1.0 mm ^e	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. 13-2	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. 13-7	-	9.0±1.0 mm ^{bc}	10.0±1.6 mm ^{cdef}
<i>Trichoderma</i> sp. 13-16	8.0±0.5 mm ^{cd}	10.0±0.5 mm ^b	-
<i>Trichoderma</i> sp. 14-1	-	-	9.0±1.0 mm ^{defg}
<i>Trichoderma harzianum</i> 14-3	9.0±1.0 mm ^{bcd}	-	13.0±1.0 mm ^{bc}
<i>Trichoderma</i> sp. 14-7	7.0±1.0 mm ^{de}	-	10.0±1.6 mm ^{cdef}
<i>Trichoderma</i> sp. 14-9	8.0±0.5 mm ^{cd}	10.0±0.5 mm ^b	10.0±0.5 mm ^{cdef}
<i>Trichoderma</i> sp. 14-16	-	-	12.0±0.5 mm ^{bcd}
<i>Trichoderma</i> sp. 15-1	-	-	7.0±1.0 mm ^{fgh}
<i>Trichoderma</i> sp. 15-8	9.0±1.0 mm ^{bcd}	-	9.0±2.5 mm ^{defg}
<i>Trichoderma</i> sp. 16-1	7.0±1.0 mm ^{de}	-	12.0±0.5 mm ^{bcd}
<i>Trichoderma</i> sp. 16-3	11.0±1.0 mm ^b	-	15.0±3.5 mm ^{ab}
<i>Trichoderma</i> sp. 17-6	10.0±0.5 mm ^{bc}	-	6.0±0.5 mm ^{gh}
<i>Trichoderma</i> sp. 18-1	10.0±0.5 mm ^{bc}	-	5.0±0.5 mm ^h
<i>Trichoderma</i> sp. 18-6	-	-	11.0±1.0 mm ^{cde}
<i>Trichoderma</i> sp. 18-10	-	8.0±0.5 mm ^c	17.0±3.0 mm ^a
<i>Trichoderma</i> sp. 19-3	-	-	12.0±0.5 mm ^{bcd}
<i>Trichoderma</i> sp. 19-4	-	8.0±2.0 mm ^c	8.0±0.5 mm ^{efgh}
<i>Trichoderma</i> sp. 19-5	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. 20	-	-	-

*Değerler standart sapmalı 3 tekrarın ortalamasıdır. Her bir sütun için aynı harfle gösterilenler arasında Tukey testi (P>0,05) anlamlı bir farklılık yoktur.

* - İnhibisyon zonu görülmemiştir.

Tablo 2. İnsan patojen bakterilerine karşı antagonistik aktivite gösteren *Trichoderma* izolat sayıları

İnsan patojeni test bakterileri	Etkili <i>Trichoderma</i> izolat sayısı	Etkili <i>Trichoderma</i> izolat yüzdesi (%)	İnhibisyon zonu (mm)
<i>Escherichia coli</i>	11	36.7	5-14
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	20.0	8-31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	60.0	5-17

P. cichorii ve *P. syringae* pv. *tomato* patojen bakterilerine karşı *Trichoderma* izolatlarının etil asetat ile elde edilen ekstraktlarının oluşturduğu antagonistik etki sonucu gözlenen inhibisyon zonlarına ait çap ölçüm değerleri Tablo 3.'de verilmiştir.



Şekil 2. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* karşı oluşturulan inhibisyon zon görüntüleri

