



Studies on the Sensitivity Level of Some Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Against Copper Based Compounds

Kazım EĞERCİ¹ Hatice ÖZAKTAN² Yeşim EĞERCİ³

¹Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti./Crop Science, Ege Bölge Müdürlüğü, İzmir

²Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, İzmir

³Bornova Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir

ABSTRACT

Copper based compounds have been extensively used to control of the diseases caused by plant pathogenic bacteria. However, copper resistant bacteria were isolated from various plants and spraying with copper compounds to control of the diseases have been reported to be increasingly ineffective. In this study, it was aimed for 33 plant pathogenic or saprophytic bacteria from Bacteriology laboratory stocks in Department of Plant Protection of Ege University to determine the sensitivity level against copper compounds. The reaction of bacteria against copper sulphate was tested under *in-vitro* conditions. Six isolates were recorded as the most resistant to copper sulphate considering to MIC and ED₅₀ values. Two *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) strains, one *Acidovorax citrulli* (*Ac*) strain, two *P. syringae* pv. *syringae* (*Pss*) strains, and one *P. fluorescens* (*Pf*) strain were recorded as decreasing sensitivity to copper sulphate, showing ED₅₀ values between 0.55 µg/ml to 1.3 µg/ml, and MIC values between 0.7 mM to 2 mM. Out of six bacterial strains, that were recorded as resistant to copper sulphate were also tested against some commercial copper-based compounds. All of the tested bacterial strains were concluded as susceptible to liquid copper sulphate and nano copper formulation producing 0.1 µg/ml ED₅₀ and 0.1–0.3 mM MIC values. It was also concluded as a positive aspect for integrated pest management that antagonistic bacteria were found decreasing sensitivity to copper based chemicals.

Keywords: Plant pathogenic and saprophytic bacteria, resistance, copper-based compounds, copper resistance

ÖZ

Bazı Bitki Patojeni ve Saprofit Bakterilerin Bakırlı Bileşiklere Karşı Duyarlılık Düzeylerinin Araştırılması

Bakırlı preparatlar bitki patojeni bakterilerin neden olduğu hastalıkların mücadelesinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Ancak çeşitli bitkilerden bakıra dayanıklı bakterilerin izole edildiği ve dayanıklılık nedeniyle bakırlı bileşiklerle ilaçlama yapmanın hastalıkların önlenmesinde giderek etkisiz olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakterioloji laboratuvarı stoklarında bulunan bitki patojeni ve saprofit olmak üzere toplam 33 bakteri izolatinin bakırlı bileşiklere karşı duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *In-vitro* koşullarda gerçekleştirilen testlerde; bakteriler önce bakır sülfata toleransları açısından testlenmiş ve ED₅₀ değerleri 0.55 µg/ml ile 1.3 µg/ml ve MIC değerleri 0.7 mM ile 2 mM arasında saptanan 2 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) izolatu, 1 *Acidovorax citrulli* (*Ac*) izolatu, 2 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) izolatu ve 1 *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) izolatu olmak üzere 6 bakteri izolatinin, bakır sülfata duyarlılıklarının azaldığı belirlenmiş ve bunlar ticari bakırlı preparatlara karşı testlenmiştir. ED₅₀ ve MIC değerlerine bakıldığında, sıvı bakır sülfat ve nano bakır preparatlarına karşı bakteriyel patojenlerin oldukça duyarlı olduğu (ED₅₀: 0.1 µg/ml, MIC: 0.1–0.3 mM) saptanmıştır. *In-vitro* testlerde, bazı antagonist bakterilerde bakırlı preparatlara karşı duyarlılık azalışı gözlenmesi, özellikle entegre mücadele açısından olumlu bir yaklaşım olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bitki patojeni ve saprofitik bakteriler, dayanıklılık, bakırlı preparatlar, bakıra dayanıklılık

GİRİŞ

Dünyada 1600 kadar bakteri türünün varlığı bilinmektedir. Bunların büyük bir çoğunluğu saprofitik karaktere sahip olup, organik artıkların parçalanmasında büyük rol oynamaktadır. Bazı türleri insan ve hayvanlarda önemli hastalıklara neden

olmaktadır. Bakterilerin önemli bir bölümü ise bitkilerde hastalık oluşturmaktadır. Bitki patojeni bakteriler ile mücadelede genel olarak etkin bir kimyasal veya biyolojik mücadele yöntemi olmadığı için bitki bakteriyel hastalıkları ile mücadele etmek çok zordur (Benlioğlu, 2012).