Tartışma

Saleh ve ark. (2011), çalışmalarında farklı *Trichoderma* türlerinin katı kültür fermentasyonu sonucu elde edilen ham ekstraktların çeşitli insan patojen bakterileri üzerindeki antibakteriyel aktivitelerini agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile incelemişlerdir. Hep yeşilküf *T. viride* suşu ile sırasıyla *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853'e karşı 20 mm, 28 mm ve 22 mm inhibisyon zonu elde etmişlerdir (Sesli ve ark., 2020). Saravanakumar ve ark. (2018), koyu yeşilküf *Trichoderma atroviride* KNUP001 suşunun metanol ile ekstrakte edilmiş intraselüler metabolitlerin farklı konsantrasyonlarını kullanarak antibakteriyel aktivitesini disk difüzyon yöntemi ile *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* ve *Enterobacter aerogenes* test bakterileri üzerinde incelemişlerdir (Sesli ve ark., 2020). *E. coli*'ye karşı 14.25 mm, *P. mirabilis*'e karşı 10.4 mm ve *E. aerogenes*'e karşı 5.6 mm maksimum inhibisyon zonuna ulaşmışlardır. Çalışmamızda ise *T. pleuroticola* 3-2 suşu ile *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı sırasıyla 31±1 mm ve 14±2 mm çapında maksimum inhibisyon zonu elde edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'da *Trichoderma* sp. 18-10 izolatu 17±3 mm'lik çapa sahip en yüksek inhibisyon zonu elde edilmiştir. *S. aureus*'a karşı ulaşılan 31 mm'lik zon diğer çalışmalara göre daha yüksek bir değere sahip olduğu görülmektedir. *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı gerçekleştirilen agar kuyucuklarda literatür ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 1). Baazeem ve ark. (2021), çalışmalarında çengel yeşilküf *T. hamatum* FB10 suşunu kullanarak antibakteriyel aktiviteye sahip sekonder metabolit üretiminde Patates Dekstrozu Broth ortamını kullanmışlardır (Sesli ve ark., 2020). Sekonder metabolit analizi için kültür sıvısından 1:1 oranında etil asetat ile elde edilen ekstrakt, GS-MS analizi ile tayin edilmiştir. Heksadekanoik asit, etanoik asit, 1-hidroksi-2-propanon, bütirik asit gibi farklı bileşiklere ulaşılmış olsa

da ana bileşik olarak 6-pentil-alfa-piron'u belirlemişlerdir. Sharma ve ark. (2016), çalışmalarında fungal sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu için metanol ve etil asetat ile ayrı ayrı ekstraksiyon gerçekleştirmişlerdir. *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı metanol ile yapılan ekstraksiyonlarda sırasıyla 14.5 mm, 14.0 mm, 11.0 mm ve 13.0 mm; etil asetat ile yapılan ekstraksiyonlarda sırasıyla 12 mm, 15.0 mm, 12.5 mm ve 10,0 mm inhibisyon zonu elde etmişlerdir. Etil asetat ile ekstraksiyon *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı daha etkiliyken; metanol ile yapılan ekstraksiyon *B. subtilis* ve *S. typhimurium*'a karşı daha etkili olmuştur. Çalışmamızda kültür sıvılarından antibakteriyel özelliğe sahip sekonder metabolit elde etmek için hem etil asetat hem de metanol ile ekstraksiyon denemeleri yapılmıştır ancak metanol ile inhibisyon zonu elde edilememiştir.

P. cichorii'de *Trichoderma* sp. 15-1 izolatu 13±1 mm, *P. syringae* pv. *tomato*'da yeşilküf *T. virens* 7-2 suşu 18 mm'lik çapa sahip en yüksek inhibisyon zonlarını oluşturmuşlardır (Bkz. Tablo 3) (Sesli ve ark., 2020). *P. syringae* pv. *tomato*'ya karşı etkili *Trichoderma* sayısı 20 iken *P. cichorii*'ye karşı sadece 5 izolat etki göstermiştir. Aynı genusa ait olan bakteri türleri olsalar da *Trichoderma* izolatlarının ekstraktlarının oluşturduğu etkiler farklılık göstermektedir. Karabüyük ve Aysan (2019), çalışmalarında *P. syringae* pv. *tomato* patojenine karşı farklı bitkilerden elde edilen ekstraktların antibakteriyel aktivitelerini incelemişler. Pozitif kontrol olarak streptomisin kullanarak 9.2 mm ve ekstraktları kullanarak 3.0 – 13.6 mm arasında inhibisyon zonları elde etmişlerdir. Çalışmamızda *T. virens* 7-2 suşuyla elde edilen 18.0 mm'lik inhibisyon zonu ile bitki ekstraktları ve streptomisin ile elde edilen değerlerin üstünde bir değer elde edilmiştir.

Bakteriyel kaynaklı hastalıkların mücadelesinde antibiyotik kullanımı uzun yıllardır yaygın olsa da gelişen antibiyotik direnci küresel bir sorun haline gelmiştir (Frieri ve ark., 2017; Urban-Chmiel ve ark., 2022). Bu sebeple antimikrobiyal özellik gösteren mikroorganizma kaynaklı metabolitlerin araştırılmasına yönelik çalışmalara ilginin artmasına neden olmuştur. Çalışmamızda yerli kaynaklardan izole edilen *Trichoderma* izolatlarından elde edilen ekstraktların antibakteriyel özellikleri çeşitli insan ve bitki hastalık etmeni patojenler üzerinde taranarak inhibisyon zonu elde edilen izolatlar ile bakteriyel hastalıkların mücadelesinde ümit var olduğu düşünülmektedir. Elde edilen ekstraktların içerdiği metabolitler ve bu metabolitlerin miktarları kromatografik yöntemler ile belirlenerek test bakterileri üzerinde MIC testinin gerçekleştirilmesi çalışmanın devamı için önemlidir. Sonuçlarımız literatür ile karşılaştırılarak fungal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal bileşiklerin değerli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Tablo 3. *Trichoderma* izolatlarından etil asetat ile elde edilen ekstraktların bitki patojen bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zon sonuçları

<i>Trichoderma</i> spp.	Bitki Patojeni Test Bakterileri	
	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Pozitif Kontrol (Amfisilin)	30.0±1.0 mm	18.0±2.0 mm
Negatif Kontrol (PBS)	-	-
Negatif Kontrol (Etil asetat)	-	-
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 3-2	-	-
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 4-2	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i> 6-2	-	14.0±0.5 mm ^{bc}
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 6-5	-	10.0±0.5 mm ^{def}
<i>Trichoderma virens</i> 7-2	-	18.0±0.5 mm ^a
<i>Trichoderma afroharzianum</i> 7-4	7.0±1.0 mm ^c	-
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 8-3	-	9.0±1.0 mm ^{ef}
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 8-7	9.0±1.0 mm ^b	12.0±0.5 mm ^{cde}
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 11-2	-	8.0±0.5 mm ^f
<i>Trichoderma pleuroticola</i> 12-2	12.0±0.5 mm ^a	12.0±2.0 mm ^{cde}
<i>Trichoderma</i> sp. 13-2	-	10.0±2.0 mm ^{def}
<i>Trichoderma</i> sp. 13-7	-	16.0±0.5 mm ^{ab}
<i>Trichoderma</i> sp. 13-16	9.0±1.0 mm ^b	16.0±0.5 mm ^{ab}
<i>Trichoderma</i> sp. 14-1	-	14.0±4.0 mm ^{bc}
<i>Trichoderma harzianum</i> 14-3	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. 14-7	-	10.7±2.5 mm ^{cdef}
<i>Trichoderma</i> sp. 14-9	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. 14-16	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. 15-1	13.0±1.0 mm ^a	-
<i>Trichoderma</i> sp. 15-8	-	10.0±0.5 mm ^{def}
<i>Trichoderma</i> sp. 16-1	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. 16-3	-	12.0±0.5 mm ^{cde}
<i>Trichoderma</i> sp. 17-6	-	16.0±0.5 mm ^{ab}
<i>Trichoderma</i> sp. 18-1	-	14.0±0.5 mm ^{bc}
<i>Trichoderma</i> sp. 18-6	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. 18-10	-	12.0±1.6 mm ^{cde}
<i>Trichoderma</i> sp. 19-3	-	14.0±0.5 mm ^{bc}
<i>Trichoderma</i> sp. 19-4	-	13.0±1.0 mm ^{bcd}
<i>Trichoderma</i> sp. 19-5	-	10.0±0.5 mm ^{def}
<i>Trichoderma</i> sp. 20	-	-

*Değerler standart sapmalı 3 tekrarin ortalamasıdır. Her bir sütun için aynı harfle gösterilenler arasında Tukey testi (P>0,05) anlamlı bir farklılık yoktur.

* - İnhibisyon zonu görülmemiştir.