Bitkileri hastalandıran bakteriyel etmenlere karşı mücadelede en yoğun kullanılan kimyasallar; bakır, maneb ve mancozeb gibi ağır metal içeren preparatlardır. Bordo bulamacı ilk keşfedildiği 1922 yılından beri, yaklaşık 100 yıldır bakteriyel bitki hastalıklarının mücadelesinde önerilmekte ve başarıyla kullanılmaktadır (Stall ve ark., 1986). Ancak, çeşitli

Article Info / Makale Bilgileri

Corresponding author e-mail: kazimegerci@hotmail.com

Received: September 27, 2020 Accepted: April 1, 2021

ORCID ID's of Authors in order:

0000-0003-0253-1705, 0000-0001-9971-6508

0000-0002-3864-4958

İlk yazının Yüksek Lisans tezi ürünüdür.

bitkilerden bakıra dayanıklı bitki patojeni ve saprofitik bakterilerin izole edildiği (Adaskaveg ve Hine, 1985; Bender ve ark., 1990; Cooksey, 1990a; Marco ve Stall, 1983; Ritchie ve Dittapongpitch, 1991; Sundin ve ark., 1989) ve bakıra dayanıklı bu bakteriler nedeniyle bakırlı bileşiklerle ilaçlama yapmanın hastalıkların önlenmesinde giderek etkisiz olduğu bildirilmektedir (Adaskaveg ve Hine, 1985; Cooksey, 1990b; Marco ve Stall, 1983; Özaktan ve Bora, 1991; Benlioğlu ve Benlioğlu, 1998; Sabet ve ark., 2000). Bakır iyonlarına karşı duyarlılık azalışının genetik açıdan bakteriyel kromozom ya da plazmid tarafından yönetildiği yönünde yayınlara rastlanılmaktadır (Cooksey, 1987; Cooksey, 1993).

Bitki patojeni bakteriyel hastalıklara karşı kullanılan bakırlı bileşikler 5 tip formülasyondan oluşmaktadır. Bunlar; bakır oksit, bakır oksiklorür, bakır amonyum kompleksi, bakır hidroksit ve bakır sülfattır. Bütün bu bakır formülasyonları değişen çözünürlükleri, partikül büyüklükleri ve tutunma özellikleri gibi farklı özelliklere sahiptir. Bu özellikler ürünün biyolojik etkinliğini de etkilemektedir. Çözünürlük özelliğine göre formülasyonlar incelendiğinde, en az çözünmenin bakır oksit, en çok çözünenin ise bakır sülfat olduğu belirtilmektedir. Küprik sülfat ya da bakır sülfat olarak da denilen bakır (II) sülfat, kimyasal formülü $CuSO_4$ olan kimyasal bileşiktir. Bu tuzun hidrasyon derecelerine bağlı olarak bir dizi farklı bileşikler mevcuttur. Oktahedral moleküler geometriye ve paramanyetik özelliğe sahip olan bakır sülfat ekzotermik olarak suda çözünerek $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ kompleksini oluşturmaktadır (Yazan ve ark, 1972; Anonim, 2020). Bakır sülfat "mavi vitriyol", "göztaşı" ve "göktaşı" olarak da bilinmektedir. Bakır sülfat pentahidrat bir fungusit ve aynı zamanda bakterisittir. Bununla birlikte, bazı bakteriler yüksek düzeydeki bakır iyonlarına uyum sağlayabilir. Kireç ile karıştırıldığında bordo bulamacı, sodyum karbonat ile karıştırıldığında ise burgonya bulamacı; özellikle bağ ve meyve ağaçlarında hastalıklara neden olan fungal ve bakteriyel etmenlerin kontrolünde kullanılmaktadır. Bakteriyel hastalıklara karşı tarla ve sera koşullarında bitkiler üzerinde yoğun miktarda bakır kullanımı söz konusudur (Yazan ve ark, 1972; Türküsay ve Tosun, 2005). Bahçe bitkileri yetiştiriciliğinde fidelerdeki çökerten hastalığına karşı bakır sülfat ve amonyum karbonat karışımı kullanılmaktadır. Ayrıca, tohumla taşınan bazı bakteriyel hastalık etmenlerinin mücadelesinde, örneğin bakteriyel benek hastalık etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı tohum yataklarında bakırlı bileşikler ile kontrol gerçekleştirilmektedir (Çalış ve Çelik, 2011). Bakırlı preparatlar bitkide koruyucu olarak kullanılmakta, çeşitli fungusitler ile beraber kullanımı ile sinerjistik etki göstererek fungal etmenlere karşı koruyucu bir etki de yapabilmektedir (Agrios, 1997). Genellikle bakteriyel etmenlerle mücadele zor olduğu

için kültürel önlemlere ve sanitasyon uygulamalarına çok dikkat edilmelidir (Loh ve Martin, 1995).