Tablo 4. Bitki patojen bakterilerine karşı antagonistik aktivite gösteren *Trichoderma* izolat sayıları

Test bakterileri	Etkili <i>Trichoderma</i> izolat sayısı	Etkili <i>Trichoderma</i> izolat yüzdesi (%)	İnhibisyon zonu (mm)
<i>Pseudomonas cichorii</i>	5	16.7	7-13
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	20	66.7	8-18

Yazar Katkıları

Tüm yazarlar eşit katkıya sahiptir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Etik Beyanı

Bu çalışmanın hazırlanma sürecinde bilimsel ve etik ilkelere uyulduğu ve yararlanılan tüm çalışmaların

kaynakçada belirtildiği beyan olunur (Kemal KARACA, Melise İPHAR, Rengin ELTEM)

Teşekkür

Gerçekleştirilen çalışma “2209-B Üniversite Öğrencileri Sanayi Yönelik Araştırma Projeleri Destekleme Programı” 1139B412100971 nolu proje ile desteklenmiştir. Tübitak BİDEB birimine mali destekleri için teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Afandi, A. ve Doğruman-Ala, F., (2019). Investigation of the effectiveness of igY antibodies obtained from chickens where immunized with *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by ELISA. *Turk Hij ve Deney Biyol Derg.* 76(4):379–90.
- Anwar, J. ve Iqbal, Z., (2017). Effect of Growth Conditions on Antibacterial Activity of *Trichoderma harzianum* against Selected Pathogenic Bacteria. *Sarhad J Agric.* 33(4).
- Aytar, M., Oryaşın, E., Başbülbul, G. ve Bozdoğan, B., (2019). Standardization Study for Agar Well Diffusion Method. *Bartın Univ Int J Nat Appl Sci.* 2(2):138–45.
- Baazeem, A., Almana, A., Manikandan, P., Alorabi, M., Vijayaraghavan, P. ve Abdel-Hadi, A., (2021). In vitro antibacterial, antifungal, nematocidal and growth promoting activities of *Trichoderma hamatum* fb10 and its secondary metabolites. *J Fungi.* 7(5):1–13.
- Cerna-Vargas, J.P., Santamaría-Hernando, S., Matill, M.A., Rodríguez-Herva, J.J., Daddaou, A., Rodríguez-Palenzuela, P., Krell, T. ve Lopez-Solanilla, E., (2019). Chemoperception of specific amino acids controls phytopathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *MBio.* 10(5).
- Dang, H., Kong, Q., Winchester, W., Wan, X., Lei, Y., Zhang, H., Zhao, Y., Liu, X., Xu, B.B., Zhang, B. ve Wang, Z., (2022). Isolation, Identification and Pathogenic Effects of *Trichoderma* spp. from *Auricularia auricula*. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 6(3), 96.
- De Tommaso, G., Salvatore, M.M., Nicoletti, R., DellaGreca, M., Vinale, F., Bottiglieri, A., Staropoli, A., Salvatore, F., Lorito, M., Iuliano, M. ve Adolphi, A., (2020). Bivalent metal-chelating properties of harzianic acid produced by *Trichoderma pleuroticola* associated to the gastropod *Melarhaphe neritoides*. *Molecules.* 25(9).
- Frieri, M., Kumar, K. ve Boutin, A., (2017). Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10(4), 369-378.
- Garcia-Clemente, M., de la Rosa, D., Máiz, L., Girón, R., Blanco, M., Oliveira, C., Canton, R. ve Martinez-Garcia, M.A., (2020). Impact of *Pseudomonas aeruginosa* infection on patients with chronic inflammatory airway diseases. *J Clin Med.* 9(12):1–32.
- Genç, F. ve Kaya, O., (2015). Subklinik Mastitisli Sığırlardan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* ve *Streptococcus dysgalactiae* Etkenlerinin İzolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Belirlenmesi. *Animal Health Production and Hygiene*, 4(2), 415-419.
- Liyama, K., Tani, S., Yagi, H., Hashimoto, S., Suga, Y., Tsuchiya, K. ve Furuya, N., (2021). D-Tartrate utilization correlates with phylogenetic subclade in *Pseudomonas cichorii*. *FEMS Microbiol Lett.* 4:368(2).
- Kalyoncu, F., Oskay, M. ve Kalmış, E., (2010). Bazı Yabani Makrofungus Misellerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Mantar Dergisi.* 1(1):1–8.
- Karabüyük, F. ve Aysan, Y., (2019). Antibacterial effects of some plant extracts against tomato bacterial speck disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J Tekirdag Agric Fac.* 16(2):231–43.
- Leylaie, S. ve Zafari, D., (2018). Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* Species From Vinca Plants. *Front Microbiol.* 9(JUL):1–16
- Maral Gül, D. ve Eltem, R., (2022). Bazı Gübre ve Fungisitlerin *Trichoderma* Türlerinin Büyümesine Etkisinin in vitro Koşullarda İncelenmesi. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derg.* 0225(2):167–81.
- Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wiecezorek, K., Dec, M., Nowaczek, A. ve Osek, J., (2022). Antibiotic resistance in bacteria—A review. *Antibiotics*, 11(8), 1079.
- Pehlivan, N., Gedik, K., Eltem, R. ve Terzi, E., (2021). Dynamic interactions of *Trichoderma harzianum* TS 143 from an old mining site in Turkey for potent metal (oid) s phytoextraction and bioenergy crop farming. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 123609.
- Phupiewkham, W., Sirithorn, P., Saksirirat, W. ve Thammasirirak, S., (2015). Antibacterial agents from *Trichoderma harzianum* strain T9 against pathogenic bacteria. *Chiang Mai J Sci.* 42(2):304–16.
- Poirel, L., Madec, J-Y., Lupo, A., Schink, A-K., Kieffer, N., Nordmann, P. ve Schwarz, S., (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. Aarestrup FM, Schwarz S, Shen J, Cavaco L, editors. *Microbiol Spectr.* 27;6(4):979–80.
- Pollitt, E.J.G., Szkuta, P.T., Burns, N. ve Foster, S.J., (2018). *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *PLoS Pathog.* 14(6):1–27.
- Saleh, R.M., Kabli, S.A., Al-Garni, S.M. ve Mohamed, S.A., (2011). Screening and production of antibacterial compound from *Trichoderma* spp. against human-pathogenic bacteria. *African J Microbiol Res.* 5(13):1619–28.
- Saravanakumar, K., Chelliah, R., Ramakrishnan, S.R., Kathiresan, K., Oh, D.H. ve Wang, M.H., (2018). Antibacterial, and antioxidant potentials of non-cytotoxic extract of *Trichoderma atroviride*. *Microb Pathog.* 115,338–42.
- Sargın, S., Gezgin, Y., Eltem, R. ve Vardar, F., (2013). Micropropagule production from *Trichoderma harzianum* EGE-K38 using solid-state fermentation and a comparative study for drying methods. *Turkish J Biol.* 37(2):139–46.
- Sesli, E., Asan, A. ve Selçuk, F. (edlr.) Abacı Günyar, Ö., Akata, İ., Akgül, H., Aktaş, S., Alkan, S., Allı, H., Aydoğdu, H., Berikten, D., Demirel, K., Demirel, R., Doğan, H.H., Erdoğdu, M., Ergül, C.C., Eroğlu, G., Giray, G., Halikî Uztan, A., Kabaktepe, Ş., Kadaifçiler, D., Kalyoncu, F., Karaltı, İ., Kaşık, G., Kaya, A., Keleş, A., Kırbacı, S., Kivanç, M., Ocak, İ., Ökten, S., Özkale, E., Öztürk, C., Sevindik, M., Şen, B., Şen, İ., Türkeul, İ., Ulukapı, M., Uzun, Ya., Uzun, Yu., Yoltaş, A. (2020). *Türkiye Mantarları Listesi*. İstanbul: Ali Nihat Gökyiğit Vakfı Yayınları.

- Sharma, D., Pramanik, A. ve Agrawal, P.K., (2016). Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D.Don. *3 Biotech.* 6(2):1–14.
- Shruthi, S. ve Sangeetha, K., (2022). Comparison of Antibacterial Activity of Ethyl Acetate Fractions Separated from *Trichoderma* with Commercial Antibiotic Methicillin Against Drug-Resistant Bacteria using Minimum Inhibitory Concentration Method. *Cardiometry.* (25):1101–7.
- Turgay, G., Eren, E., Eltem, R., Çakır, D. ve Aydemir, B. Ç., (2023). Molecular characterization of *Trichoderma* spp. isolates in mushroom-growing farms in Turkey and their effects on *Agaricus bisporus* production. *Plant Pathology*, 72(7), 1272-1282.
- Zhang, J.C., Chen, G.Y., Li, X.Z., Hu, M., Wang, B.Y., Ruan, B.H., Zhou, H., Zhao, L.X., Zhou, J., Ding, Z.T. ve Yang, Y.B., (2017). Phytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities of mycotoxins and other metabolites from *Trichoderma* sp. *Nat Prod Res.*31(23):2745–52.