Bu çalışmada; Ege Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan bir dizi bitki patojeni ve saprofitik/antagonistik bakteri izolatının bakırlı bileşiklere karşı duyarlılık düzeyleri açısından *in-vitro* koşullarda farklı yoğunlukta bakır içeren besi yerinde kültüre alma yoluyla araştırılması amaçlanmıştır. Bakır iyonlarına karşı duyarlılık azalışı saptanan bakteriyel izolatlar daha sonra bakırlı bileşiklerin farklı formülasyonlarının farklı dozları ile yine *in-vitro*'da karşı karşıya getirilerek, bakteriyel etmenlerin farklı bakırlı preparatlara verdiği reaksiyon da değerlendirilmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Çalışmada bakteriyel patojen ve saprofitik/antagonistik bakteri olarak, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan 33 adet izolat (Çizelge 1) kullanılmıştır. Çalışma kapsamında denemeye alınan farklı etki maddeli bakır formları, çeşitli bakteriyel hastalıkların mücadelesinde kullanılan ticari preparatları çalışmada kullanılmak üzere ele alınmıştır. "Bakır Sülfat" referans bakır olarak kullanılmıştır. Çalışma kapsamında; bakır hidroksit (Champ Formula 2 Flowable, %36 SC, Lances Link), bakır oksiklorür (Cupravit ob 21, %50 WP, Bayer), bakır sülfat pentahidrat (Mastercop SC, %6.6, SC, Agrikem), bakır oksit (Nordox 75 WG, %75, WG, Nordox AS), bakır sülfat (Okey, %3, SC, United Chemical Co.) ve nano bakır (Servalesa, %7, SC) ticari bakırlı bileşikler kullanılmıştır.

Çalışmada, besi yeri olarak bakırlı ortam hazırlanmasında NA (Nutrient Broth Agar) (1 litre için; Nutrient Broth: 8 g, Merck agar: 16 g, saf su 1000 ml) kullanılmıştır. Bakteriyel testlerde kullanılmak üzere yeni bakteri kültürünün elde edilmesi için, King B kültür besi ortamı (1 litre için; Bacto pepton: 20 g, Gliserol: 10 ml, K_2HPO_4 : 1.5 g, $MgSO_4 \cdot H_2O$: 1.5 g, Merck agar: 18 g, saf su 1000 ml) kullanılmıştır (King ve Raney, 1954).

Yöntem

Bakterilerin bakıra toleransları açısından *in-vitro*'da testlenmesi

In-vitro testlerde; ilk olarak bakteriyel izolatların bakır sülfat'ın farklı doz serilerinde gelişme durumuna bakılmıştır. Bakırın farklı dozlarına tolerans gösteren bakteriyel izolatlar daha sonra farklı bakır formlarını ve formülasyonlarını içeren ticari bakırlı preparatların farklı doz serileriyle *in-vitro* koşullarda testlenmiştir.

İlaçlı besi yeri hazırlığında Nutrient Agar besi yeri kullanılmıştır. Her bir doz serisi ayrı erlende

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan test bakterilerine ilişkin bilgiler

İzolat no	İzolatın adı	İzolatın türü	İzole edildiği konukçu	İzole edildiği yer
1	24K	<i>Acidovorax citrulli</i>	Karpuz	TOTEM*
2	29 Yaprak	<i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i>	Domates	Aydın
3	29 Gövde	<i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i>	Domates	Aydın
4	30 Gövde	<i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i>	Domates	Aydın
5	Psl (CFBP 2262)	<i>P. s. pv lachrymans</i>	Hıyar	INRA, Fransa
6	Acidovorax1	<i>A. citrulli</i>	Karpuz	TOTEM
7	Acidovorax2	<i>A. citrulli</i>	Karpuz	TOTEM
8	Pst Re-izolasyon	<i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i>	Domates	
9	Erwinia	<i>Erwinia amylovora</i>	Ayva	Bursa
10	Ateş yanıklığı armut	<i>E. amylovora</i>	Armut	Bayındır
11	P 39/2 şeftali çiçek	<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Şeftali	
12	Badem	<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Badem	Yalova
13	Badem Yalova	<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Badem	Yalova
14	P11/2	<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Şeftali	Aydın
15	P29/2	<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Şeftali	Manisa
16	P40/3	<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Şeftali	Çanakkale
17	P23/2-b	<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Şeftali	Manisa
18	Da3(1)	<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Kiraz	İzmir
19	Da3(2)	<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	Kiraz	İzmir
20	P.ago USA E 325	<i>Pantoea agglomerans</i>		A.B.D
21	P.vagans C9-IRS	<i>P. vagans</i>		A.B.D
22	PF A506	<i>P. fluorescens</i>		A.B.D
23	C2 (Xaj BAN)	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>juglandis</i>	Ceviz	
24	C3 (Xaj BAN)	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>juglandis</i>	Ceviz	
25	C1 (Xaj BAN)	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>juglandis</i>	Ceviz	
26	XAJ 2528	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>juglandis</i>	Ceviz	Fransa/INRA
27	C10	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>juglandis</i>	Ceviz	
28	C18	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>juglandis</i>	Ceviz	
29	Harward (Xaj BAN)	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>juglandis</i>	Ceviz	
30	C34	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>juglandis</i>	Ceviz	
31	C28	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>juglandis</i>	Ceviz	
32	Ayva bursa 2	<i>E. amylovora</i>	Ayva	Bursa
33	Ayva bursa	<i>E. amylovora</i>	Ayva	Bursa

*Ege Üniversitesi Tohum Teknolojisi Araştırma ve Uygulama Merkezi

hazırlanmış, otoklavda sterilize edilmiş ve 40 °C'ye soğutulmuş 100'er ml NA'a ihtiyaç duyulmuştur. Daha sonra stok çözeltileri (bakırlı preparat) belirlenen oranlarda erlenlere ilave edilerek steril petrilere dökülerek katılaşmaları beklenmiştir.

Bakteriyel testlerde kullanılmak üzere 24 saatlik taze bakteri kültürünün elde edilmesi için, King B besi ortamı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan test bakterileri besi ortamında geliştirilerek, sayılabilecek yoğunluktaki seyreltme basamakları belirlenmiştir.

Bakır sülfat ile yapılan *in-vitro* testler

Çalışmada; bakteriyel etmenlerin bakıra tolerans düzeylerini belirlemek için, öncelikle saf bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)'ın farklı konsantrasyonlarına (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5 ve 2 mM) karşı reaksiyonu *in-vitro*'da kültüre alarak belirlenmiştir. İstenilen fungusit dozlarını elde edebilmek için yüksek dozda hazırlanan (100000 ppm / 10000 ppm / 5000 ppm) stok solüsyonlarından seyreltmeler yapılmıştır. *In-vitro* testlerde Nutrient Agar (NA) besi yeri kullanılmıştır. Testlenen saf bakır sülfatın farklı doz

serileri hazırlanarak ve her bir doz serisi 40 °C'e soğutulmuş besi yerine verilerek 9 cm çaplı plastik petrilere dökülmüştür. Sayılabilecek yoğunlukta bakteri süspansiyonu (10^7 CFU/ml yoğunlukta hazırlanan bakteri süspansiyonu, en az 10^{-4-5-6} basamağına kadar seyreltilmiştir) seyreltme işlemi ile petri yüzeyine birbirinden eşit uzaklıkta 4 noktaya 10 µl olacak şekilde besi yeri üzerine damlatılmıştır. *In-vitro* testlerde her bir doz serisi testlenen her bakteri izolatu için 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 4 nokta olmak üzere değerlendirilmiştir. Uygulama gören petrilere 48–72 saat süreyle 24 °C'de inkubasyona bırakılmış, inokulasyon noktalarında gelişen bakteriyel koloniler sayılarak bakır sülfatın farklı doz serilerindeki minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIC) ve bakteriyel gelişimi %50 engelleyen doz (ED_{50}) değerleri saptanmıştır. ED_{50} değerleri, kontrole göre yüzde gelişim değerlerinin log-probit kâğıda uygulanması ile bulunmuştur (Georgopoulos ve Dekker, 1982; Beevere ve ark., 1989). Böylece, testlenen bakteriyel izolatların bakıra tolerans düzeyleri belirlenmiştir.

Çizelge 2. Bakır sülfat için elde edilen ED₅₀ (µg/ml) ve MIC (mM) değerleri

İzolatlar	Türü P/S*	ED ₅₀ (µg/ml)	MIC (mM)
1 Ac	P	0.56	1
2 Pst	P	0.68	2
3 Pst	P	0.65	2
4 Pst	P	0.59	2
5 Psl	P	0.41	0.5
6 Ac	P	0.55	0.7
7 Ac	P	0.48	0.7
8 Pst	P	0.6	1
9 Ea	P	0.12	0.2
10 Ea	P	0.17	0.3
11 Pss	P	1.3	2
12 Pss	P	0.29	0.7
13 Pss	P	0.61	0.9
14 Pss	P	0.65	0.7
15 Pss	P	0.12	0.7
16 Pss	P	0.82	1
17 Pss	P	0.16	1.5
18 Pss	P	0.23	0.5
19 Pss	P	0.34	0.5
20 Pa	S	0.41	0.5
21 Pv	S	0.22	0.5
22 Pf	S	0.72	1.5
23 Xaj	P	0.2	0.5
24 Xaj	P	0.19	0.5
25 Xaj	P	0.21	0.5
26 Xaj	P	0.23	0.5
27 Xaj	P	0.18	0.5
28 Xaj	P	0.16	0.5
29 Xaj	P	0.17	0.5
30 Xaj	P	0.14	0.5
31 Xaj	P	0.21	0.5
32 Ea	P	0.34	0.5
33 Ea	P	0.15	0.3

*P: patojen, S: saprofit

Bakır sülfat ile yapılan *in-vitro* testler sonucunda 0.5 mM ve üzerindeki bakır dozlarında koloni gelişimi gösteren bakteriyel izolatlar seçilerek farklı bakırlı formülasyonlar içeren preparatların testlenmesinde kullanılmıştır.

Ticari bakırlı preparatlar ile yapılan *in-vitro* testler

Bakır sülfatın farklı doz serilerinde gelişerek bakıra tolerans gösterdiği saptanan bakteriyel izolatlar, farklı bakırlı preparatların farklı doz serilerinde (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5 ve 2 mM) gösterdiği reaksiyon açısından *in-vitro* koşullarda "Bakır Sülfat ile yapılan *in-vitro* testler" bölümünde belirtildiği gibi testlenmiş ve doz serilerindeki minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIC) ve bakteriyel gelişimi %50 engelleyen doz (ED₅₀) değerleri saptanmıştır. ED₅₀ değerleri, kontrole göre yüzde gelişim değerlerinin log-probit kâğıda uygulanması ile bulunmuştur. Böylece, testlenen bakteriyel izolatların bakıra tolerans düzeyleri belirlenmiştir.

Bu testler sonucunda bakteriyel izolatların bakıra tolerans düzeylerinin yanı sıra, farklı bakır formülasyonlarının bakterilerin bakıra tolerans düzeyleri üzerine etkisi de değerlendirilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bakterilerin bakıra toleransları açısından *in-vitro*'da testlenmesi

Bakır sülfat ile yapılan *in-vitro* testler

Bakteriyel izolatlar bakır sülfat ile *in-vitro* koşullarında testlenmiştir. Bakır sülfatta ED₅₀ değerlerine bakıldığında; izolatların %33.3'ü (11 adet) 0.1–0.2 µg/ml arasında, %33.3'ü (11 adet) 0.2–0.5 µg/ml arasında, %24.24'ü (8 adet) 0.5–0.7 µg/ml arasında, %6.06'sı (2 adet) 0.7–1 µg/ml arasında ve %3.03'ü (1 adet) 1–2 µg/ml arasında bulunmuştur. Bakır sülfat için MIC değerlerine bakılacak olursa; izolatların %9.09'u (3 adet) 0.1–0.3 mM arasında, %45.45 (15 adet) 0.3–0.5 mM arasında, %15.15'i (5 adet) 0.5–0.7 mM arasında, %12.12'si (4 adet) 0.7–1 mM arasında ve %18.18'u (6 adet) 1–2 mM arasında bulunmuştur (Çizelge 2).

Bakır sülfata karşı en çok dayanıklılık gösterdiği belirlenen 6 izolat MIC ve ED₅₀ değerlerine bakılarak saptanmıştır. Buna göre; 2 (Pst) nolu izolat (ED₅₀: 0.68 µg/ml, MIC: 2 mM), 3 (Pst) nolu izolat (ED₅₀: 0.65 µg/ml, MIC: 2 mM), 6 (Ac) nolu izolat (ED₅₀: 0.55 µg/ml, MIC: 0.7 mM), 11 (Pss) nolu izolat (ED₅₀: 1.3 µg/ml, MIC: 2 mM), 16 (Pss) nolu izolat (ED₅₀: 0.82 µg/ml, MIC: 1 mM) ve 22 (Pf) nolu izolat (ED₅₀: 0.72 µg/ml, MIC: 1.5 mM) ticari bakırlı preparatlara karşı testlenmek üzere seçilmiştir. Bakıra tolerans gösteren izolatlar bakıldığında, *Pseudomonas* grubu bakterilerde, diğer türlere göre dayanıklılığın daha fazla olduğu görülmektedir. Aynı şekilde, yoğun bakır kullanılan fide firmalarından gelen karpuz fide örneklerinden izole edilen *A. citrulli*'nin de bakıra duyarlılığının azaldığı görülmektedir. Bu durum çeşitli araştırmacılar tarafından da saptanmıştır (Bender ve Cooksey, 1986; Bender ve Cooksey, 1987; Cha ve Cooksey, 1991). Bunun nedeninin, tarla ve seralarda yoğun bakır kullanılmasından kaynaklandığı, özellikle bu alanlardan izole edilen *P. syringae* pv. *tomato* ve *P. syringae* pv. *syringae* izolatlarının bakıra karşı dayanıklılık kazandığı düşünülmüştür.

Cooksey (1990b), sert ve yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında bakteriyel kanser etmeni *P. syringae* pv. *syringae*'nin de bakıra karşı tolerans gösterdiğini yaptığı çalışmada belirtmiştir. Benzer şekilde, domateste bakteriyel benek etmeni *P. syringae* pv. *tomato*'nun da bakırlı bileşiklere karşı dayanıklılık kazandığı da 1980'li yıllardan beri bilinmektedir (Bender ve Cooksey, 1986; Bender ve Cooksey, 1987; Cooksey, 1987). Ayrıca; *P. cichorii*, *P. fluorescens*, *P. putida* gibi bazı saprofitik *Pseudomonas* türleri arasında da benzer şekilde bir bakır dayanıklılığı olduğu Cooksey ve ark. (1990) tarafından bildirilmiştir. Türkiye'de ise; Pst izolatlarında bakıra karşı duyarlılık azalışını Özaktan ve ark. (1991)

Çizelge 3. Bakteri izolatlarının ED₅₀ değerlerine (µg/ml) göre sayısal ve oransal (%) dağılımları

Kimyasal maddeler	İzolat sayısı	Dozlar ve ED ₅₀ değerlerine (µg/ml) göre sayısal ve oransal (%) dağılımları*				
		<0.1 (mM)	0.1-0.2 (mM)	0.2-0.5 (mM)	0.5-0.7 (mM)	0.7-1 (mM)
Bakır hidroksit	6	–	1 (16.7)	4 (66.7)	–	1 (16.7)
Bakır oksiklorür	5	–	3 (60)	1 (20)	1 (20)	–
Bakır sülfat pentahidrat	6	–	6 (100)	–	–	–
Nano bakır	6	–	6 (100)	–	–	–
Bakır oksit	6	–	1 (16.7)	4 (66.7)	1 (16.7)	–
Sıvı bakır sülfat (Okey)	6	6 (100)	–	–	–	–

*Parantez içindeki rakamlar (%) oransal dağılımları göstermektedir.

Çizelge 4. Bakteri izolatlarının MIC değerlerine (mM) göre sayısal ve oransal (%) dağılımları

Kimyasal maddeler	İzolat sayısı	Dozlar ve MIC değerlerine (mM) göre sayısal ve oransal (%) dağılımları*				
		0.1-0.3 (mM)	0.3-0.5 (mM)	0.5-0.7 (mM)	0.7-1 (mM)	1-2 (mM)
Bakır hidroksit	6	–	3 (50)	–	2 (33.3)	1 (16.7)
Bakır oksiklorür	5	–	3 (60)	1 (20)	1 (20)	–
Bakır sülfat pentahidrat	6	4 (66.7)	1 (16.7)	1 (16.7)	–	–
Nano bakır	6	4 (66.7)	2 (33.3)	–	–	–
Bakır oksit	6	–	4 (66.7)	1 (16.7)	–	1 (16.7)
Sıvı bakır sülfat (Okey)	6	6 (100)	–	–	–	–

*Parantez içindeki rakamlar (%) oransal dağılımları göstermektedir.

ve Benlioğlu ve Benlioğlu (1998) yaptıkları çalışmalarında saptamışlardır.

Ticari bakırlı preparatlar ile yapılan *in-vitro* testler

Bakır sülfat ile testlenip duyarlılık azalışı gözlenen 6 izolat, ticari bakırlı preparatlar ile denemeye alınmıştır. Çizelge 3'te ED₅₀ değerlerine (µg/ml) göre sayısal ve oransal (%) dağılımları, Çizelge 4'te ise MIC (mM) değerlerine göre sayısal ve oransal (%) dağılımları özetlenmiştir.

Çizelge 3'e göre, bakır hidroksit için ED₅₀ değerleri, izolatların %16.7'sinin (1 adet) 0.1–0.2 µg/ml arasında, %66.7'sinin (4 adet) 0.2–0.5 µg/ml arasında ve %16.7'si ise (1 adet) 0.7–1 µg/ml arasında bulunmuştur. Bakır oksiklorür için; izolatların %60'ı (3 adet) 0.1–0.2 µg/ml, %20'si (1 adet) 0.2–0.5 µg/ml arasında ve %20'si 0.5–0.7 µg/ml arasında saptanmıştır. Bakır sülfat pentahidrat için, izolatların %100'ü (6 adet) 0.1–0.2 µg/ml arasında bulunmuştur. Nano bakır için; izolatların %100'ü (6 adet) 0.1–0.2 µg/ml arasında bulunmuştur. Bakır oksit için; izolatların %16.7'si (1 adet) 0.1–0.2 µg/ml arasında, %66.7'si (4 adet) 0.2–0.5 µg/ml arasında ve %16.7'si (1 adet) 0.5–0.7 µg/ml arasında bulunmuştur. Sıvı bakır sülfat için; izolatların %100'ünün (6 adet) ED₅₀ değerleri <0.1 µg/ml olarak saptanmıştır.

Çizelge 4'e göre, bakır hidroksit için MIC (mM) değerleri, izolatların %50'si (3 adet) 0.3–0.5 mM arasında, %33.3'ü (2 adet) 0.7–1 mM arasında ve %16.7'si (1 adet) 1–2 mM arasında bulunmuştur. Bakır oksiklorür için, izolatların %60'ı (3 adet) 0.3–0.5 mM arasında, %20'si (1 adet) 0.5–0.7 mM arasında ve %20'si (1 adet) 0.7–1 mM arasında bulunmuştur. Bakır sülfat pentahidrat için, izolatların %66.7'si (4 adet)

0.1–0.3 mM arasında, %16.7'si (1 adet) 0.3–0.5 mM arasında ve %16.7'si (1 adet) 0.5–0.7 mM arasında bulunmuştur. Nano bakır için izolatların %66.7'si (4 adet) 0.1–0.3 mM arasında ve %33.3'ü (2 adet) 0.3–0.5 mM arasında bulunmuştur. Bakır oksit için, izolatların %66.7'si (4 adet) 0.3–0.5 mM arasında, %16.7'si (1 adet) 0.5–0.7 mM arasında ve %16.7'si (1 adet) 1–2 mM arasında bulunmuştur. Sıvı bakır sülfat için, izolatların %100'ü (6 adet) 0.1–0.3 mM arasında bulunmuştur.

Ticari bakırlı preparatlarla *in-vitro* koşullarda yapılan testlerde, ED₅₀ değerlerine göre en etkili bulunan preparatlar sırasıyla; sıvı bakır sülfat, nano bakır, bakır sülfat pentahidrat, bakır oksiklorür, bakır oksit ve bakır hidroksit olarak saptanmıştır. MIC değerlerine göre en etkili bulunan preparatlar ise sırasıyla; sıvı bakır sülfat, nano bakır, bakır sülfat pentahidrat, bakır oksit, bakır oksiklorür ve bakır hidroksittir. Bu sonuçlar, bakırın farklı formları ve formülasyonlarının etkililikte payı olduğunu düşündürmektedir. Paulin ve Lachaud (1984) ve Burr ve Norelli (1984) değişik bakır formlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, sülfat formundaki bakırın, hidroksit, oksiklorür veya amonyaklı bakır sülfat formundan daha etkili olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca, bakırlıların etkisinin Cu iyonunun konsantrasyonuna bağlı olduğunu da bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmada, *in-vitro* testlerde bakır hidroksit ve bakır oksiklorür, bakteriyel patojenlere karşı en etkisiz bulunan preparatlar olmuştur. Zeller ve ark. (1984) bakır oksikloridi çiçek ve sürgün yanıklığına karşı kullanarak %46–66 arasında etkili bulmuşlardır. Buna karşın, Paulin ve ark. (1987) armut çiçek enfeksiyonlarına karşı bordo bulamacı ve bakır hidroksiti başarısız bulmuşlar ve bunu soğuk ve nemli hava nedeniyle bakırlıların aktivite gösterememesine

bağlamışlardır. Benlioğlu ve Benlioğlu (1998) bazı bakır oksiklorür, bakır oksit, bakır hidroksit ve ethylenebisdithiocarbamate'lı fungusitlerin (maneb, mancozeb) bakıra dayanıklı *Pst* izolatlarına karşı tek başlarına ve birlikte uygulandıklarında *in-vitro* ve sera testlerinde etkisiz olduğunu saptamışlardır. Özakant ve ark. (1991) yaptıkları çalışmalarında, *Pst* izolatları arasında bakırlı bileşiklerin etkililiğinde farklılıklar saptanmasının, bakırlı bileşiklerin eriyebilirliklerinin birbirinden farklı olmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, antagonist bakterilerin de bakırlı preparatlara karşı duyarlılığının azaldığı saptanmıştır. Bakırlı preparatlara dayanıklılık konusu bitki patojeni bakterilerle mücadelede olumsuzluk yaratmaktadır. Ancak bitki patojeni bakterilerle biyolojik mücadelede kullanılan bakteriyel antagonistlerin bazılarının da bakırlı preparatlara dayanıklı bulunması önem taşımaktadır. Bu özellikle entegre mücadele (IPM) açısından olumlu sonuçlar doğurmaktadır. Cooksey ve ark. (1990), *P. fluorescens*, *P. putida* gibi bakteriler arasında da benzer şekilde bir bakır dayanıklılığı olduğunu belirtmişlerdir. Bu dayanıklılığın, plazmid kaynaklı bakıra dayanıklılık genleri ile idare edildiği düşünülmektedir (Cooksey, 1993).

Sonuç olarak çalışmada elde verilere göre; bitki patojeni ve saprofit bakteri izolatlarının bakırlı bileşiklere olan tolerans düzeyleri araştırılmış ve 6 tanesinde duyarlılık azalışı olduğu saptanmıştır. Duyarlılık azalışı gözlenen izolatlar arasında bir antagonist bakteri de bulunmaktadır. Bu durum bitki patojeni bakterilerin savaşımında olumlu sonuçlar doğurmakta, özellikle entegre mücadele (IPM) açısından önem taşımaktadır. Duyarlılığı azalan bakteri izolatlarının sıvı bakır sülfat ve nano bakıra karşı duyarlı oldukları saptanmıştır. Bu sonuca bakılarak, bakteriyel patojenlerde bakır dayanıklılığı ile başa çıkmada, bakır sülfat ile dönüşümlü olarak kullanılmaları önerilebilir. Dayanıklılık sorununa karşı önlem olarak farklı bakırlı formülasyonların kullanılması, bakırlıların yanı sıra "zararsız kimyasallar" olarak bilinen bazı alternatif mücadele yöntemlerine başvurulması gereklidir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Adaskaveg, J.E. and Hine, R.B. 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease* 69:993-996.
- Agrios, G.N. 1997. *Plant pathology*. Fourth edition Academic press, London.
- Anonim 2020. <https://tr.wikipedia.org>. Erişim tarihi: 29.07.2020.
- Beevere, R.E., Laracy, E.P. and Park, H. 1989. Strains of *B. cinerea* Resistant to dicarboximide and benzimidazole Fungicides in New Zealand Vineyards. *Plant Pathology* 39: 427-437.
- Bender, C.L. and Cooksey, D.A. 1986. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. *Journal of Bacteriology* 165:534-541.
- Bender, C.L. and Cooksey, D.A. 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Journal of Bacteriology* 169:470-474.
- Bender, C.L., Malvick, D.K., Conway, K.E., George, S. and Pratt, P. 1990. Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology* 56:170-175.
- Benlioğlu, K. 2012. Bitki patojeni bakteriler. *Bitki Koruma Ders Notları*, ADÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 1-13.
- Benlioğlu, K. and Benlioğlu, S. 1998. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 'ya karşı bakır dayanıklılığı üzerinde çalışmalar. 8. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 52.
- Burr, T.J. and Norelli, J.L. 1984. Recent progress in chemical control fire blight. *Acta Horticulturae* 151:155-164.
- Cha, J.S. and Cooksey, D.A. 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:8915-8919.
- Cooksey, D.A. 1987. Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Applied and Environmental Microbiology* 53:454-456.
- Cooksey, D.A. 1990a. Plasmid-determined copper resistance in *Pseudomonas syringae* from *impatiens*. *Applied and Environmental Microbiology* 56:13-16.
- Cooksey, D.A. 1990b. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 28:201-219.
- Cooksey, D.A. 1993. Copper uptake and resistance in bacteria. *Molecular Microbiology* 7(1):1-5.
- Cooksey, D.A., Azad, H.R., Cha, J.S. and Lim, C.K. 1990. Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. *Applied and Environmental Microbiology* 56:431-435.
- Çalış, Ö. and Çelik, D. 2011. Bakteriyel benek hastalık etmenine (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* dc3000) karşı kültür domateslerinde hassas ve dayanıklı hatların belirlenmesi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 4 (2):7-11.
- Georgopoulos, S.G. and Dekker, L. 1982. Detection and Measurement of Fungicide Resistance. *General Principles*, FAO Method. FAO Plant Bot. Bull. 30: 39-42.
- King, E.O. and Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration for pyocyanin and *fluorescens*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44:103-307.
- Loh, Y.T., and Martin, G.B. 1995. The disease resistance gene *Pto* and the fenthion-sensitivity gene *Fen* encode closely related functional protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:4181-4184.
- Marco, G.M. and Stall, R.E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease* 67:779-781.
- Özakant, H. and Bora, T. 1991. Domates bakteriyel solgunluğu (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.) ile savaşım olanakları

- üzerine Araştırmalar. Ege Üniversitesi Doktora Tezi, 99 s, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Özaktan, H., Öden, S. and Delen, N. 1991. Domates bakteriyel benek hastalığı etmeni (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)'ne bazı bakırlı preparatların etkililikleri üzerinde araştırmalar. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, No:6:291-294.
- Paulin, J.P. and Lachaud, G. 1984. Comparison of the efficiency of some chemicals in preventing fire blight blossom infections. *Acta Horticulturae* 151:209-214.
- Paulin, J.P., Lachaud, G. and Chartier, R. 1987. Results of spray experiments on the control of fire blight *Acta Horticulturae* 217:239-243.
- Ritchie, D.F. and Dittapongpitch, V. 1991. Copper and streptomycin resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Disease* 75:733-736.
- Sabet, K.K., Mostafa, M.A., El-Said, S.I. and El-Gamal, N.G. 2000. Biological and chemical control of root diseases of tomato plants. International Conference on Pests and Diseases, Brighton, England, 1-3: 1043-1048.
- Stall, R.E., Loschke, D.C. and Jones, J.B. 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 76:240-243.
- Sundin, G.W., Jones, A.L. and Fulbright, D.W. 1989. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. *Phytopathology* 79:861-865.
- Türküsay, H. and Tosun, N. 2005. Hidrojen Peroksit Uygulamalarının Domates Bakteriyel Solgunluk ve Kanser Hastalığı (*Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Smith) Davis et al)'na Etkileri. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 42(2):45-56.
- Yazan, H.A., Akar, A. and Özmerih, L. 1972. Bakır ve bakır ürünleri kullanım alanları. *Bilimsel Madencilik Dergisi* 44-47.
- Zeller, W., Masfeller, D. and Krebs, E. 1984. Further experiments to control fire blight in Federal Republic of Germany. *Acta Horticulturae* 151:165-172.